



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE
PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT

En BIOCHIMIE
Option : BIOCHIMIE APPLIQUEE

THEME

**Etude phytochimique et biologique d'une espèce végétale
endémique algérienne « *Thymus numidicus* Poiret ».**

Présentée par: M^{me}. KOUCH Mina

Directeur de thèse : M^{me}. BENNADJA Salima

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Président : M^r. MESSARAH Mahfoud

Professeur, Université d'Annaba.

Examineurs : M^r. ARAB Karim

Professeur, Université de Boumerdes.

M^r. CHEFROUR Azzedine

Professeur, Université de Souk-Ahras.

Année universitaire: 2014 - 2015

Remerciements

Mes plus vifs remerciements vont tout d'abord à mon directeur de thèse M^{me}. Salima BENNADJA (Professeur de l'Université d'Annaba) qui m'a fait l'honneur et le plaisir de diriger ce travail. Elle a su me transmettre avec beaucoup de passion et de rigueur tout l'amour qu'elle porte à la science et à la recherche.

J'adresse mes sincères remerciements à mon co-directeur de thèse M^r. Saoudi AOUADI (Maitre de conférences de l'Université d'Annaba) pour sa disponibilité et son total dévouement.

J'exprime toute ma gratitude à M^r. Mahfoud MESSARAH (Professeur de l'Université d'Annaba) pour avoir accepté de présider ce jury.

Je suis très honorée par la présence dans ce jury de M^r. Karim ARAB (Professeur de l'Université de Boumerdes) et M^r. Azzedine CHEFROUR (Professeur de l'Université de Souk-Ahras) et je leur adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté humblement de lire l'intégralité de ce manuscrit et de l'évaluer.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans l'appui de M^r. Abdelghani DJAHOUDI (Professeur de l'Université d'Annaba), que je remercie du fond du cœur pour ses qualités humaines et son professionnalisme.

Je témoigne aussi tout mon respect à M^{me}. Yasmina AIT-KAKI (Professeur de l'Université d'Annaba), et je la remercie pour sa présence et son encouragement tout au long de ces années.

Je ne remercierai jamais assez ma mère pour l'amour inconditionnel qu'elle me porte et qui m'aide à traverser toutes les difficultés de la vie.

Je tiens aussi à remercier tous les membres de ma famille (mon mari, ma fille, ma sœur, mon frère, mon beau-frère, ma belle-sœur, mes nièces et neveux, ma belle famille et ma meilleure amie amira que je considère comme une sœur) pour leur soutien physique et moral tout au long de ce parcours semé d'embûches.

J'exprime aussi toute ma reconnaissance à M^r. Ryad MANSOURI, M^r. Malek KADDOUR et M^{me}. Chahira BOUZAATA, qui m'ont été d'une aide précieuse lors de la réalisation de la partie expérimentale de ce travail.

Je n'oserai oublier mes copines et toutes mes sœurs de cœur du laboratoire de Microbiologie et du laboratoire de Botanique médicale (amira, nora, sonia, amel, naziha, henda, sara, soumeya, saida) qui ont contribué à créer un cadre de travail agréable et chaleureux.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

A la mémoire de mon père

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales de l'Est algérien, nous avons entrepris une étude sur *Thymus numidicus* Poiret, qui est une espèce de thym endémique algéro-tunisienne.

Le matériel végétal a été récolté dans la région de Berrahal, donnant suite à plusieurs investigations. L'huile essentielle a été extraite par procédé d'hydrodistillation donnant un rendement de 1,92 %. La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Nous avons pu répertorier 13 composants, essentiellement des phénols et des terpènes dont le thymol est le composant majoritaire avec 77,52%. Les autres constituants importants sont respectivement le *P*-cymène (10,10%), le γ -terpinène (6,38%) et le β -pinène (3,16%).

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle a été évaluée par le test du piégeage du radical libre DPPH, l'étude s'est soldée par des résultats modestes, comparés aux antioxydants de référence.

Nous avons testé par la suite l'effet de cette huile essentielle sur un total de 49 souches bactériennes par la méthode de diffusion sur disque, et la méthode de dilution en milieu gélosé. Les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont relativement importants pour toutes les espèces bactériennes testées. Les CMI obtenues pour ces mêmes souches sont tout aussi satisfaisantes. L'huile essentielle de *Thymus numidicus* Poiret s'est avérée dotée de propriétés antibactériennes incontestables.

Mots clés : *Thymus numidicus*, huiles essentielles, criblage phytochimique, CG/SM, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

In order to valorize the Algerian medicinal aromatic plants, we undertook a study about *Thymus numidicus* Poiret, which is an aromatic plant endemic to Algeria and Tunisia.

The vegetal material was harvested in the region of Berrahal, following up several investigations. The essential oil was extracted by hydrodistillation process and chemical composition of this one was determined by gas chromatography coupled to a mass spectroscopy. 13 components have been identified, mainly phenol and terpenes and whose thymol is the major element with 77, 52%. The other important compounds are respectively *P*-cymene (10, 10%), γ -terpinene (6, 38%) and β -pinene (3, 16%).

Antiradical activity of the essential oil was evaluated by testing the free radical scavenger of DPPH, the study has given modest results, compared to standards antioxidants.

We have also tested the effect of the essential oil against 49 strains by the diffusion method and the agar dilution method. Inhibitory diameters were important for all tested strains. MIC for these same strains were very satisfying. Essential oil of *Thymus numidicus* Poiret has indisputable antibacterial properties.

Key words: *Thymus numidicus*, essential oils, phytochemical screening, GC/MS, antioxidant activity, antibacterial activity.

المخلص

في إطار تقييم النباتات الطبية الموجودة بالشرق الجزائري قمنا بإجراء دراسة على نبتة الزعيرة والتي تعتبر نوعا من النباتات المستوطنة خصيصا بالجزائر وتونس.

لإجراء التحقيقات اللازمة قمنا بجني النبتة موضوع الدراسة من بلدية برحال بعنابة (شرق الجزائر). تم استخراج الزيوت العطرية بواسطة عملية التقطير بالبخار وقد المرود ب 1.92%. تم بعد تحديد التركيب الكيميائي للزيت العطري باستعمال الكروماتوغرافيا الغازية مقرونة بمطياف الكتلة. دراسة مكونات الزيت الأساسي لهذه النبتة سمحت بالتعرف على 13 مركب تابعة أساسا لفئة التربينات الأحادية والفينول حيث يظهر thymol كمركب غالب بنسبة 77.52%. المكونات الهامة الأخرى هي على التوالي: β -pinène (3,16%), γ -terpinène (6,38%), *P*-cymène (10,10%).

تم تحديد النشاط المضاد للأكسدة للزيوت العطرية باستعمال اختبار DPPH, من خلال النتائج المتحصل عليها يتضح بان هذا المستخلص يملك قدرة مضادة للأكسدة متوسطة مقارنة بمضادات الأكسدة القياسية.

اختبرنا بعد ذلك تأثير الزيت العطري على 49 سلالة بكتيرية بطريقة الانتشار من خلال قرص من الورق النشاف و طريقة التخفيف في وسط الجيلوز. أقطار مناطق التثبيط المحصل عليها كانت جد عالية لجميع السلالات البكتيرية المختبرة. التركيز المثبط الأدنى لنفس السلالات كان مرضيا.

ثبت لنا من خلال هذه الدراسة أن الزيت العطري المستخلص من نبتة الزعيرة له خصائص مضادة للبكتيريا جد معتبرة.

الكلمات المفتاحية:

Thymus numidicus, الفحص الكيميائي النباتي, الزيوت العطرية, النشاط المضاد للأكسدة, النشاط المضاد للبكتيريا.

Sommaire

Liste des figures	
Liste des photos	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	1
CHAPITRE I : Aperçu bibliographique	
<hr/>	
Partie I : Aperçu bibliographique sur l'espèce végétale et les souches bactériennes testées	
1. Généralités sur la biodiversité et l'endémisme	3
2. La famille des Lamiacées	5
2.1. Le genre <i>Thymus</i>	7
2.2. <i>Thymus numidicus</i> Poiret	7
2.2.1. Description botanique	7
2.2.2. Position systématique	8
2.2.3. Répartition géographique	8
3. Souches bactériennes tests	9
3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
3.1.1. Généralités	9
3.1.2. Classification	9
3.1.3. Habitat	10
3.1.4. Pouvoir pathogène	10
3.1.5. Résistance aux antibiotiques	11
3.2. <i>Escherichia coli</i>	11

3.2.1. Généralités	11
3.2.2. Classification	12
3.2.3. Habitat	12
3.2.4. Pouvoir pathogène	12
3.2.5. Résistance aux antibiotiques	13
3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
3.3.1. Généralités	13
3.3.2. Classification	14
3.3.3. Habitat	14
3.3.4. Pouvoir pathogène	15
3.3.5. Résistance aux antibiotiques	15
3.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
3.4.1. Généralités	16
3.4.2. Classification	16
3.4.3. Habitat	16
3.4.4. Pouvoir pathogène	17
3.4.5. Résistance aux antibiotiques	17
3.5. <i>Acinetobacter spp</i>	17
3.5.1. Généralités	17
3.5.2. Classification	18
3.5.3. Habitat	18
3.5.4. Pouvoir pathogène	19
3.5.5. Résistance aux antibiotiques	19

Partie II : Les huiles essentielles

1. Généralités	20
2. Constituants	21
2.1. Les terpènes	21

2.2.	Les terpénoïdes	22
2.3.	Les phénylpropènes	23
2.4.	Autres constituants	23
3.	Propriétés physico-chimiques	23
4.	Localisation dans la plante	24
5.	Procédés d'extraction	25
5.1.	L'hydrodistillation	25
5.2.	L'entraînement à la vapeur d'eau	25
5.3.	L'extraction par solvant organique	25
5.4.	L'expression	26
5.5.	L'enfleurage	26
5.6.	L'extraction au CO ₂ supercritique	26
5.7.	La distillation fractionnée	26
6.	Critères de qualité des huiles essentielles	26
7.	Intérêt	28

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

1.	Biotope du Thym de Numidie	29
1.1.	Climat	29
1.2.	Exigences pédologiques	30
1.2.1.	Détermination de la texture	30
1.2.2.	Détermination du pH.....	31
1.2.3.	Détermination de la conductivité	32
1.2.4.	Mesure de la matière organique	33
1.2.5.	Dosage des cations échangeables	34
1.2.6.	Dosage du phosphate	35
1.2.7.	Estimation de la qualité trophique du sol	36
2.	Prédispositions adaptatives	37

2.1. Type biologique	37
2.2. Phénologie	37
2.3. Morphologie	38
2.4. Structure anatomique	38
2.5. Adaptation physiologique	39
2.5.1. Screening phytochimique	39
2.5.1.1. Les saponines	39
2.5.1.2. Les flavonoïdes	40
2.5.1.3. Les tannins	40
2.5.1.4. Les alcaloïdes	40
2.5.1.5. Les terpènes	41
2.5.1.6. Les coumarines	41
2.5.2. L'huile essentielle	41
2.5.2.1. Extraction et calcul du rendement	41
2.5.2.2. Analyse des constituants chimiques de l'huile essentielle	42
3. Etude thérapeutique	44
3.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle (Effet scavenger du radical DPPH)	44
3.2. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle	46
3.2.1. Etude du comportement des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques.....	46
3.2.2. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne (aromatogramme)	50
3.2.3. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne (calcul des CMI)	50
3.2.4. Recherche de la CMB	50
3.2.5. Synergie huile essentielle/antibiotiques	51

Résultats et discussion	53
Conclusion et perspectives	97
Références bibliographiques	99
Annexe	

Liste des figures

Figure 01 :	Points-chauds (hotspots) régionaux de biodiversité végétale de la région méditerranéenne (Médail & Quézel, 1997)	3
Figure 02 :	Quelques espèces de la famille des lamiacées (A, <i>Salvia officinalis</i> ; B, <i>Thymus vulgaris</i> ; C, <i>Rosmarinus officinalis</i> , Simpson, 2006)	6
Figure 03 :	Observation microscopique de <i>Staphylococcus aureus</i> (Institut Pasteur, 2012).....	9
Figure 04 :	Observation microscopique d' <i>Escherichia coli</i> (Bioquell)	12
Figure 05 :	Observation microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Bioquell)	14
Figure 06 :	Observation microscopique de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Bioquell)	16
Figure 07 :	Observation microscopique d' <i>Acinetobacter spp</i> (C.D.C)	18
Figure 08 :	Structure chimique de quelques monoterpènes (Mann J., 1987)	21
Figure 09 :	Structure chimique de quelques sesquiterpènes (Mann J., 1987)	22
Figure 10 :	Poche sécrétrice dans <i>O. dictamnus</i> (Langhammer L., 1986)	24
Figure 11 :	Situation géographique de la région de Berrahal (Google Earth)	29
Figure 12 :	Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH)	44
Figure 13 :	Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disques	48
Figure 14 :	Diagramme ombrothermique de la région de Berrahal (2010-2014)	57
Figure 15 :	Composants majoritaires de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i>	74
Figure 16 :	Activité antiradicalaire du BHT (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)	77
Figure 17 :	Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)	78
Figure 18 :	Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de <i>Thymus numidicus</i> . (Chaque valeur représente la moyenne de trois essais \pm SD)	78
Figure 19 :	Pourcentages de résistance des souches SARM aux ATB	81
Figure 20 :	Pourcentages de résistance des souches d' <i>Acinetobacter spp</i> aux ATB	84
Figure 21 :	Pourcentage de résistance des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> aux ATB.....	85
Figure 22 :	Pourcentage de résistance des souches d' <i>Escherichia coli</i> aux ATB	88
Figure 23 :	Pourcentage de résistance des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux ATB	90

Liste des photos

Photo 01 :	Site de récolte du Thym de Numidie (Cliché de Kouch M.)	53
Photo 02 :	Abondance de l'Asphodèle dans le site de récolte (Cliché de Kouch M.) ..	55
Photo 03 :	<i>Thymus numidicus</i> Poiret (Cliché de Kouch M.)	62
Photo 04 :	Fleurs de <i>Thymus numidicus</i> Poiret (Cliché de Kouch M.)	62
Photo 05 :	Morphologie de la feuille de <i>T. numidicus</i> (face supérieure) vue sous binoculaire (Cliché Kouch M.)	63
Photo 06 :	Morphologie de la feuille de <i>T. numidicus</i> (face inférieure) vue sous binoculaire (Cliché Kouch M.)	63
Photo 07 :	Feuille stipulée de <i>T. numidicus</i> (Cliché de Kouch M.)	63
Photo 08 :	Plant de <i>Thymus Numidicus</i> (Cliché de Kouch M.)	64
Photo 09 :	Aspect de la face ventrale d'une feuille de <i>Thymus numidicus</i> vue sous binoculaire (Cliché de Kouch M.)	66
Photo 10 :	Coupe transversale d'une feuille de <i>T. numidicus</i> vue au microscope optique (Gr X 10) (Cliché de Kouch M.)	66
Photo 11 :	Mésophile de <i>T. numidicus</i> vue au microscope optique (Gr X 40) (Cliché Kouch M.)	66
Photo 12 :	Détail d'une crypte vue au microscope optique (Gr X 40) (Cliché Kouch M.)	67
Photo 13 :	Extrémité de la feuille vue au microscope optique (Gr X 40) (Cliché Kouch M.)	67
Photo 14 :	Structure anatomique de la nervure principale de <i>T. numidicus</i> (Cliché Kouch M.)	67
Photo 15 :	Détail des stomates sur la face supérieure (Cliché Kouch M.)	67
Photo 16 :	Structure secondaire d'une tige jeune de <i>T. numidicus</i> (Cliché de Kouch M.)	68
Photo 17 :	Ecorce de la tige avec cystholithe (Cliché de Kouch M.)	68
Photo 18 :	Structure secondaire d'une tige âgée de <i>T. numidicus</i> (Cliché de Kouch M.)	69
Photo 19 :	Structure d'une racine âgée de <i>T. numidicus</i> (Cliché de Kouch M.)	70
Photo 20 :	Screening des saponines	71
Photo 21 :	Screening des flavonoïdes	71
Photo 22 :	Screening des tanins	72
Photo 23 :	Screening des alcaloïdes	72
Photo 24 :	Screening des terpènes	72
Photo 25 :	Screening des coumarines	72
Photo 26 :	Aromatogramme de la souche SARM 186.....	82
Photo 27 :	Aromatogramme de la souche SARM 182.....	82
Photo 28 :	Détermination des CMI des souches SARM	83

Photo 29 :	Aromatogramme de la souche <i>Acinetobacter spp</i> 213	85
Photo 30 :	Aromatogramme de la souche <i>Acinetobacter spp</i> 237.....	85
Photo 31 :	Aromatogramme de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-.....	86
Photo 32 :	Aromatogramme de la souche <i>Klebsiella pneumoniae</i> 104	86
Photo 33 :	Détermination de la CMI des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	87
Photo 34 :	Aromatogramme de la souche <i>Escherichia coli</i> 42	89
Photo 35 :	Aromatogramme de la souche <i>Escherichia coli</i> 11	89
Photo 36 :	Détermination de la CMI des souches d' <i>Escherichia coli</i>	89
Photo 37 :	Aromatogramme de la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 67	91
Photo 38 :	Test de synergie entre HE/ATB.....	96

Liste des tableaux

Tableau 01 :	Principales familles botaniques à endémisme	4
Tableau 02 :	Classification des sols selon leur taux d'humidité	31
Tableau 03 :	Classification des sols selon leur pH	32
Tableau 04 :	Echelle de la conductivité électrique des sols	33
Tableau 05 :	Classification des sols selon leur teneur en matière organique.....	34
Tableau 06 :	Répartition des souches tests	46
Tableau 07 :	Valeurs des diamètres critiques des antibiotiques testés	49
Tableau 08 :	Composition floristique du site (surface de 100 m ²)	54
Tableau 09 :	Moyennes mensuelles des températures, des précipitations et de l'humidité de la région de Berrahal durant la période 2010-2014.....	56
Tableau 10 :	Caractéristiques climatiques de la région de Berrahal.....	56
Tableau 11 :	Détermination de la texture du sol.....	58
Tableau 12 :	Etude physicochimique du sol	58
Tableau 13 :	Détermination de la surface foliaire	60
Tableau 14 :	Détermination de la SLA et de la LDMC	60
Tableau 15 :	Criblage chimique des feuilles de <i>T. numidicus</i>	70
Tableau 16 :	Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus numidicus</i> Poiret.	74
Tableau 17 :	Comparaison entre les composants majoritaires des huiles essentielles de <i>T. numidicus</i> de différentes régions d'Algérie	76
Tableau 18 :	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> vis-à-vis des souches SARM.....	82
Tableau 19 :	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> vis-à-vis des souches d' <i>Acinetobacter spp</i>	84
Tableau 20 :	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> vis-à-vis des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	86
Tableau 21 :	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> vis-à-vis des souches d' <i>Escherichia coli</i>	88
Tableau 22 :	Activité antibactérienne de l'huile essentielle de <i>T. numidicus</i> vis-à-vis des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91
Tableau 23 :	Potentiel synergique entre l'HE de <i>T. numidicus</i> et l'imipénème.....	95
Tableau 24 :	Détermination du FICI	95

Liste des abréviations

Abs : Absorbance

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATB : Antibiotiques

ATCC: American Type Culture Collection.

BHT : Butylhydroxytoluène

CASFM: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CDC: Centers for disease control and prevention

CMB: Concentration minimale bactericide

CMI: Concentration minimale inhibitrice

CPG: Chromatographie en phase gazeuse

DMSO: DiméthylSulfOxyde

DO: Densité optique

DPPH: 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl

EGTA: Ethylene glycol tetraacetic acid

FeCl₃: Trichlorure de fer

FID: Détecteur à ionization de flamme

HE: Huile essentielle

IC 50: Concentration inhibitrice médiane

INRA: Institut National de la Recherche Agronomique

Kpc⁺ : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase positive.

Kpc⁻ : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase négative.

LDMC : Leaf Dry Matter Content

MH : Mueller Hinton

M.R.S.A : Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*

NaCl: Chlorure de sodium

NaOH: Hydroxyde de sodium

NH₄: Ion ammonium

NH₄OH: Ammoniaque

nm: Nanomètre

mS: millisiemens

RT: Temps de retention

SF: Surface foliaire

SLA: Specific leaf area

SM: Spectrométrie de masse

UFC: Unité formant une colonie

U.S.S.L.S: United State Salinity Laboratory Staff

Introduction

La situation géographique de l'Algérie en fait un pays qui regorge d'espèces végétales, beaucoup d'entre elles sont dotées de vertus thérapeutiques par le biais des métabolites secondaires qu'elles synthétisent et constituent une source inépuisable de principes actifs ; les huiles essentielles comptent parmi les plus importants et les plus méritants d'entre eux. Parmi ces espèces, 224 taxons sont des endémiques strictes à l'Algérie, 124 taxons sont à endémisme algéro-marocain et 58 taxons sont à endémisme algéro-tunisien (**Véla et Benhouhou, 2007**). C'est à cette dernière catégorie qu'appartient *Thymus numidicus* Poiret, l'espèce qui constitue le thème de notre étude.

Le Thym fait partie de ces plantes miraculeuses, utilisées depuis la découverte du feu à des fins liturgiques et thérapeutiques. On lui attribue bon nombre de propriétés dont des pouvoirs antibactériens avérés. Le Thym de Numidie est une espèce endémique algéro-tunisienne, elle a été découverte et décrite la première fois en 1785 & 1786 par Jean Louis M Poiret lors de son célèbre "Voyage en Barbarie", elle a été ensuite inventoriée par **Quezel et Santa (1963)** dans leur fameux ouvrage "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales". Depuis, très peu d'études ont été consacrées à cette espèce, sauf récemment certaines, qui ont surtout porté sur la composition chimique de l'huile essentielle (**Hadef et al., 2007**), sur ses propriétés antibactériennes et antioxydantes (**Zeghib et al., 2013., Djeddi et al., 2015**) et sur son potentiel insecticide (**Saidj et al., 2008**).

Bien que *Thymus numidicus* soit un élément majeur de la pharmacopée traditionnelle algérienne (utilisé principalement dans le traitement des affections respiratoires: asthme, bronchite, toux, grippe et aussi dans le traitement des troubles digestifs), nos connaissances sur cette espèce restent très modestes. Pour pouvoir conserver et apporter notre contribution dans la connaissance et la valorisation de notre flore endémique et précisément le Thym de Numidie. Nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Prospection du biotope (climat et sol) où se développe spontanément le Thym de Numidie.
- Etude des dispositions morpho-anatomo-physiologiques du Thym vis-à-vis des contraintes du climat méditerranéen.

- Extraction et analyse de l'huile essentielle par CG/SM.
- Etude des propriétés antiradicalaires et antibactériennes de l'HE.
- Recherche d'une synergie entre HE et l'imipénème chez *Pseudomonas aeruginosa* VIM2.

Pour cela notre travail a été subdivisé en deux grandes parties

- Une synthèse bibliographique qui sera entamée par un aperçu sur la biodiversité et l'endémisme en Algérie. Puis par un chapitre dédié à la description botanique de la famille, du genre et de l'espèce étudiée et des principales souches bactériennes testées. Un troisième chapitre sera consacré aux huiles essentielles et leurs usages thérapeutiques.
- Une partie expérimentale qui s'articulera sur :
 - Une étude climatique et pédologique du milieu dans lequel se développe l'espèce.
 - L'étude des prédispositions adaptatives du Thym de Numidie, du point de vue morphologique, histologique et physiologique, en plus d'un criblage phytochimique.
 - L'extraction de l'huile essentielle et la détermination de sa composition chimique par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectroscopie de masse.
 - Une étude biologique visant à évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle de cette espèce, mais aussi son activité antibactérienne et ce vis-à-vis de 10 souches d'*Escherichia coli*, 10 souches de *Klebsiella pneumoniae*, 10 souches d'*Acinetobacter spp*, 10 souches de *Staphylococcus aureus* et 09 souches de *Pseudomonas aeruginosa*.
 - Enfin, la recherche d'une éventuelle synergie entre l'huile essentielle et l'imipénème chez *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2, une souche résistante à l'imipénème.

Les résultats obtenus feront l'objet d'une interprétation à la lumière de la littérature disponible, aboutissant à une conclusion générale et des perspectives à envisager.

Aperçu bibliographique

PARTIE I: Aperçu bibliographique sur l'espèce végétale et les souches microbiennes testées

1. Généralités sur la biodiversité et l'endémisme

Selon Eurostat, la région méditerranéenne possède des zones biogéographiques parmi les plus rares au monde ainsi qu'une biodiversité de première importance. Et sur les 25 000 espèces connues de plantes méditerranéennes (9,2% des espèces identifiées dans le monde sur un territoire représentant seulement 1,5% de la surface terrestre), la moitié sont particulièrement bien adaptées notamment aux périodes sèches et 25% sont endémiques et ne se trouvent nulle part ailleurs dans le monde (Chaabane, 2010).

La Méditerranée est considérée comme une zone de haute biodiversité principalement en raison de sa diversité végétale. Celle-ci est cependant particulièrement menacée par les activités humaines. En tant que première destination touristique, cette région marquée par une population dense et un développement intense, est exposée à un large éventail d'impacts d'origine anthropique (Chaabane, 2010).

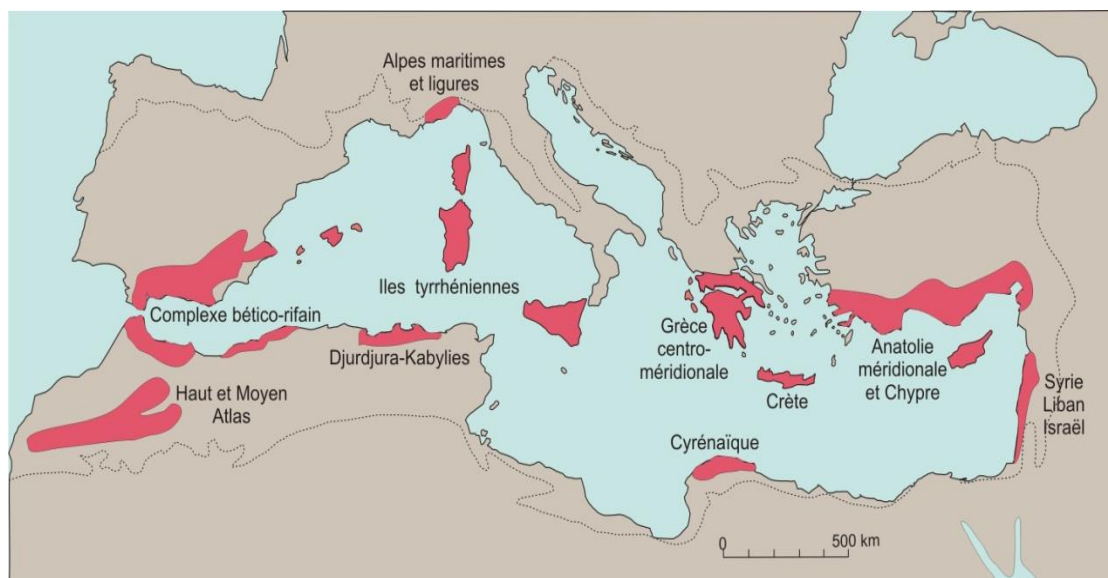


Figure 01 : Points-chauds (hotspots) régionaux de biodiversité végétale de la région méditerranéenne (Médail & Quézel, 1997).

Sur les 3139 espèces décrites par **Quezel et Santa (1963)** dans la nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, **Zeraia (1983)** dénombre 289 espèces assez rares, 647 rares, 640 très rares, 35 rarissimes et 168 endémiques. Le dénombrement aboutit à 1,07% espèces rarissimes, 20,23% d'espèces très rares et 19,23% d'espèces rares. Il apparaît ainsi que 40,53% (1286 espèces) de la flore algérienne est rare à très rare. Ce qui témoigne de l'urgence des actions de conservation selon l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture.

La répartition des espèces endémiques en Algérie est très irrégulière selon les familles ; les mieux partagées de ce point de vue sont les suivantes :

Tableau 01 : Principales familles botaniques à endémisme (Quezel, 1964)

Familles	Nombres d'espèces endémiques
Composées	42
Caryophyllées	25
Légumineuses	23
Labiées	22
Scrofulariacées	13
Crucifères	12
Plombaginacées	10
Graminées	10
liliacées	06

Les secteurs les plus remarquables pour l'endémisme sont la côte oranaise, suivie par la Petite Kabylie et la Grande Kabylie. En ce qui concerne les espèces rares, la Numidie littorale arrive en tête, suivie par la Mitidja d'Alger. Cet ensemble « Kabylies–Numidie–Kroumirie » forme un point chaud régional méconnu (**Vela et Benhouhou, 2007**). La famille des Labiées regroupe à elle seule 22 espèces endémiques dont *Thymus numidicus* Poiret

2. La famille des Lamiacées

- **Généralités**

La famille des lamiacées regroupe plus de 258 genres et 6900 espèces, plus au moins cosmopolites, mais particulièrement répandues depuis le bassin méditerranéen jusqu'en Asie centrale (**Judd et al., 2002**). La plupart des espèces de cette famille se concentrent dans les régions méditerranéennes comme le Thym, la Lavande et le Romarin (**Bruneton, 2001**), on les rencontre rarement dans le milieu forestier tropical ou au Sahara, exceptée dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar ou certaines espèces telles que *Marrubium deserti* et *Salvia aegyptica* prospèrent (**Ozenda, 2004**).

Les lamiacées ont tout d'abord été appelées Labiati par Tournefort en 1694, ce nom dérive du mot latin "labium" qui signifie lèvre, en raison de la forme particulière de leurs corolles qui sont fusionnées en une lèvre supérieure et une autre inférieure et qui imitent communément les lèvres d'un animal. Cette dénomination a été changée en Labiatae par B De Jussieu en 1759, puis Lindley introduit en 1839 l'appellation de Lamiaceae qui est le nom alternatif des labiées (**Carrick, 1977**).

La famille des Lamiacées regroupe un grand nombre de plantes aromatiques riches en métabolites secondaires qui sont prisés pour leur intérêt économique et leurs vertus thérapeutiques.

- **Description botanique**

Les lamiacées sont des plantes herbacées ou des sous-arbrisseaux, à racines rameuses et fibreuses, leurs tiges sont quadrangulaires renflées aux nœuds. La multiplication se fait par le biais de rejets aériens (stolon) ou rhizomes.

Les feuilles sont simples, opposées-décussées, parfois verticillées sans stipules, coriaces chez les espèces des régions semi-arides. Certaines espèces sont des xérophytes, adaptées à la sécheresse, ayant des feuilles dont les bords du limbe se replient sur l'épiderme inférieur avec des stomates qui se concentrent dans des creux protégés par d'abondants poils tecteurs, ce qui représente un signe d'adaptation permettant la diminution de la déperdition d'eau. On observe la présence de poils tecteurs allongés non glanduleux et de poils sécréteurs d'huiles essentielles ; l'essence élaborée s'accumule juste sous la cuticule qu'elle distend, ce qui fait qu'au moindre froissement, ces feuilles dégagent une forte odeur aromatique.

Les inflorescences sont généralement terminales, rarement axillaires, en panicules ou en racèmes, elles se situent à l'aisselle des feuilles supérieures.

Les fleurs sont zygomorphes, sous forme de pentamères hermaphrodites, dotées de calices à 5 sépales soudés en cloche ou en entonnoir, persistants et parfois accrescents autour du fruit.

La corolle est formée de 5 pétales, elle est nettement bilabée d'où le nom de la famille avec une lèvre inférieure trilobée et une lèvre supérieure bilobée.

L'androcée possède 4 étamines dépassant les pétales, ce sont les 2 étamines latéro-ventrales qui sont les plus développées. Les filets sont soudés au tube de la corolle mais peuvent aussi être concrets entre eux. Les anthères sont déhiscentes par des fentes longitudinales.

Le gynécée repose sur un disque nectarifère toujours présent, il est formé de 2 carpelles, soudés en un ovaire supère, originellement biovulé ensuite uniovulé par la constitution d'une fausse cloison, le style est le plus souvent gynobasique.

Enfin le fruit est un tétrakène diversement orné, formé de 4 nucules secs enveloppés par le calice (**Guignard et Dupont, 2004; Botineau, 2010**).

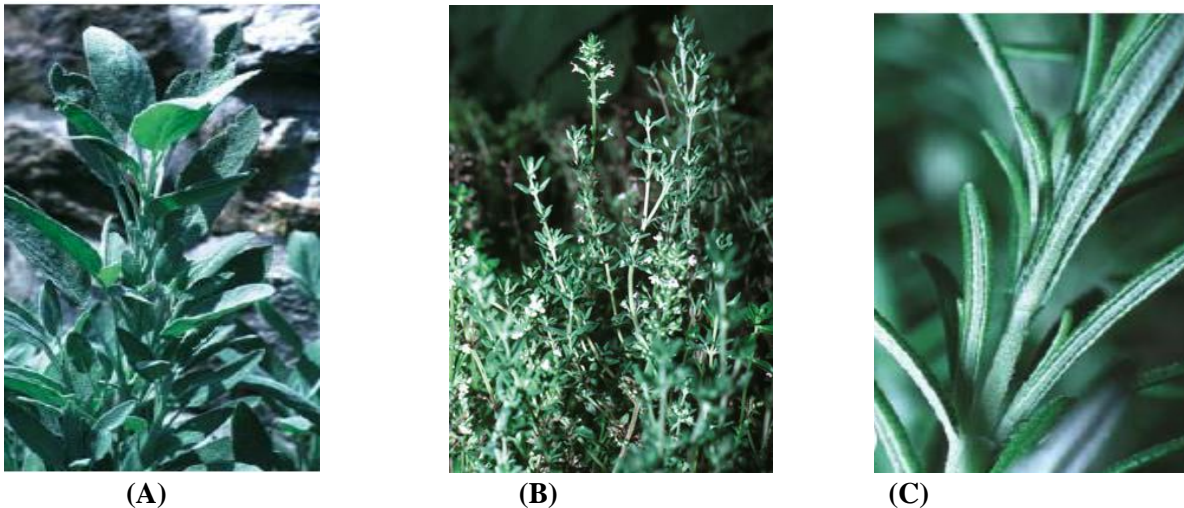


Figure 02 : Quelques espèces de la famille des lamiacées (A, *Salvia officinalis* ; B, *Thymus vulgaris* ;

C, *Rosmarinus officinalis*, Simpson, 2006)

2.1. Le genre *Thymus*

Le genre *Thymus* est un élément caractéristique de la flore méditerranéenne, il regroupe plus de 300 espèces, réparties essentiellement en Eurasie et en méditerranée (**Hussain, 2009**). Ce genre est très répandu dans le nord-ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d’Ethiopie et d’Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte.

Le genre *thymus* permet à lui seul d’illustrer la notion de chémotype, en effet il existe plusieurs races chimiques de thym dont la composition chimique de l’huile essentielle varie suivant le biotope dans lequel elles évoluent. L’impact des facteurs environnementaux se répercute incontestablement sur l’activité thérapeutique des huiles essentielles obtenues (**Zhiri, 2005**).

Les espèces de thym sont utilisées depuis l’antiquité pour leurs vertus stimulantes et toniques, elles sont recommandées contre les faiblesses organiques notamment celles du système nerveux (neurasthénie, dépression, apathie) et du système circulatoire. On leur attribue également des propriétés diurétiques, vermifuges, spasmolytiques, antioxydantes, régulatrices du cycle menstruelle, antivirales (prévient les récurrences d’herpès et de zona) et antiseptiques notamment pour lutter contre les affections respiratoires (rhumes, bronchites, angines, pneumonies, pleurésies), elles sont aussi utilisées pour calmer les toux quinteuses de la coqueluche et de l’emphysème (**Messegue, 1975 ; Alpin, 2005**).

2.2. *Thymus numidicus* Poiret

2.2.1. Description botanique

Thymus numidicus est un petit arbuste à tiges érigées haut de 5 à 6 pouces, qui se divise dès sa base en branches et en rameaux nombreux, garnis de feuilles linéaires, 2 à 5 fois plus longues que larges, presque sessiles, plus longues que les entrenœuds. Les fleurs sont petites, purpurines, réunies à l’extrémité des rameaux en épis courts, épais, et formant la tête ; leur calice est très velu. Cette plante croit dans les lieux arides et pierreux, en Barbarie (**Poiret, 1785 & 1786 ; Quezel & Santa, 1963**).

2.2.2. Position systématique (Guignard, 1994)

Règne : Planta

Phylum : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiaceae

Genre : *Thymus*

Espèce : *numidicus* Poiret

2.2.3. Répartition géographique

Thymus numidicus est une espèce endémique algérienne, que l'on retrouve dans le secteur de l'Atlas tellien, la grande et la petite Kabylie, au niveau du Tell constantinois et de Skikda à la frontière tunisienne.

3. Souches bactériennes tests

3.1. *Staphylococcus aureus*

3.1.1. Généralités

Le staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*, ce sont des bactéries Gram positif aéro-anaérobies facultatifs, ces cellules bactériennes ont la forme de coques regroupées en amas, ayant la forme d'une grappe de raisin, elles sont immobiles et non sporulées (Avril, 1992 ; Prescott, 2010).

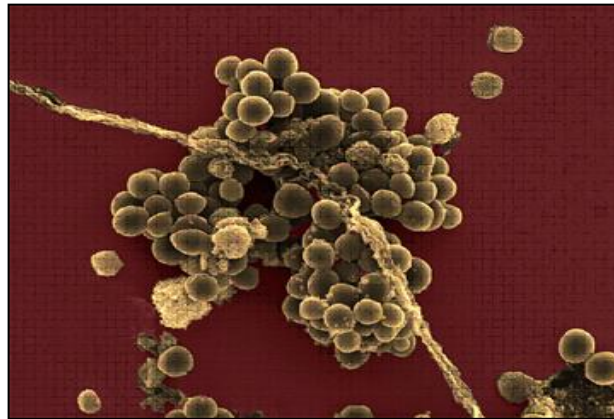


Figure 03: Observation microscopique de *Staphylococcus aureus* (Institut Pasteur, 2012)

3.1.2. Classification

Règne : Bacteria

Division : Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : *Staphylococcus*

Espèce : *aureus*

3.1.3. Habitat

L'espèce en question est ubiquitaire, et très répandue dans la nature. Elle peut être saprophyte ; retrouvée dans le sol, l'air, l'eau, mais aussi commensale de l'Homme, retrouvée sur la peau, les muqueuses, les cavités buccales et nasales, les plis cutanés, le périnée et le colon (50% des individus sont porteur de *S. aureus* dans la partie antérieure du nez et parfois du périnée). Cette souche se révèle être pathogène et opportuniste dans certains emplacements ou dans certaines circonstances, notamment chez des sujets immunodéprimés ou des personnes ayant subis des actes chirurgicaux.

Les souches de *S. aureus* se rencontrent également sur les aliments, ou elles peuvent élaborer des enterotoxines, leur offrant une résistance remarquable à de nombreux agents physiques et chimiques. Les traitements thermiques tels que la pasteurisation ou la stérilisation détruisent souvent le germe sans altérer les propriétés biologiques de ses protéines, c'est ce qui le rend parfaitement redoutable (**Larpent, 1997 ; Fauchère, 2002**).

3.1.4. Pouvoir pathogène

Les Staphylocoques dorés possèdent des pouvoirs pathogènes invasifs et toxiques, ces souches ont également la capacité de donner des mutants résistants aux antibiotiques de part leur habilité à s'approprier des éléments génétiques d'autres bactéries, ces éléments génétiques mobiles codent d'une part pour la résistance aux ATB et d'autre part pour des protéines qui augmentent la virulence bactérienne (coagulases). Les souches de *S. aureus* élaborent différentes sortes de toxines solubles dans l'eau qui ont la capacité de se fixer à la surface des cellules pour former des canaux hydrophiles laissant passer librement l'eau les ions et les petites molécules (**Prescott, 2010**).

Le Staphylocoque doré est responsable de lésions suppuratives et nécrotiques s'accompagnant de lésions veineuses (**Schachter, 1999 ; Fauchère, 2002**). Ces lésions apparaissent sous différents aspects cliniques :

- Infections cutanées suppuratives (furoncles, abcès, panaris, et anthrax qui évoluent entraînant des septicémies).
- Infections de la sphère ORL
- Infection des différents viscères

- Infection urinaires et génitales
- Infections respiratoires et pulmonaires
- Endocardites
- Intoxications alimentaires dues à l'ingestion de l'entérotoxine préformée dans les aliments (certains aliments contiennent une quantité négligeable de ce germe mais une mauvaise conservation favorise leur multiplication).
- Infection bucco-dentaires.
- Infections généralisés ; septicémies et méningites.

3.1.5. Résistance aux antibiotiques

S. aureus représente un problème majeur de santé de par sa multi-résistance. Habituellement résistant aux β -lactamines, ce germe produit des pénicillinases qui ouvrent le cycle β -lactame et inactivent l'antibiotique. Les aminosides peuvent aussi subir des modifications par divers enzymes staphylococciques conférant à cette espèce une résistance à de nombreux antibiotiques comme la gentamycine, l'amikacine ou encore la kanamycine (**Prescott, 2012**).

3.2. *Escherichia coli*

3.2.1. Généralités

Escherichia coli est l'espèce type des Enterobacteriaceae. Ce sont des bacilles Gram négatif à respiration aérobie-anaérobie, 70% d'entre eux possèdent un flagelle, ils peuvent donc être mobiles ou immobiles. Cette espèce représente un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud, son établissement dans le tractus s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent la naissance (**Avril, 1992 ; Prescott 2012**).

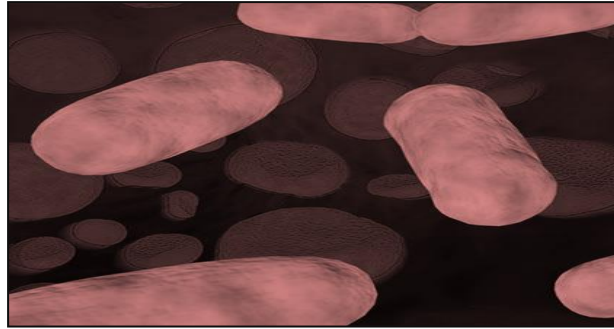


Figure 04: Observation microscopique d'*Escherichia coli* (Bioquell)

3.2.2. Classification

Règne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma proteobacteria

Ordre : Enterobacterales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Escherichia*

Espèce : *coli*

3.2.3. Habitat

E. coli a été découvert en 1885 par Théodore Escherich dans les selles de nourrissons, il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne anaérobie de l'intestin de l'Homme. Ce germe se rencontre aussi au niveau de diverses muqueuses. Sa présence dans le milieu environnant est un signe de contamination fécale (**Fauchère, 2002**).

3.2.4. Pouvoir pathogène

E. coli peut être un banal commensal ou un redoutable agent pathogène qui provoque des pathologies divers de type intestinal ou extra-intestinal. On reconnaît au moins 5 types de souches responsables d'infections intestinales, ces souches produisent des enterotoxines

de deux types ; des enterotoxines thermolabiles (LT) et les enterotoxines thermostables (ST), engendrant des gastro-entérites infantiles, des diarrhées aiguës avec déshydratation, des colites hémorragiques et des dysenteries.

Dans des localisations extra-intestinales, *E. coli* peut être responsable d'infections urinaires, hépatobiliaires, prostatiques et génitales (**Avril, 1992 ; Fauchère, 2002 ; Tortora, 2012**).

3.2.5. Résistance aux antibiotiques

Les souches d'*E. coli* sont généralement sensibles à la plupart des antibiotiques actifs sur les Gram négatif, elles ont néanmoins développé des résistances engendrées par des antibiothérapies abusives, de ce fait 40% des souches sont devenues résistantes aux amino-pénicillines, aux carboxy-pénicillines et à l'association amoxicilline-acide clavulanique par production de pénicillinases. Ce type de souches est non seulement pathogène mais peut aussi être un vecteur de transmission de gènes de résistance à d'autres bactéries (**Talon, 2004 ; Fred, 2006 ; Paterson, 2006**).

3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

3.3.1. Généralités

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* autrement connues sous le nom de bacilles pyocyaniques ont été isolées pour la première fois en 1882 par Gessard. Ce sont des bâtonnets à Gram négatif aérobie stricte. Ils sont fins, droits et très mobiles grâce à une ciliature polaire monotriche ou multitriche. Ces souches sont dépourvues de spores et de capsules et apparaissent la plupart du temps isolées ou sous forme de diplobacilles (**Schachter, 1999 ; Singleton, 1999**).

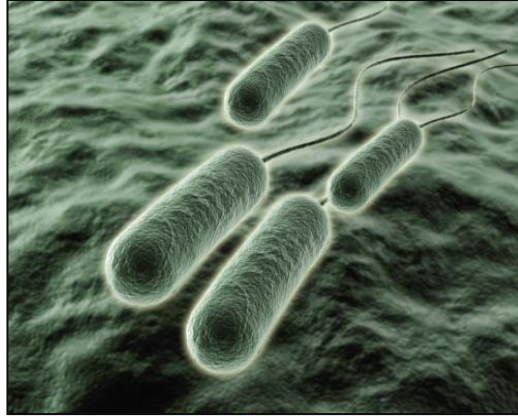


Figure 05 : Observation microscopique de *Pseudomonas aeruginosa* (Bioquell).

3.3.2- Classification

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Gamma proteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonaceae

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *aeruginosa*

3.3.3-Habitat

P. aeruginosa est un germe ubiquitaire, vivant dans les sols et en milieux humides (robinets, bouchons, éviers, surfaces des thermomètres buccaux...). Cette espèce peut vivre en commensale chez l'Homme au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur et du tube digestif, elle est également retrouvée chez les bovins et les volailles. *P. aeruginosa* est fréquent en milieu hospitalier entraînant l'apparition de véritables souches d'Hôpital, qui se développent même dans l'eau distillée ou salée, et nuisent aux personnes affaiblies et immunodéprimées. L'exploration instrumentale lors d'examens médicaux (cathéter

veineux, sondes, endoscopies) favorise la pénétration de ce germe dans l'organisme. (Fauchère, 2002 ; Prescott, 2012).

3.3.4. Pouvoir pathogène

Les infections par *P. aeruginosa* sont typiquement de type nosocomial. Cette espèce est porteuse de plusieurs plasmides et élabore différentes sortes d'enzymes et de toxines (exotoxines, endotoxines, protéases, hémolysines...etc). Les formes pathologiques qu'elle engendre sont divers (Verhoff et Schmitz, 2000 ; Tortora, 2012) :

- Infections pulmonaires
- Infections uro-génitales
- Infections ostéo-articulaires
- Infections oculaires
- Infections ORL
- Infections cutanées (cause majeure de mortalité chez les grands brûlés).
- Infections méningées
- Endocardites
- Entérites à bactéries pyocyaniques
- Septicémies.

3.3.5. Résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa est un germe très résistant aux antibiotiques, il produit naturellement une céphalosporinase qui malgré sa synthèse à faible échelle, lui confère une résistance naturelle aux céphalosporines. Ces souches s'adaptent rapidement aux attaques médicamenteuses, grâce aux caractéristiques de leurs porines qui régularisent le passage des molécules à travers la paroi cellulaire, c'est ainsi que les antibiotiques seraient pompés à l'extérieur de la bactérie avant même d'agir, elles sont aussi capable d'acquérir des gènes codant pour différentes sortes d'enzymes. Outre leur résistance aux β -lactamines, ces souches se montrent insensibles à l'action des fluoroquinolones et des aminosides (Kal et al., 2005; Tortora, 2012).

3.4. *Klebsiella pneumoniae*

3.4.1. Généralités

K. pneumoniae est un germe de la famille des entérobactériaceae. Ce sont des bacilles Gram négatif, aéro-anaérobie, immobiles et capsulés. Les colonies bactériennes sont volumineuses, bombées, brillantes et visqueuses, l'aspect visqueux est en étroite relation avec la capsule qui entoure ces souches (Avril, 1992 ; Fauchère, 2002).

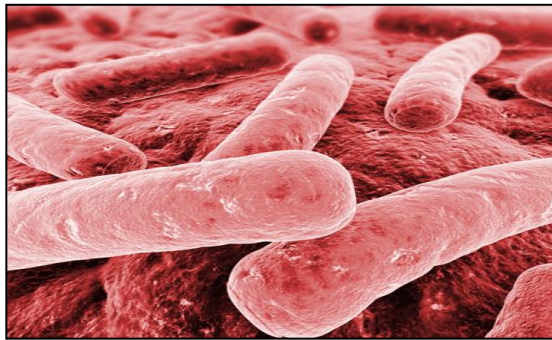


Figure 06 : Observation microscopique de *Klebsiella pneumoniae* (Bioquell)

3.4.2. Classification

Régne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma proteobacteria

Ordre : Enterobacterales

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : *Klebsiella*

Espèce : *pneumoniae*

3.4.3. Habitat

K. pneumoniae est une espèce ubiquitaire abondante dans le sol et les eaux, c'est également un germe commensal que l'on retrouve au niveau du tube digestif

et de l'appareil respiratoire des Hommes et des animaux. Ces souches sont opportunistes et deviennent pathogènes au sein d'un organisme fragilisé et immunodéprimé (diabétiques, opérées et personnes âgées) Elles sont fréquentes dans les selles et peuvent être signe d'une contamination fécale (Prescott, 2010).

3.4.4. Pouvoir pathogène

K. pneumoniae possède un grand pouvoir pathogène lié à plusieurs facteurs notamment à sa capsule qui la protège de la phagocytose et qui lui confère un grand pouvoir invasif. Outre sa capsule, cette espèce produit également des sidérophores, des lipopolysaccharides (LPS) et des adhésines lui permettant de produire un biofilm.

Ce germe cause de façon opportuniste un type grave de pneumonie, des infections nosocomiales de types respiratoires (abcès pulmonaires, pleurésies), intestinales et urinaires. (Tortora, 2012).

3.4.5. Résistance aux antibiotiques

Les souches de *K. pneumoniae* sont naturellement sécrétrices de pénicillinases chromosomiques de bas niveau ce qui les rend naturellement résistantes aux pénicillines A (amoxicilline), aux carbapénicilline et aux uréidopénicillines (ticarcilline, pipéracilline).

Comme toutes les Entérobactéries, ces espèces peuvent acquérir de nombreux mécanismes de résistances aux antibiotiques, elles hébergent notamment des plasmides la rendant résistantes aux céphalosporines et aux aminosides. Ce germe commence à se montrer résistant à l'imipénème par acquisition de gènes codant pour une métallo-béta-lactamase situés sur des intégrons (Fauchère, 2002).

3.5. *Acinetobacter spp*

3.5.1. Généralités

Les souches d'*acinetobacter* sont des coccobacilles, Gram négatif aérobie stricte. Ils sont courts, non sporulés parfois capsulés et immobiles (mais pouvant présenter

une mobilité par saccade résultant de la présence de fimbriae polaire), ils se présentent le plus souvent par paires (Avril, 1992 ; Fauchère, 2002)



Figure 07: Observation microscopique d'*Acinetobacter spp* (C.D.C)

3.5.2. Classification

Régne : Bacteria

Embranchement : Proteobacteria

Classe : Gamma proteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Moraxellaceae

Genre : *Acinetobacter*

Espèce : *spp*

3.5.3. Habitat

Acinetobacter spp est un germe ubiquitaire, saprophyte, présent dans l'environnement (eaux et sol) et tolérant parfaitement les milieux hostiles. Cette espèce est retrouvée chez l'Homme, au niveau de la peau, des muqueuses et du tube digestif et fait partie de la flore normale de 20 à 25 % des sujets sains, environ 30% du personnel hospitalier

en est porteur. La transmission manuportée semble avoir une importance majeure dans la dissémination des infections nosocomiales, mais aussi le matériel et les instruments hospitaliers (appareils d'assistance respiratoire, humidificateurs, tuyaux et sondes) (Guery, 2009 ; Tortora, 2012)

3.5.4. Pouvoir pathogène

Les souches d'*Acinetobacter spp* sont responsables de diverses infections opportunistes attribuées à leur propriété d'adhérence et à la production de plusieurs types de toxines, les pathologies qu'elles engendrent regroupent (Bergogne, 1996) :

- Infections urinaires et péritonites chez les sujets dialysés
- Infections oculaires suivant un traumatisme ou port de lentilles.
- endocardites
- méningites secondaires
- septicémies
- infections de la peau et des plaies
- pneumonies et infections des voies respiratoires

3.5.5. Résistance aux antibiotiques

Les souches d'*Acinetobacter spp* expriment plusieurs mécanismes de résistances aux ATB notamment l'inactivation enzymatique qui leur confère une résistance aux β -lactamines et aux céphalosporines mais aussi l'expression de systèmes d'efflux et la capacité de modifier la cible de l'ATB, leur permettant d'acquérir des résistances aux aminosides (gentamicine, tobramicine et amikacine) et aux quinolones (péfloxacin, ofloxacin et ciprofloxacine) (Guery, 2009).

PARTIE II : Les huiles essentielles

1. Généralités

La norme **AFNOR** (Association Française de Normalisation) définit les huiles essentielles comme étant des produits généralement odorants, obtenus à partir de la matière première naturelle par distillation à l'eau ou par entraînement à la vapeur, ou encore par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des *Citrus*, elles seront ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques. Vu le caractère restrictif de cette définition qui exclut les produits obtenus par d'autres procédés d'extraction, une définition plus globale a été proposée, selon la pharmacopée française ; les huiles essentielles seraient des produits de composition généralement complexe, renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. (**Bruneton, 1993**).

Les plantes produisent beaucoup de métabolites secondaires, certains d'entre eux sont toujours présents, tandis que d'autres sont synthétisés en réponse à une agression externe (**Roller, 2003**). Les HE font partie de ces métabolites secondaires qui assurent divers rôles fonctionnels au sein de la plante. Elles représentent un élément de communication chimique, (**Bruneton, 1999**), elles ont d'une part un effet attractif favorisant la pollinisation et d'autre part un effet répulsif pour la protection contre les herbivores, elles ont également un effet toxique sur la germination des espèces qui partagent le même espace (**Chouiteh, 2012**). Elles ont même un rôle dans l'inhibition de la germination des organes infectés ou la croissance des agents pathogènes issus de ces organes. (**Nicholas, 1978**). Il semblerait aussi que les HE aient un rôle dans la mobilisation d'énergie lumineuse et la régulation thermique, car elles réguleraient la transpiration diurne en absorbant les rayons ultraviolets (**Croteau, 1986**).

A ce jour, 3000 huiles essentielles sont connues, seulement 300 d'entre elles sont commercialisées (**Burt, 2004**).

2. Constituants :

Les constituants des HE sont des composés organiques à faible poids moléculaire, ils sont divisés en 4 groupes en fonction de leurs structures chimiques, on distingue : les terpènes, les terpenoïdes, les phenylpropenes, et autres.

2.1. Les terpènes :

Les terpènes sont des hydrocarbures formés à partir d'unités isopréniques (C_5H_8)_n. En général, seuls les terpènes de faible poids moléculaire (de 10 à 20 atomes de carbone) sont retrouvés dans les huiles essentielles. A noter les monoterpènes, composés de 2 unités d'isoprènes ($C_{10}H_{16}$) et les sesquiterpènes formés de 3 unités isopréniques ($C_{15}H_{24}$). Quelques diterpènes ($C_{20}H_{32}$) peuvent être retrouvés dans les huiles essentielles, cela reste tout de même exceptionnel. (Bakkali et al., 2008 ; Bruneton, 2008).

Les terpènes retrouvés dans les huiles essentielles dérivent de l'acide mévalonique, lui-même obtenue à partir du métabolisme des sucres après formation de l'acétyl coenzyme A.

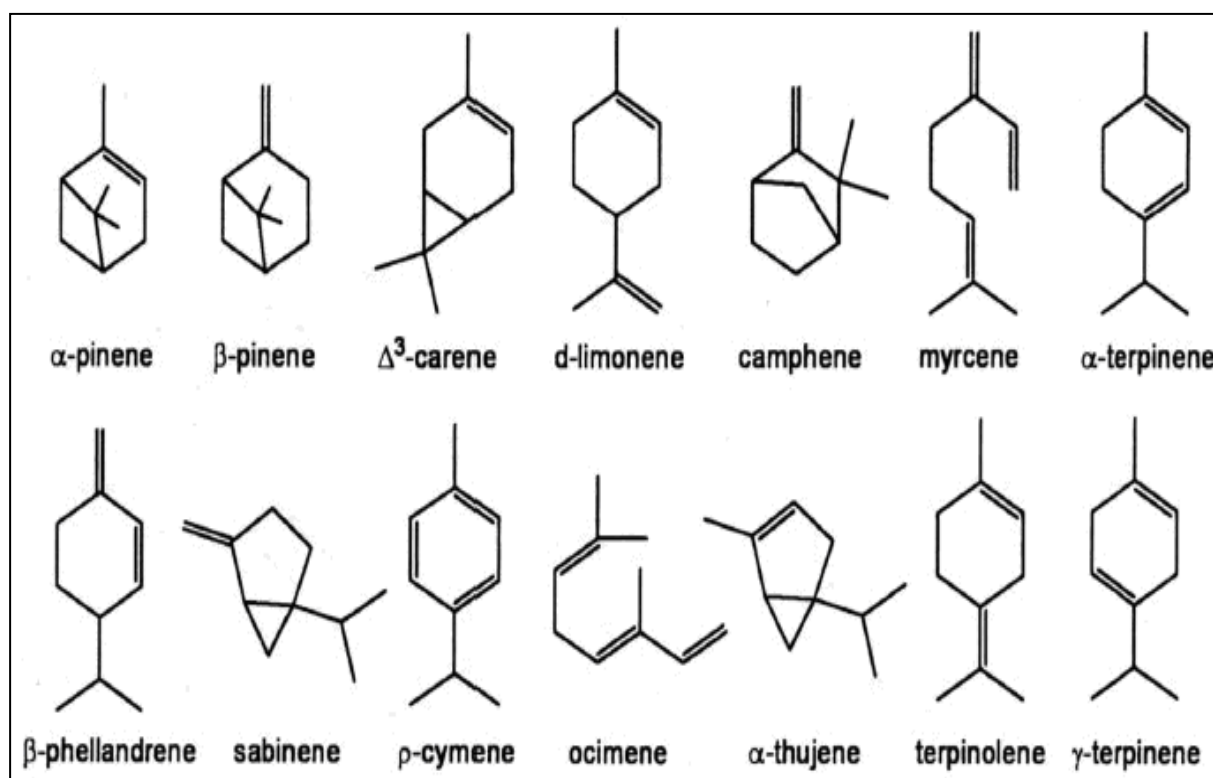


Figure 08 : Structure chimique de quelques monoterpènes (Mann J., 1987)

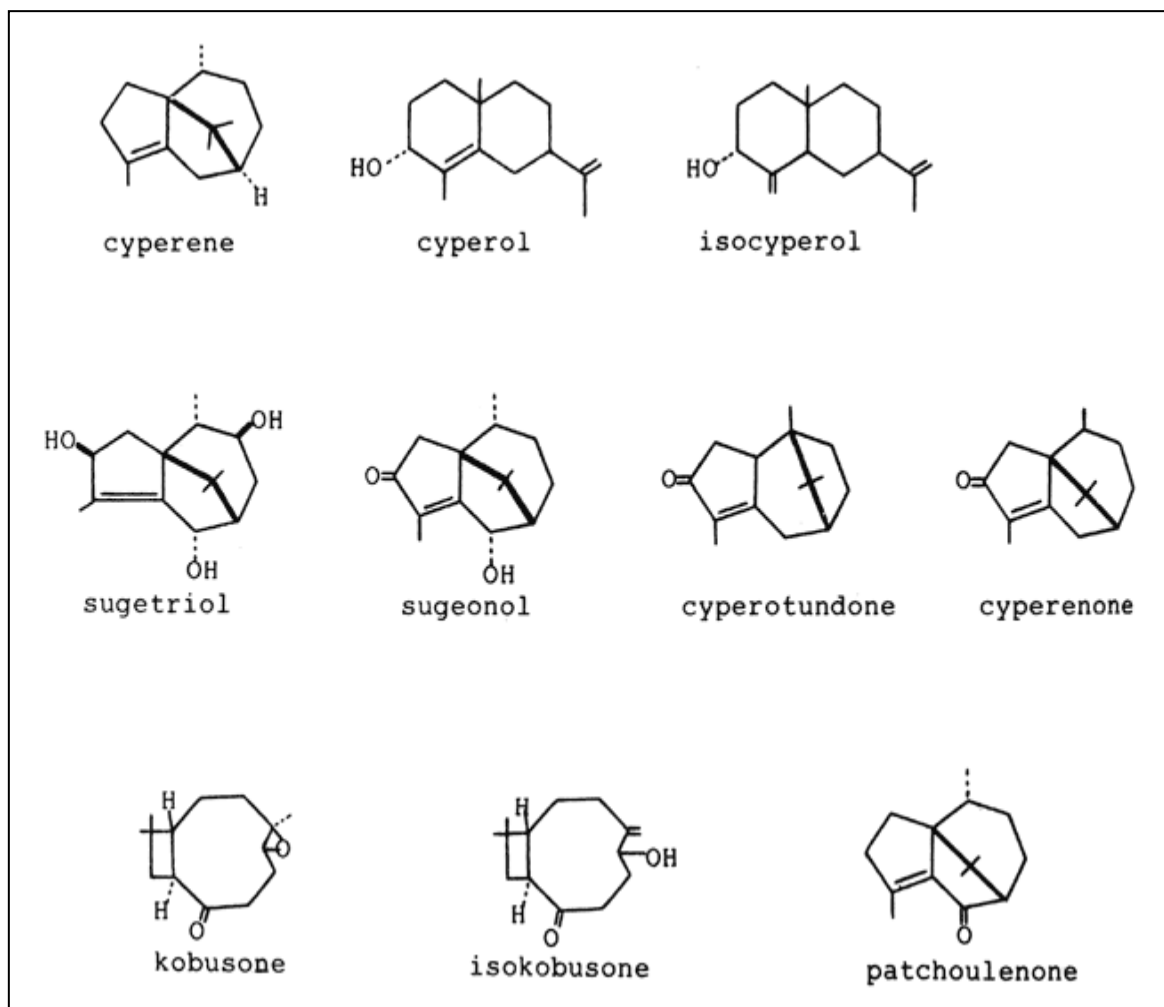


Figure 09 : Structure chimique de quelques sesquiterpènes (Mann J., 1987)

2.2. Les terpénoïdes :

Les terpénoïdes sont des terpènes qui ont subi des modifications enzymatiques par addition d'un atome d'oxygène (**Caballero, 2003**), ils peuvent être regroupés en alcools, esters, aldéhydes, cétones, éthers, phénols (ex de terpénoïdes : thymol, carvacrol, linalool, menthol, géranol. linalyl acétate).

L'activité antibactérienne des terpénoïdes est en rapport avec leurs groupements fonctionnels et la délocalisation d'électrons (**Hyldgaard et al., 2012**)

2.3. Les phénylpropènes :

Les phénylpropènes constituent une famille parmi celle des phénylpropanoïdes et qui sont synthétisés à partir du phénylalanine, ils détiennent leur nom des six carbones aromatiques phénol et des 3 carbones propène produits lors de la première étape de la biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ils représentent un petit pourcentage au sein des HE, ceux qui ont été les plus étudiés sont l'eugénol, isoeugénol, safrol, vanillil et le cinnamaldéhyde (**Hyldgaard et al., 2012**).

2.4. Autres constituants :

Les huiles essentielles contiennent différents produits de dégradation comme des acides organiques de faible poids moléculaire, des lactones et des produits azotés ou soufrés. (**Caballero, 2003**), les plus connus sont l'allicin et l'allyl isothiocyanate.

Chacune de ces classes chimiques possède un rôle spécifique, les esters et les aldéhydes ont un effet relaxant et calmant, les cétones sont des stimulants de la régénérescence cellulaire, les terpènes sont des inhibiteurs de l'accumulation des toxines dans le corps, ils ont aussi des propriétés stimulantes et antibactériennes. Les acides et les alcools possèdent des propriétés antimicrobiennes et enfin les phénols ; considérés comme les produits les plus bénéfiques contiennent des taux élevés de molécules oxygénantes à activité antioxydante (**Ghanmi et al., 2010**).

3. Propriétés physico-chimiques :

Les huiles essentielles possèdent des propriétés physico-chimiques qui les distinguent des autres molécules ; elles sont liquides à température ambiante, incolores ou jaunes pâles exceptées l'HE d'Azulène qui est bleu, celle de la Cannelle qui est rougeâtre et celle de l'Absinthe qui est verte. Leur densité est généralement inférieure à 1 à l'exception des huiles essentielles de cannelle, giroflier et saffras. Ces composés sont insolubles dans l'eau mais solubles dans les alcools, les huiles fixes et la plupart des solvants organiques, ils possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont donc dotés de pouvoirs rotatoires. Leur point d'ébullition dépend des liaisons van der Waals, qui croit avec la masse moléculaire, la plasticité et la polarisabilité de la molécule. (**Baser et Buchbauer, 2010**).

Du point de vue chimique les huiles essentielles sont tributaires de plusieurs indices notamment l'indice d'acide, l'indice d'ester ou encore l'indice de saponification.

Le grands désavantages des HE est qu'elles soient altérables et très sensibles à l'oxydation, elles ont tendance à polymériser et à former des produits résineux, elles sont donc de conservation limitée (**Bruneton, 1993**).

4. Localisation dans la plante :

Les HE n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, elles sont particulièrement abondantes chez certaines familles comme les Conifères, les Lamiacées, les Myrtacées, les Rutacées et les Ombellifères.

Les huiles essentielles sont synthétisées normalement par des cellules sécrétrices qui contiennent de la chlorophylle, elles sont ensuite transportées lors de la croissance de la plante vers d'autres parties ; bois, fruits, écorce, racines, graines. Elles peuvent donc être stockées dans tous les organes de la plante. La synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont associées à des structures histologiques spécialisées, qui sont souvent localisées sur ou à proximité de la surface des cellules ou des organes. Ces structures sont spécialement différenciées et variables d'une famille botanique à l'autre. (**Haddouchi, 2008**). On peut donc localiser les HE au niveau des :

- Cellules sécrétrices regroupant des cellules épidermiques et des cellules internes retrouvées au niveau du parenchyme cortical, du liber et du bois. Ces structures sont observées chez les Lauracées, les Magnoliacées et les Pipéracées.
- Organes sécréteurs regroupant les poches sécrétrices observées chez les Myrtacées, les poils excréteurs chez les Lamiacées et Géraniacées et enfin les canaux sécréteurs chez les Conifères et les Ombellifères (**Bruneton, 1999 ; Svoboda et Hampson, 2003**).

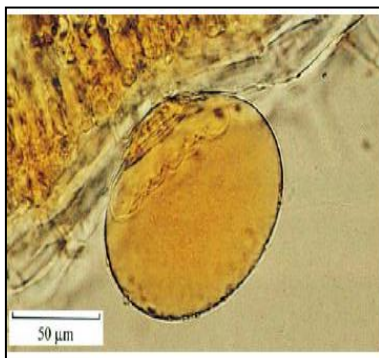


Figure 10 : Poche sécrétrice dans *O. dictamnus* (Langhammer L., 1986)

5. Procédés d'extraction

La diversité et la complexité des huiles essentielles rendent le choix des processus d'obtention délicat. La méthode choisie ne doit pas conduire à la discrimination entre les composés polaires et apolaires, ni induire de réactions biochimiques, de dégradations thermiques, d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse, de changement de pH ou entraîner une perte de composés volatils. Il est donc impératif d'adapter à chaque classe botanique la technique qui lui convient (**Bousbia, 2011**). Les procédés d'extraction les plus utilisés (**Willem, 2002 ; Zhiri, 2005**) sont les suivants :

5.1. L'hydrodistillation

C'est sans doute le procédé chimique le plus ancien, en effet il a été importé en Europe par les Arabes entre le VIII^{ème} et au le X^{ème} siècle, mais le principe était déjà connu et utilisé par les Egyptiens au IV^{ème} siècle après J.C. Cette technique est facile à réaliser ; la partie de la plante contenant la molécule à extraire est placée dans un ballon avec de l'eau et quelques pierres ponce pour assurer le brassage de la solution, en chauffant, l'eau s'évapore entraînant avec elle les molécules aromatiques, l'eau se condense en passant par le réfrigérant, elle est ensuite récupérée dans un Erlenmeyer ou on distingue clairement deux phases : une phase aqueuse et une phase organique qui seront transférées dans une ampoule à décanter pour éliminer l'eau, il ne restera alors que l'huile essentielle.

5.2. L'entraînement à la vapeur d'eau :

Ce procédé consiste à placer la matière végétale dans une cuve et faire traverser celle-ci par de la vapeur d'eau, à la sortie de la cuve et sous pression contrôlée, la vapeur d'eau enrichie en huile essentielles traverse un serpentin ou elle se condense, un essencier appelé autrefois vase florentin récolte l'eau et l'huile essentielle, la différence de densité entre ces deux liquide permet une séparation aisée.

5.3. L'extraction par solvant organique

L'hydrodistillation et l'entraînement à la vapeur d'eau ont été infructueux avec certaines plantes comme la rose, le narcisse ou encore le mimosa, qui sont trop fragiles pour supporter ces procédés, c'est ce qui a poussé les chercheurs à mettre au point de nouvelles méthodes d'extraction. Ainsi dès le XVIII^{ème} siècle, des tentatives ont été menées en utilisant un solvant ; l'éther. Cette trouvaille a été très vite abandonnée a cause des couts

de production et des risques d'explosion liés au solvant. Ils optèrent par la suite pour l'hexane et le benzène en raison de leur volatilité et de leur grand pouvoir de solubilisation

5.4. L'expression

Cette méthode est consacrée à l'extraction des huiles essentielles des agrumes de la famille des Rutacées (citron, orange, mandarine), elle consiste à faire éclater mécaniquement les poches à essences (abrasion, perforation) pour recueillir un mélange d'essences odorantes et d'eau.

5.5. L'enfleurage

Cette technique se rapproche par son principe de l'extraction par solvant volatil, mais cette fois-ci on utilise des graisses comme solvants, car elles ont aussi une forte affinité pour les composés odorants.

5.6. L'extraction au CO₂ supercritique

Cette méthode utilise le CO₂ pour dissoudre de nombreux composés organiques, le CO₂ doit obligatoirement se trouver entre l'état liquide et l'état gazeux, il est donc exposé à une forte pression et à une température avoisinant les 32°C. Cette technique est très prometteuse car le produit obtenu est proche du naturel sans aucune trace de solvant. Le CO₂ a aussi l'avantage d'être inodore, incolore et ininflammable, ce qui assure des conditions de sécurité supérieures.

5.7. La distillation fractionnée

Ce type de distillation est surtout utilisé en parfumerie, elle permet d'isoler un ou plusieurs constituants de l'huile essentielle, ils seront utilisés par la suite tels qu'ils sont pour renforcer l'effet olfactif, ou transformés pour obtenir une nouvelle odeur.

6. Critères de qualité des huiles essentielles

Pour définir l'action thérapeutique d'une huile essentielle, l'aromathérapie scientifique exige une connaissance parfaite de la classification botanique des plantes aromatiques, une connaissance précise de leurs constituants chimiques et une maîtrise rigoureuse des précautions d'utilisation (dosage, posologie, mode d'emploi et contre-indications

éventuelles). L'obtention d'une huile essentielle de qualité thérapeutique est donc un processus particulièrement délicat car celle-ci doit impérativement répondre à de nombreux critères de qualité (Zhiri, 2005).

- **La certification botanique :**

L'appellation de la plante doit préciser le genre, l'espèce, la sous-espèce et le cultivar afin d'empêcher toute erreur issue des noms vernaculaires (Ex.: *Aniba. rosaeodora* var. *amazonica*).

- **L'origine géographique :**

Le nom du pays ou d'une région apporte des précisions intéressantes sur le biotope de la plante aromatique et caractérisera sa composition biochimique particulière.

- **Le mode de culture :**

Cette précision permet de distinguer les plantes sauvages des plantes cultivées ou issues de cultures biologiques (label BIO).

- **Le stade de développement botanique :**

Les caractéristiques des chémotypes dépendent parfois du stade de développement de la plante (cueillette avant, pendant ou après floraison).

- **L'organe distillé** (ou exprimé pour les zestes de Citrus uniquement) :

La composition biochimique des huiles essentielles varie en fonction de la partie ou organe de la plante distillée.

- **Le mode d'extraction :**

La composition des huiles essentielles peut varier selon le mode d'extraction utilisé (distillation, hydrodistillation, expression...etc).

- **Le chémotype ou chimiotype :**

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse indique les molécules élémentaires et fondamentales de l'huile essentielle et assure une meilleure utilisation de celle-ci.

7. Intérêt

Dans le domaine médicale, le rôle des HE est devenu indéniable puisqu'elles sont utilisées dans le traitement de divers pathologies, Les HE ont été tout d'abord reconnues pour leurs propriétés antibactérienne par de La Croix en 1881 (**Burt, 2004**) plus tard elles se sont révélées dotés de pouvoirs antiparasitaires (**George et al., 2009**), insecticides (**Kim et al., 2003**), antiviral (**Astani et al., 2011**) antifongique (**Silva et al., 2011**) et antioxydant (**Brenes et Roura., 2010**). On leur attribue également des pouvoirs antispasmodiques, diurétiques, expectorants, cicatrisants et sédatives, elles ont également une action antitoxique, antivenimeuse et anticancéreuse (**Valnet, 2005 ; Haddouchi, 2008**).

Les HE sont largement utilisées dans le domaine agro-alimentaire, elles rentrent dans la composition de plusieurs aliments notamment les soupes, les sauces et les boissons non alcoolisées. Elles sont aussi utilisées en boulangeries et confiseries et rentrent même dans la composition des aliments destinés aux animaux. Elles sont utilisées dans le stockage et la conservation des denrées alimentaires.

Les HE sont aussi exploitées par les industries cosmétiques ou elles sont utilisées dans la fabrication de parfums, baumes, crèmes et produits hygiéniques.

Matériel et méthodes

1. Biotope du Thym de Numidie

Thymus numidicus a été récolté au mois d'Avril de l'année 2011, dans la région de Berrahal. L'espèce a été identifiée au laboratoire de Botanique de la Faculté de Médecine d'Annaba.

Berrahal est située dans la wilaya d'Annaba à l'extrême Est algérien à une Latitude de 36°50'07" Nord et une Longitude de 7°27'11" Est et à une altitude par rapport au niveau de la mer égale à 30 m.



Figure 11 : Situation géographique de la région de Berrahal (Google Earth)

1.1. Climat

Toute espèce végétale a des exigences vis-à-vis du climat au sein duquel elle évolue. Celles-ci se traduisent par un certain nombre de besoins climatiques, entre autres des besoins thermiques pour l'accomplissement de son développement et des besoins en eau pour sa croissance essentiellement.

Pour connaître certaines de ces exigences, nous avons collecté les données climatiques de la région de Berrahal, en se basant sur les trois facteurs climatiques les plus impliqués dans la répartition des végétaux. Les paramètres étudiés sont : la température moyenne en °C, la pluviométrie en mm et l'humidité en %, et ce durant la période 2010-2014. Ces données émanent de la station météorologique Rabah Bitat d'Annaba.

Afin de caractériser le climat de la région de Berrahal, nous avons réalisé un diagramme ombrothermique. Pour **Bagnouls et Gaussen (1953)**, la sécheresse n'est pas nécessairement l'absence totale des pluies, elle se manifeste quand de faibles précipitations se conjuguent avec de fortes chaleurs. **Gaussen (1953)** considère un mois sec lorsque le total mensuel des précipitations exprimé en mm est égal ou inférieur au double de la température mensuelle exprimée en degrés Celsius, d'où la formule :

$$P < 2T$$

Sachant que :

- P = précipitations moyennes du mois en mm
- T = température moyenne du même mois en °C.

Pour visualiser ces derniers, Gaussen (1953) propose une méthode qui consiste à porter sur un même graphe la température et la pluviométrie de sorte que l'échelle des températures soit le double de celle des précipitations: 1 °C = 2 mm. Le diagramme est tracé en portant en abscisses les mois, en ordonnées à droite l'échelle des précipitations et en ordonnées à gauche les températures.

1.2. Exigences pédologiques

Le sol est un support extrêmement complexe où se déroulent simultanément une multitude d'interactions physiques, chimiques et biologiques. C'est à ce niveau que l'eau, les minéraux et les oligo-éléments essentiels à la croissance de la plante sont assimilés. Pour mieux apprécier l'environnement où l'espèce étudiée se développe, un échantillon du sol de la région de Berrahal a été soumis à des analyses au niveau du laboratoire d'étude des sols d'ASMIDAL, portant sur les paramètres suivants :

1.2.1. Détermination de la texture

La texture du sol fait référence à la taille et à la proportion des particules minérales dont il est composé, plus spécifiquement à la proportion de sable, de limon et d'argile qu'il renferme. C'est l'une des propriétés physiques fondamentales du sol puisqu'elle a une incidence directe sur sa teneur en nutriments, son humidité et sa capacité de drainage. (**Richer de Forges A., 2008**).

Dans la présente étude, la classe texturale du sol a été déterminée par la méthode de **Gaucher (1968)** dite méthode de saturation, elle consiste à mesurer le pourcentage d'humidité du sol et à le comparer à une échelle qui détermine la texture lui correspondant (Tab.02). Pour cela, 50 g de sol ont été imbibés d'eau, goutte à goutte, puis mélangés jusqu'à l'obtention d'une pâte qui glisse une fois le récipient incliné. Après avoir noté le poids du sol imbibé d'eau, l'échantillon a été porté à l'étuve à 105°C pendant 24h pour dessiccation. Le pourcentage d'humidité a été déterminé par la formule suivante :

$$Y = X_1/X_2 \times 100$$

Sachant que

- X_1 = poids du sol mouillé - poids du sol sec.
- X_2 = poids du sol sec.

Tableau 02: Classification des sols selon leur taux d'humidité (**Jamagne, 1980**)

Pourcentage d'humidité	Texture
<12	Sableuse
12-24	Sablo-limoneuse
24-37,5	Limono-sableuse
37,5-45	Limono-argileuse
45-75	Argilo-limoneuse
>75	Argileuse

1.2.2. Détermination du pH

Le pH influence directement l'assimilabilité des éléments nutritifs par le couvert végétal. Il joue un rôle essentiel dans l'activité microbologique du sol, dans l'approvisionnement des plantes en eau et dans l'absorption des nutriments par les racines.

La détermination du pH se base sur la mesure de la concentration en ions hydrogènes présents dans une solution aqueuse de sol, permettant d'évaluer l'acidité ou l'alcalinité du celui-ci. Afin de déterminer cette valeur, une suspension de sol a été préparée en ajoutant 5 g de sol à 25 ml d'eau distillée à $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (rapport sol/eau = 1/5). Après une agitation de 30 min, et un temps de repos de 2h environ, la mesure du pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre (CRISON GLP 21). La valeur ainsi obtenue a été comparée à des valeurs de référence (Tab.03)

Tableau 03 : Classification des sols selon leur pH (Gauchers et Soltser, 1981)

pH	Désignation des sols
3-4,5	Extrêmement acide
4,5-5	Fortement acide
5-5,5	Très acide
5,5-6	Acide
6-6,75	Faiblement acide
6,75-7,25	Neutre
7,25-8,5	Basique
>8,5	Très basique

1.2.3. Détermination de la conductivité

La conductivité représente le degré de salinité d'un sol, elle traduit la capacité d'une solution aqueuse à conduire le courant électrique. Dans la présente étude, une suspension de sol a été préparée en ajoutant 5g de sol à 25 ml d'eau distillée stérile (rapport sol/eau=1/5). La suspension a été filtrée, puis 50 ml du filtrat clair ont été récupérés pour analyse. La conductivité a été mesurée sur le filtrat clair à l'aide d'un conductimètre, elle a été lue à 25°c et les valeurs obtenues (en ms/cm) ont été comparées à des valeurs de référence (Tab.04).

Tableau 04: Echelle de la conductivité électrique des sols (U.S.S.L.S, 1954)

Salinité (mS /cm)	Salure
0-0,6	Non salé
0,6-1,4	Peu salé
1,4-2,4	Salé
2,4-6	Très salé

1.2.4. Mesure de la matière organique :

La matière organique contenue dans l'échantillon de sol a été déterminée par la méthode d'ANNE (1945), le principe étant de procéder à une oxydation de l'échantillon de terre préparé pour essai, par une quantité en excès de dichromate de potassium en milieu sulfurique à température contrôlée.

Pour la réalisation de ce dosage, 1g de sol a été traité par 10 ml de bichromate de potassium (à 8%) et 15 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation, le mélange a été placé dans le bloc de minéralisation (DIGIPREP P) stabilisé à 135°C, qui assure la transformation et la décomposition de la matière organique que le sol renferme aboutissant à la libération de substances minérales.

Le dosage de la quantité de bichromate de potassium qui n'a pas réagi avec l'échantillon permet d'établir la concentration de carbone organique total, il est réalisé par titration aux sels de Mohr (appareil titrateur metrohm).

L'excès de bichromates de potassium non réduit est titré par une solution de sel de Mohr en présence de diphénylamine dont la couleur passe du bleu foncé au bleu vert. La quantité réduite lors de la réaction est en principe proportionnelle à la teneur en carbone organique, qui est calculée selon la formule suivante :

$$\% C : 3T \times (V_0 - V) \frac{1000 \times F}{M} \times 100$$

Sachant que :

- T : titre exact de la solution titrante
- F : facteur de dilution (=1)
- M : prise d'essai en g
- V_O : la moyenne des trois mesures de blancs
- V : volume de l'échantillon

La teneur en matière organique est évaluée par l'application d'un coefficient multiplicatif (1,724) à la teneur en carbone ainsi obtenu.

$$\text{MO} = \% \text{ C} \times 1,724$$

Tableau 05: Classification des sols selon leur teneur en matière organique (Soltser, 1981)

Matière organique (%)	Appréciation
<1	Extrêmement faible
1-1.5	Très faible
1.5-2.5	Faible
2.5-3.5	Moyen
3.5-4.5	Moyennement élevé
4.5-5	Elevé
>5	Très élevé

1.2.5. Dosage des cations échangeables.

La capacité d'échange cationique fait référence à la capacité du sol à retenir et à échanger des éléments nutritifs facilement disponibles pour les plantes.

Les méthodes utilisées pour le dosage des cations échangeables reposent toutes sur le même principe ; c'est le déplacement des cations contenus dans l'échantillon de sol par une solution mono-ionique, saturation de l'échantillon par le cation de cette solution puis

déplacement et dosage de ce cation par colorimétrie, sachant que l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du cation à doser. Les agents de déplacement possibles sont nombreux mais la méthode la plus utilisée est celle de Schollenberger utilisant l'acétate d'ammonium qui complexe le calcium et la 8-hydroxyquinoléine qui complexe le magnésium (Pelloux, 1971).

Pour la réalisation de ce dosage, l'échantillon de sol à tester a été ajouté à une solution contenant un mélange d'acétate d'ammonium et de 8-hydroxyquinoléine. L'ensemble a été agité puis laissé reposer 45 min environ avec des agitations intermittentes, le liquide surnageant a été ensuite filtré par décantation. Après dialyse des deux extraits, les dosages ont été ensuite effectués par colorimétrie en utilisant des indicateurs colorés, soient le crésolphtaléine complexone pour le calcium et l'EGTA pour le magnésium. L'intensité des complexes formés a été mesurée respectivement à 590 et 505 nm sur l'auto analyseur SKALAR (Dabin, 1967 ; INRA 2000).

Le potassium et le sodium ont été dosés par photométrie à flamme. Les solutions de sol contenant les cations à doser ont été pulvérisées au moyen d'un atomiseur; les gouttelettes ont été injectées dans une flamme de gaz butane et l'intensité de l'émission lumineuse a été mesurée au moyen d'une cellule photo-électrique.

1.2.6. Dosage du phosphate :

Le dosage du phosphate a été réalisé par technique colorimétrique selon la méthode de Murphey et Riley (1962).

Afin de réaliser l'analyse, l'extrait de sol a été traité par l'heptomolybdate d'ammonium et l'antimoine 3 potassium oxyde tartrate, ces réactifs réagissent en milieu acide pour former un complexe antimoine-phosphate- molybdène, de couleur jaune. Le complexe obtenu a été ensuite réduit par l'acide ascorbique à 40 °C, la couleur du complexe vire alors au bleu foncé. La concentration en orthophosphate a été ensuite dosée et lue à 880 nm par un auto analyseur SKALAR.

1.2.7. Estimation de la qualité trophique du sol

En absence d'études dévoilant les exigences écologiques exactes de cette espèce. Nous avons jugé utile de déterminer quelques caractères capables de traduire la qualité trophique du milieu où se développe le Thym de Numidie. Il s'agit de " la surface foliaire spécifique " ou SLA (Specific Leaf Area) ; le " rapport de masse de matière sèche par unité de matière fraîche " ou LDMC (Leaf Dry Matter Content) (**Hodgson et al., 2011**) et " le rapport biomasse racinaire/biomasse aérienne " .

- La surface foliaire de la plante représente la somme des surfaces de chacune de ses feuilles (**Ruget et al., 1996 ; Maillard et Bonhomme, 1998**), son estimation a été réalisée sur 60 échantillons de feuilles prises au hasard, dont les longueurs et les largeurs maximales ont été mesurées (Annexe 01). Pour ce qui est des plantes non ligulées comme notre espèce, la surface foliaire est définie par la formule suivante:

$$SF = L \text{ max (mm)} \times L \text{ max (mm)} \times 0,5$$

- La SLA représente la surface spécifique foliaire, elle est définie par la formule suivante :

$$SLA = \text{Surface Foliaire (mm}^2\text{)} / \text{masse de la matière sèche (mg)}$$

- L'LDMC représente le rapport de la masse foliaire sèche sur la masse foliaire fraîche, elle est exprimée par la formule qui suit :

$$LDMC = \text{Masse de la matière sèche (mg)} / \text{masse de la matière fraîche (mg)}$$

La SLA et la LDMC sont des traits importants de l'écologie végétale, car ils sont associés à de nombreux aspects essentiels de la croissance des plantes et de leur survie (**Garnier et al., 2001**). La SLA définit "l'épaisseur" des feuilles et revêt une signification écologique, physiologique et agronomique particulière. Selon certaines théories, toutes les réponses des plantes aux variations internes ou externes sont intégrées dans la SLA (**Charles-Edward, 1981**). Les plantes des milieux oligotrophes ont des feuilles de petite taille mais assez

épaisses, elles ont une faible SLA et une LDMC élevée, ces deux paramètres sont donc inversement proportionnels.

- Le rapport biomasse racinaire/ biomasse aérienne permet de déterminer si les besoins de la plantes en azote sont assurés. L'azote joue un rôle essentiel dans la synthèse de la matière vivante à partir de la matière minérale. Il est l'un des principaux constituants de la chlorophylle et des protéines.

Les végétaux qui se développent sur un substrat déficient en azote sont en général de petite taille et vont concentrer leur énergie surtout sur l'appareil racinaire. Le rapport biomasse racinaire/ biomasse aérienne y est supérieur à 1.

2. Prédpositions adaptatives

Les espèces végétales établissent diverses stratégies adaptatives afin de contourner les contraintes climatiques et environnementales auxquelles elles sont exposées. Pour déterminer celles qui sont établies par notre espèce nous avons déterminé les caractères suivants :

2.1. Type biologique

Les types biologiques sont considérés comme une expression de stratégie d'adaptation de la flore aux conditions du milieu. **Raunkiaer (1934)** définit les types biologiques en combinant les contraintes majeures de l'environnement. La méthode s'appuie principalement sur l'adaptation de la plante à la saison défavorable et met l'accent sur la position des bourgeons hibernants par rapport à la surface du sol, en s'efforçant de classer ensemble les plantes de formes semblables.

2.2. Phénologie

«La phénologie végétale est l'étude scientifique des variations saisonnières, de la croissance et du développement des plantes» (**Schnelle, 1955**). Celle-ci étudie les cycles biologiques et leurs liens avec les conditions climatiques. Ces événements se produisent chaque année à la même époque, mais leur date exacte varie d'année en année. Les dates coïncidant avec chacun des cycles biologiques peuvent nous informer sur la stratégie adaptative des plantes vis-à-vis de leur biotope. Durant les 04 années qu'a duré cette étude nous avons essayé de noter le début et la fin de chacune des phases: végétative et reproductrice.

2.3. Morphologie

L'observation des différentes parties de la plante sous binoculaire (Zeiss), nous a permis de déterminer les caractères morphologiques des feuilles et des tiges de *T. numidicus* et de les confronter à la description faite par **Poiret (1785 & 1786)** dans son fameux ouvrage « Voyage en Barbarie, ou Lettres écrites de l'ancienne Numidie ». Ceci nous a permis de dégager les caractères morphologiques qui permettent au Thym de répondre aux aléas abiotiques.

2.4. Structure anatomique

Cette étude a un double intérêt :

- Mettre en évidence les différents types tissulaires de notre plante ainsi que les organes responsables de la sécrétion des huiles essentielles.
- Etudier l'expression anatomique du Thym en rapport avec son biotope naturel.

L'étude histologique a porté sur la feuille, la tige jeune et âgée et la racine de l'espèce. Les échantillons ont été récupérés dans l'éthanol dilué immédiatement après la récolte.

➤ Mode opératoire

Pour pouvoir étudier la structure anatomique des organes végétaux, il est nécessaire de savoir effectuer des coupes minces et parfaitement orientées et de pratiquer différentes colorations (**Deysson, 1965**).

La double coloration au vert de méthyle-rouge Congo (**Langeron, 1934**) comprend les différentes étapes suivantes:

1. Traitement par une solution d'hypochlorite de sodium à 12° pendant 15 minutes qui détruira le contenu des cellules à l'exception des parois et des membranes cellulaires.
2. Lavage soigné et répété à l'eau distillée.
3. Traitement par l'acide acétique pendant trois minutes; cet acide détruira les traces d'hypochlorite pouvant rester encore et facilitera la fixation ultérieure des colorants sur les membranes (**Deyson, 1965**).
4. Traitement par le réactif au vert de méthyle à 1 %, pendant cinq minutes; ce réactif colore en vert les tissus sclérifiés et en jaune verdâtre ou brun verdâtre la cutine et les parois subérifiées.

5. Lavage rapide et répété à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.
6. Traitement par le réactif au rouge Congo à 1% pendant 15 minutes; ce réactif colore en rose les tissus cellulosiques, en se fixant sur les glucanes (cellulose = polymère de glucane).
7. Lavage rapide et répété à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.
8. Montage entre lame et lamelle dans une goutte d'eau distillée pour observation immédiate au microscope.
9. Observation des coupes sous microscope photonique pour prise de photos aux grossissements x10 et x40.

2.5. Adaptation physiologique

Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans les processus de croissance des plantes, contrairement aux métabolites primaires. Chez les végétaux, ces métabolites secondaires exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement. Il est reconnu que la quantité de métabolites secondaires est physiologiquement régulée et qu'elle a un rôle primordial en matière d'adaptation des plantes à la prédation et aux contraintes physiques. Longtemps considérés comme des « déchets métaboliques » sous prétexte que leurs concentrations variaient beaucoup d'une plante à l'autre mais aussi d'un organe à l'autre, l'écologie a mis en évidence le rôle essentiellement adaptatif et signalétique de ces molécules (**Ceballos & Gibernau, 2000**). Ils participent ainsi, de manière très efficace, à la tolérance des végétaux à des stress variés (attaques de pathogènes, prédatons d'insectes, sécheresse, lumière UV...).

2.5.1. Screening phytochimique

2.5.1.1. Les saponines

La présence de saponines a été déterminée quantitativement par le calcul de l'indice de mousse, soit le degré de dilution d'un décocté aqueux, donnant une mousse persistante dans des conditions déterminées. Pour réaliser ce test 2 g de matériel végétal sec broyé ont été ajoutés à 100 ml d'eau pour préparer une décoction. Le tout a été porté à ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, le volume a été réajusté à 100 ml.

A partir de cette solution mère, 10 tubes allant de 1 à 10 ml ont été préparés (le volume final a été réajusté à 10 ml avec de l'eau distillée). Chacun des tubes a été agité avec énergie

en position horizontale pendant 15 secondes. Après un repos de 15 min en position verticale, la hauteur de la mousse persistante a été relevée (en cm). Pour définir l'indice de mousse il est nécessaire d'appliquer la formule suivante :

$$\text{Indice de mousse} = \text{hauteur de mousse (en cm) dans le } X^{\text{ème}} \text{ tube} \times 5 / 0,0x.$$

Sachant que x représente le numéro du tube dans lequel la hauteur de la mousse persistante est proche de 1 cm.

La présence de saponines dans la plante est confirmée avec un indice supérieur à 100. **(Dohou et al., 2003 ; Kouassi et al., 2010).**

2.5.1.2. Les flavonoïdes

Pour le criblage des flavonoïdes, une solution à base de 5 g de poudre et 150 ml d'HCl (à 1%) a été préparée, après une macération de 24h, le mélange a été filtré. 10 ml du filtrat ont été ensuite récupérés puis rendus basiques par ajout progressif de NH₄OH. L'apparition d'une couleur jaune atteste de la présence de flavonoïdes dans le milieu. **(Mellouk, 2007).**

2.5.1.3. Les tannins

Une solution méthanolique a été préparée à partir de 1,5 g de matériel végétal sec et 10 ml de méthanol à 80 %. Après 15 minutes d'agitation, l'extrait a été filtré puis mis dans un tube. L'ajout de FeCl₃ (à 1 %) permet de détecter la présence ou non de tanins. La présence de tanins est exprimée par un virage de la couleur au bleu noir pour les tanins galliques et au brun verdâtre pour les tanins catéchiqes. **(Dohou et al., 2003).**

2.5.1.4. Les alcaloïdes

La recherche d'alcaloïde a été réalisée en utilisant le test de Dragendorff et Meyer **(Waldi, 1965 ; Trease et Evans, 1989)**. Elle a nécessité la préparation d'une solution à partir de 2 g de poudre de matériel végétal et 2 ml de NH₄ (dilué à 1/10). La solution a subi une macération pendant 15 min, elle a été ensuite agitée puis filtrée. Après ajout de 4 ml d'HCl (dilué à 1/10), le filtrat a été déposé dans une ampoule à décantation. La phase aqueuse acide a été récupérée puis partagée en deux tubes. Le réactif de Meyer a été ajouté à l'un et le réactif de Dragendorff à l'autre, la variation de couleur exprime la présence d'alcaloïdes.

2.5.1.5. Les terpènes

A partir de la matière végétale sèche, un extrait aqueux a été préparé (100 g de poudre et 500 ml d'eau distillée). Le mélange a été exposé à une température allant de 90 à 100°C pendant 2 heures puis filtré. Au filtrat ont été ajoutés successivement ; 5 ml de chloroforme, 2 ml d'anhydride acétique (réaction de Liebermann Bruchard) et enfin quelques gouttes d'acide sulfurique. La formation d'un anneau violet-bleu ou vert à l'interphase des deux liquides indique la présence de terpènes. **(Yemoa et al., 2008 ; Rasool et al., 2010).**

2.5.1.6. Les coumarines

Un extrait a été tout d'abord réalisé à partir d'une macération de 1 g de poudre dans 20 ml d'éther pendant 24h. 5 ml d'extrait étheré ont été évaporés à sec. A cet extrait 2 ml d'eau chaude puis 1 ml de NH₄OH (à 25 %) ont été ajoutés. Le mélange a été observé sous UV à 366nm. La présence de coumarines est exprimée par une coloration bleu intense. **(Badiaga, 2012).**

2.5.2. L'huile essentielle

2.5.2.1. Extraction et calcul du rendement

L'huile essentielle a été extraite par procédé d'hydrodistillation, au niveau du laboratoire de Biologie végétale du département de Pharmacie, (Faculté de Médecine d'Annaba).

Pour cela, 100 g de feuilles préalablement séchées à l'ombre ont été émietées puis mises dans un ballon avec une quantité d'eau distillée, le ballon a été par la suite porté à ébullition sur un chauffe ballon.

Les huiles essentielles entraînées par la vapeur se dirigent vers un réfrigérant ou elles subissent une condensation donnant naissance à deux phases ; une phase organique et une phase aqueuse. Les deux phases ont été séparées par décomptage et l'huile essentielle obtenue a été récupérée dans un flacon en verre hermétique opaque, puis conservée à 4°C dans un endroit sec à l'abri de la lumière. **(Willem, 2004).**

Le rendement est défini comme étant le rapport entre la quantité d'huile essentielle récupérée et la quantité de la matière végétale sèche traitée (AFNOR, 1986), il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$R = P_b / P_a \times 100$$

Sachant que

- R : rendement de l'huile essentielle
- P_b : poids de l'huile essentielle récupérée en gramme
- P_a : poids de la matière végétale sèche en gramme

2.5.2.2. Analyse des constituants chimiques de l'huile essentielle

La composition chimique de l'huile essentielle a été déterminée par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse (CG/MS). Elle a été effectuée au niveau du Centre Nationale de la Recherche Scientifique et Technologique de Rabat, Maroc.

- **Principe de la technique**

La chromatographie en phase gazeuse est la méthode la plus adaptée pour l'analyse des huiles essentielles, vue la volatilité des constituants, elle est basée sur la répartition des analytes entre une phase stationnaire et une phase gazeuse. La phase stationnaire est constituée d'un liquide à base de silicone qui imprègne une matière solide inerte et granuleuse, l'ensemble est contenu dans une colonne en acier ou en verre de 1 à 3m de long généralement enroulée sur elle-même, et de 2 à 4mm de diamètre. La phase mobile est un gaz vecteur inerte comme l'azote, l'hélium ou l'argon. La colonne est maintenue à une température élevée par l'intermédiaire d'un four. Sous l'effet de la température les analytes se volatilisent et deviennent séparables. La base de la séparation correspond à la différence des coefficients de partage des analytes volatiles entre la phase stationnaire et la phase gazeuse.

Cette méthode est réalisée de nos jours avec des colonnes capillaires faites de verre ou de métal d'un diamètre allant de 0.3 à 1mm. Un système de détection permet de créer un signal à la sortie de chaque molécule de la colonne, ce signal se traduit par l'enregistrement des pics correspondants à chaque analyte.

La CG est couplée à un spectroscope (SM), le couplage se base sur la comparaison informatique du spectre d'un pic inconnu avec une ou plusieurs bibliothèques de référence, permettant son identification. Pour que cela soit possible, il faudrait que le niveau de similitude des spectres (inconnu et référence) soit suffisant et que les indices de rétention soient identiques. (**Bouchonnet, 1999**).

- **Protocole:**

Appareillage : chromatographe à phase gazeuse (*Trace GC ULTRA*) couplé à un spectromètre de masse (*Polaris QMS à trappe ionique*)

Type d'ionisation : X EI (70 eV)

Solvant: Acétate d'éthyle

Colonne: VB-5 (Methylpolysiloxane à 5% phenyl), 30m* 0.25mm* 0.25 µm.

- **Conditions de séparation**

Volume d'injection	1µl
Température d'injection	220°C
Température d'interface	300°C
Mode d'injection	Split
Gaz vecteur	Hélium
Débit	1.4 ml/min

Rampe (°C /min)	Température finale (°C)	Temps (min)
	40	2.00
4	180	2.00
20	300	2.00

- **Température de la source d'ionisation :** 200°C
- **Base de données utilisée :** NIST/EPA/NIH MASS SPECTRAL LIBRARY Version 2.0 a, build jul 1 2002.

3. Etude thérapeutique

3.1. Evaluation de l'activité antiradicalaire de l'huile essentielle (Effet scavenger du radical DPPH) :

➤ Principe

Le DPPH (2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl) est l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure-activité antioxydante (**Brand-williams, 1995**). C'est un radical libre stable possédant un électron d'azote non apparié, ce qui empêche la polymérisation du composé, qui reste sous une forme monomérique relativement stable à température ambiante. Cet état induit l'apparition d'une couleur violet foncée qui disparaît lorsque le DPPH est réduit en présence d'un antioxydant, passant du violet au jaune pâle (**Maataoui et al., 2006 ; Villano et al., 2007**).

L'activité antioxydante d'un extrait de plante est déterminée par suivi spectrophotométrique (à 517nm) du virage coloré de la solution (**Gulcin et al., 2003 ; Molyneux, 2004 ; Roginsky et Lissi 2005**). L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité de l'antioxydant à donner des protons (**Sanchez-Moreno et al., 2002**).

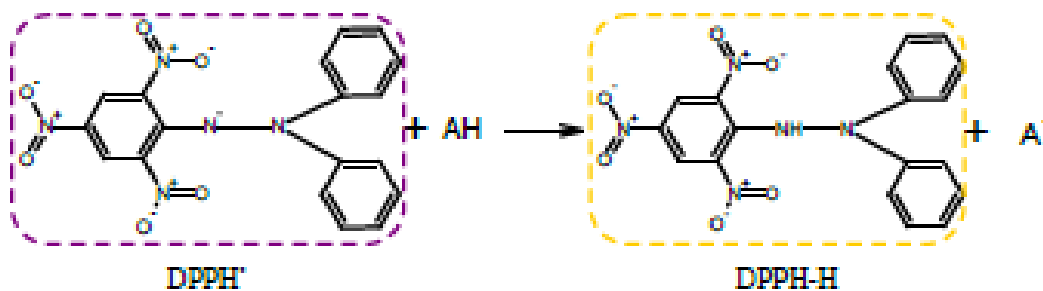


Figure 12: Mécanisme réactionnel du test DPPH• entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant (AH) (Michel, 2011).

➤ Mode opératoire :

La solution de DPPH a été préparée par la solubilisation de 2,4 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol (elle ne se conserve pas plus de 4-5 jours à l'obscurité).

Un volume de 100 µl d'huiles essentielles (à différentes concentrations) a été ajouté à 2 ml de la solution de DPPH. Le mélange réactionnel a été agité vigoureusement puis incubé pendant 30 min à l'obscurité. Les absorbances ont été mesurées à 517 nm contre le blanc (DPPH/méthanol).

L'inhibition du radical libre DPPH par des antioxydants synthétiques de référence (BHT, acide ascorbique) a également été réalisée dans les mêmes conditions.

NB : IL est nécessaire d'effectuer 3 répétitions pour chaque concentration de l'huile essentielle.

- **Expression des résultats :**

L'activité antiradicalaire exprime la capacité de l'antioxydant à piéger le radical libre, elle a été estimée en pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le méthanol. Le pourcentage d'activité antioxydante a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [\text{Abs contrôle} - \text{Abs échantillon} / \text{Abs contrôle}] \times 100.$$

Sachant que Abs contrôle représente l'absorbance du blanc (DPPH/méthanol).

La réalisation d'une cinétique de l'activité antiradicalaire a permis la détermination du paramètre IC₅₀, défini comme étant la concentration d'antioxydant requise pour diminuer la concentration initiale de DPPH de 50%, elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante.

3.2. Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle

- **Souches bactériennes**

Les tests ont été effectués sur un total de 50 souches, incluant des souches cliniques ainsi que des souches de référence.

Ces souches nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie médicale du département de pharmacie (Faculté de Médecine d'Annaba).

Tableau 06 : Répartition des souches tests

	Espèce	Famille	Nombre
Gram-	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	10
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		10
	<i>Acinetobacter spp.</i>	Moraxellaceae	10
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonaceae	9
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VIM-2		1
Gram+	<i>Staphylococcus aureus</i> mécicilline résistant.	Micrococcaceae	10

3.2.1. Etude du comportement des souches isolées vis-à-vis des antibiotiques

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement thérapeutique. Il sert également :

- A la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne.
- A l'identification bactérienne par la mise en évidence de résistances naturelles.

La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques) qui permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'une gamme d'antibiotiques (Cavallo, 2007), ces derniers ont été sélectionnés selon la recommandation du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2012), le choix repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques et d'autre part sur le spectre d'activité de chaque antibiotique. (Cavallo, 2007).

Le milieu retenu pour la majorité des espèces bactériennes est celui de Muller – Hinton, ce milieu permet la croissance de nombreuses bactéries, et ne contient pas d'inhibiteurs des antibiotiques.

- **Mode opératoire**

- **Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture pure de 24 heures sur milieu gélosé non sélectif, une suspension bactérienne a été préparée dans l'eau physiologique stérile (0,9 % NaCl), de façon à obtenir un inoculum équivalent au standard McFarland 0,5 (10^8 UFC/ml).

- **Ensemencement**

L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage selon les recommandations du CASFM (2012) et ce, en procédant aux étapes suivantes :

- Couler tout d'abord le milieu MH (4mm d'épaisseur) dans une boîte de Pétri et laisser la gélose solidifier.
- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Sortir l'écouvillon du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la gélose en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 min.

- **Application des disques**

Déposer les disques d'antibiotiques à la surface de la gélose à l'aide d'une pince

bactériologique préalablement flambée, une fois appliqué le disque ne doit pas être déplacé.

➤ **Incubation**

Incuber les boîtes à l'étuve à 37°C pendant 24 heures. (Fauchère, 2002 ; Aissa, 2004)

➤ **Lecture**

Pour chaque souche, et pour chaque antibiotique :

- Mesurer avec précision en millimètre le diamètre de la zone d'inhibition.
- Reporter cette mesure sur l'échelle de concordance correspondante indiquant si la bactérie est sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante (R) à l'antibiotique. (Carret, 2004)

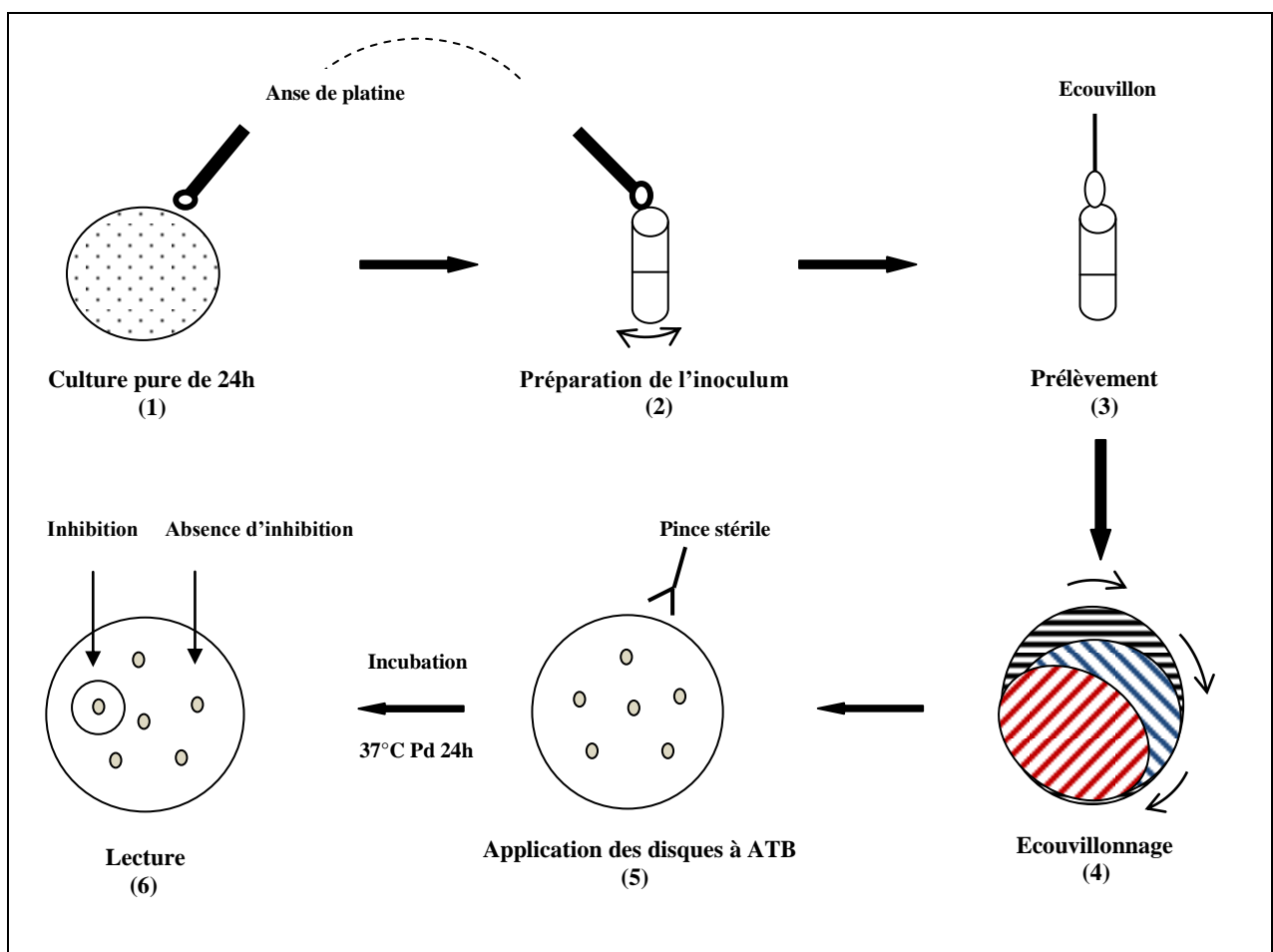


Figure 13: Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque

Tableau 07 : Valeurs des diamètres critiques des antibiotiques testés (CASFM, 2012)

		ATB	Sigle du disque	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
					Sensible	Résistante
β-lactamines	Pénicillines	Pénicilline G	P	6µg	≥ 29	< 18
		Amoxicilline	AMX	25 µg	≥ 23	< 16
		Amoxicilline/ acide clavulanique	AMC	20/10 µg	≥ 23	< 16
		Ticarcilline	TIC	75 µg	≥ 24	< 22
		Ticarcilline/ acide clavulanique	TCC	75/10 µg	≥ 24	< 22
		Pipéracilline	PIP	75 µg	≥ 22	< 18
	Carbapénèmes	Imipenème	IPM	10 µg	≥ 24	< 17
	Monobactames	Aztreonam	ATM	30 µg	≥ 23	< 21
	Céphalosporines	Céfoxitine	FOX	30 µg	≥ 22	< 15
		Céfotaxime	CTX	30 µg	≥ 26	< 23
		Céftazidime	CAZ	30 µg	≥ 21	< 19
		Céfazoline	CZ	30 µg	≥ 18	< 12
	Aminosides	Gentamicine	GN	15 µg	≥ 18	< 16
Amikacine		AK	30 µg	≥ 17	< 15	
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30 µg	≥ 23	< 19	
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30 UI	≥ 19	< 17	
Macrolides	Erythromycine	E	15 UI	≥ 22	< 17	
Polypeptides	Colistine	CT	50 µg	≥ 15	< 15	
Sulfamides-triméthoprimes	Triméthoprime/ sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75µg	≥ 16	< 10	
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30 µg	≥ 20	< 15	
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5 µg	≥ 25	< 22	
	Pefloxacine	PF	5 µg	≥ 22	< 16	
Autres	Fosfomycine	FOS	50 µg	≥ 14	< 14	
	Rifampicine	RA	30 µg	≥ 19	< 14	

3.2.2. Evaluation qualitative de l'activité antibactérienne (aromatogramme)

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle testée a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé ou aromatogramme. La réalisation de l'aromatogramme repose sur le principe de la technique de l'antibiogramme. Les souches tests ont été ensemencées sur milieu Mueller Hinton (par écouvillonnage) selon les recommandations du **CASFM (2012)**.

Deux disques stériles ont été déposés à la surface de la gélose, l'un imprégné d'huile essentielle pure (10 µl), l'autre est un disque témoin vierge de toute substance. Après une incubation de 24 h à 37 °C, nous avons procédé à la lecture des résultats en mesurant le diamètre des zones d'inhibition formées autour des disques. L'importance des diamètres des zones d'inhibition reflète l'impact de l'huile essentielle sur les souches bactériennes.

3.2.3. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne (calcul des CMI)

La CMI représente la plus faible concentration d'huile essentielle à laquelle aucune poussée bactérienne n'est observée.

Le calcul de la CMI a été réalisé par la méthode de l'incorporation en milieu gélosé selon les recommandations du **CASFM (2012)**. A partir d'une solution mère, des dilutions de l'huile essentielle ont été préparées dans le DMSO, qui semble être le solvant idéal pour sa miscibilité avec l'HE et son innocuité vis-à-vis des microorganismes. Les dilutions ainsi obtenues ont été incorporées au milieu Mueller Hinton en surfusion puis coulées dans des boîtes de Pétri. Après séchage du milieu, des échantillons de chacune des souches tests ont été déposés à la surface de la gélose (sous forme de spots). Après une incubation de 24 h à 37°C, nous avons procédé à la lecture des résultats, la distinction entre les souches sensibles et les souches résistantes se fait selon qu'il y- ait poussé ou non des souches à leur emplacement (**Benjilali et al, 1986 ; Billerbeck et al, 2002**).

3.2.4. Recherche de la CMB

La CMB représente la plus faible concentration d'huile essentielle qui détruit 99,9% de l'inoculum bactérien, ce qui correspond à un dénombrement bactérien inférieur à un intervalle compris entre 10^4 et 10^2 UFC/ml après 24h d'incubation (l'inoculum initial étant entre 10^6 et 10^8). Des prélèvements d'échantillons ont été effectués sur chacune des boîtes

n'ayant montrées aucune croissance bactérienne lors du test précédent, ces prélèvements ont été ensuite repiqués sur gélose nutritive puis incubés à 37 °C pendant 24h (**Haddouchi, 2009**).

La concentration minimale bactéricide correspond à la plus faible concentration d'huile essentielle pour laquelle aucune croissance n'a été observée.

3.2.5. Synergie huile essentielle/antibiotique

Pour la réalisation de ce test, nous avons choisi de travailler sur la souche *Pseudomonas aeruginosa* VIM-2, isolée au niveau de l'unité des soins intensifs du CHU d'Annaba (**Touati et al., 2013**). Notre choix s'est porté sur cette souche car elle est productrice d'une metallo- β -lactamase, la rendant résistante à l'imipénème. Ce dernier étant un antibiotique puissant de la famille des β -lactamines, il agit sur un large spectre bactérien et est doté d'une grande stabilité vis-à-vis des β -lactamases (**Chun-Xin et al., 2006 ; Gral et al., 2011**). Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont de phénotypes sauvages sensibles à l'imipénème, elles sont néanmoins dotées d'une grande plasticité et d'un pouvoir d'adaptation inouï, impliquant l'apparition de souches résistantes dont le taux ne cesse d'augmenter.

Le but de cette étude est de mettre en évidence la potentialisation de l'effet de l'imipénème, une fois associé à l'HE de *T. numidicus*.

La méthode utilisée est celle du «checkerboard» qui consiste à déterminer tout d'abord les CMI de l'huile essentielle et de l'antibiotique seuls, puis à déterminer leurs CMI lorsqu'ils sont en association et ce, en réalisant une gamme bidimensionnelle des composés à tester afin de démontrer que la combinaison d'agents peut exercer des effet inhibiteurs qui sont soit supérieurs à la somme de leurs effets seuls (synergie), soit inférieurs à ceux-là (antagonisme) (**Odds, 2003 ; Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009**).

Après avoir déterminé les CMI de l'HE et de l'imipénème seuls (poudre lyophilisée du laboratoire MSD), nous avons procédé à la détermination de la CMI de la combinaison. Le test a été réalisé sur milieu MH, auquel ont été incorporées différentes concentrations d'huile essentielle (de 0,5 % à 0,06 %) et d'ATB (de 16 μ g/ml à 2 μ g/ml), combinées dans un ordre vertical et horizontal. Une fois coulé et refroidi, le milieu a étéensemencé avec la souche VIM-2.

Après une incubation de 24 h à 37°C, nous avons procédé au calcul de l'Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire "FICI" selon la formule suivante :

$$\begin{aligned} \text{FIC}_{\text{HE}} &= \text{CMI}_{\text{HE combinée}} / \text{CMI}_{\text{HE seule}} \\ \text{FIC}_{\text{ATB}} &= \text{CMI}_{\text{ATB combinée}} / \text{CMI}_{\text{ATB seul}} \\ \text{FICI} &= \text{FIC}_{\text{HE}} + \text{FIC}_{\text{ATB}} \end{aligned}$$

Afin d'interpréter les résultats, **Odds** (2003) a proposé la classification suivante :

- Il existe une synergie entre HE et ATB lorsque le FICI est inférieur ou égal à 0,5.
- Il n'y a pas d'interaction entre l'HE et l'ATB lorsque le FICI est compris entre 0,5 et 4.
- Il y a antagonisme lorsque le FICI est supérieur à 4.

Résultats et discussion

1. Biotope du thym de Numidie

- **Description du site**

Le site où se développe *T. numidicus* est situé à proximité d'une zone urbaine, il est très dégradé et sujet à une anthropisation marquée. C'est un maquis de Chêne liège, en bas d'une plantation d'Eucalyptus. Le Thym se développe sur une pente assez accentuée (15%) avec affleurement de roches.



Photo 1 : Site de récolte du Thym de Numidie (Cliché de Kouch M.)

Le Thym se développe parmi un cortège floristique constitué (entre autres) des espèces suivantes :

Tableau 8 : Composition floristique du site (surface de 100 m²).

Nom scientifique	Nom commun	Famille	% de recouvrement
<i>Thymus numidicus</i> Poiret.	Thym de Numidie	Lamiacées	20%
<i>Olea europea</i> L.	Olivier sauvage	Oléacées	5%
<i>Phylleria angustifolia</i> L.	Filaire à feuille étroite	Oléacées	5%
<i>Myrtus communis</i> L.	Myrte commun	Myrtacées	5%
<i>Biscutella didyma</i> L.	Biscutelle	Brassicacées	+
<i>Silene gallica</i> L.	Silène de France	Caryophyllacées	+
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Lin	Linacées	+
<i>Asphodelus microcarpus</i> L.	Asphodèle à petits fruits	Liliacées	40%
<i>Daphne gnidium</i> L.	Garou	Thymelaeacées	+
<i>Bellis annua</i> L.	Pâquerette annuelle	Asteracées	+
<i>Anagallis phoenicia</i> L.	Mouron rouge	Primulacées	+
<i>Calycotome villosa</i> (Poir.) Link.	Calicotome velu	Fabacées	+
<i>Galactites tomentosa</i> Moench.	Chardon laiteux	Asteracées	5%
<i>Aira cupaniana</i> Guss.	Canche de Cupani	Poacées	+



Photo 2 : Abondance de l'Asphodèle dans le site de récolte (Cliché de Kouch M.)

L'abondance de l'Asphodèle est indicatrice d'une dégradation poussée du milieu et d'un surpâturage, vu que cette plante est non palatable. C'est une espèce anthropozoïque (*anthropo-* et *-zoïque*, gr. « vie, existence »), adj.;ère **anthropozoïque** « période caractérisée par l'apparition de l'homme ». Ce site est donc fortement anthropisé.

La présence de cette espèce dénote un substrat argileux, non salé (puisque l'asphodèle ne tolère pas la salinité), sol pauvre en matière organique et sec (**Tela Botanica, 2014**).

1.1. Climat

D'après les données climatiques de la zone d'étude (Tab 09), les températures les plus faibles ont été enregistrées au mois de février qui est le mois le plus froid avec une température moyenne de 10,78°C. Le mois le plus chaud est le mois d'août avec une température moyenne de 25,7°C. La différence entre ces deux valeurs permet de fixer l'amplitude thermique de la région à 14,92°C. La température moyenne annuelle est de 17,96°C et la pluviométrie annuelle est de l'ordre de 617,08 mm. Février est le mois le plus arrosé avec 100,5 mm de précipitations, le mois le plus sec est le mois de juillet avec 1,02 mm.

La région de Berrahal est caractérisée par un fort taux d'humidité avec pas moins de 75,6% relevé au mois d'août, le maximum a été atteint au mois d'avril avec 82,8% d'humidité. Le facteur de compensation de l'humidité peut jouer, un rôle important dans le maintien du couvert végétal.

Tableau 09 : Moyennes mensuelles des températures, des précipitations et de l'humidité de la région de Berrahal durant la période 2010-2014

.	Jan	Fév	Mar	Avr	Mai	Juin	Juil	Aou	Sept	Oct	Nov	Déc
T (°C)	11,66	10,78	13,04	15,66	17,94	22,4	25,18	25,7	23,56	20,5	16,2	12,9
P (mm)	74,96	100,5	80,62	39,56	32,06	6,3	1,02	8,74	39,72	71,24	95,44	66,92
H (%)	81,6	79,8	82,4	82,8	81	78,6	76,2	75,6	79	80,4	76,8	76,2

D'après la classification de Koppen (**Peel et al., 2007**), Le climat de la région de Berrahal est de type Méditerranéen (**Csa**), puisqu'il remplit les conditions suivantes :

- La température moyenne du mois le plus froid est comprise entre 0 et 18°C et celle du mois le plus chaud est supérieure à 10°C, donc le climat est tempéré (C).
- Les précipitations du mois le plus sec sont inférieures à 40 mm, elles sont aussi inférieures aux précipitations du mois le plus humide en hiver, donc l'été est sec (s).
- Les températures moyennes des mois d'été sont supérieures ou égales à 22°C, donc l'été est chaud (a).

Les espèces de Thym s'épanouissent parfaitement dans le bassin méditerranéen, car ce sont des espèces thermophiles typiques des prairies sèches.

- **Diagramme ombrothermique**

Le diagramme ombrothermique (Fig. 14) de la région de Berrahal révèle que le climat de cette zone est un climat tempéré chaud avec un été sec. La saison sèche s'étale du mois de mai au mois de septembre.

Tableau 10: Caractéristiques climatiques de la région de Berrahal

Température moyenne annuelle (°C)	17,96
Amplitude thermique (°C)	14,92
Précipitations totales (mm)	617,08
Nombre de mois secs	5

En effet les histogrammes des précipitations des mois de mai, juin, juillet, aout et septembre restent sous la courbe des températures moyennes enregistrées durant ces cinq mois. On distingue donc deux périodes; une période sèche qui débute au mois de mai et qui finit au mois de septembre ; elle dure 05 mois et une période humide qui commence au mois d’octobre et qui se termine au mois d’avril.

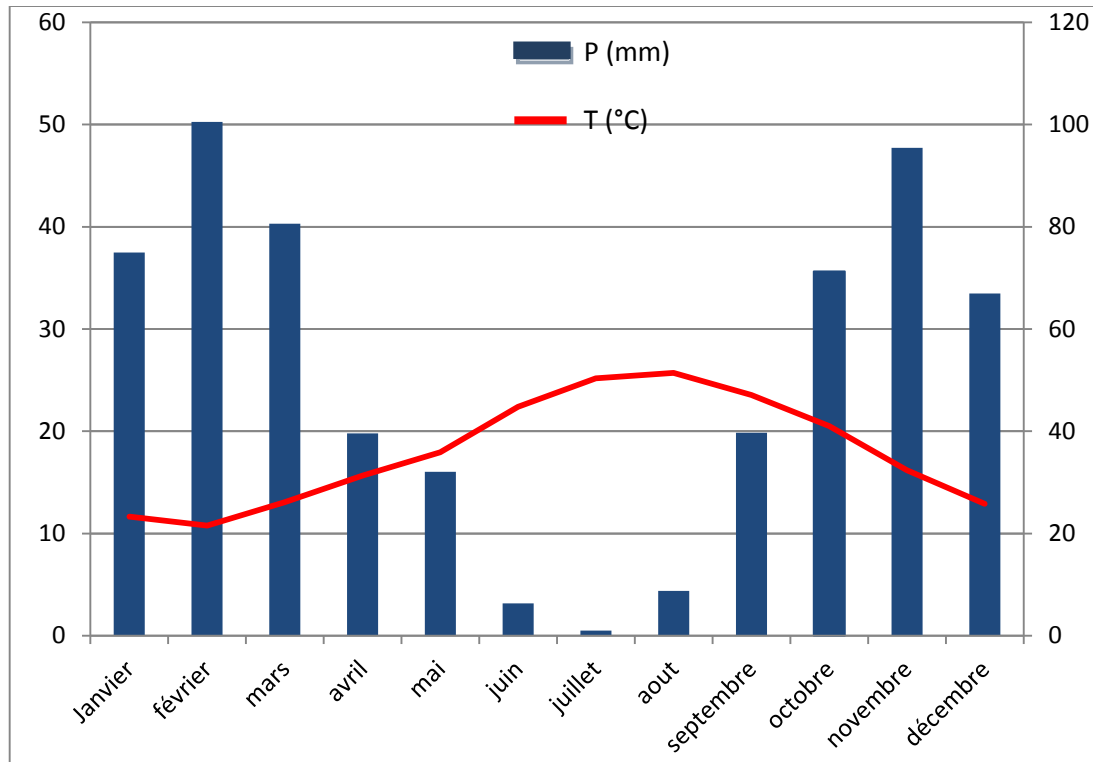


Figure 14 : Diagramme ombrothermique de la région de Berrahal (2010-2014)

1.2. Exigences pédologiques

Les résultats de l'analyse du sol où la récolte de l'espèce a été effectuée sont représentés dans le tableau n° 11 et 12.

Tableau 11: détermination de la texture du sol

Poids du sol mouillé (g)	71,39
Poids du sol après dessiccation (g)	40,28
Pourcentage d'humidité	77,23
Texture	Argileuse

Tableau 12 : Etude physicochimique du sol

Paramètre	Valeur
pH	6,45
Calcium	54,17 mg/ml
Magnésium	13,93 mg/ml
Potassium	9,40 mg/ml
Sodium	2,45 mg/ml
Phosphore	0,39 mg/ml
Matière organique	0,53%
Conductivité	0,005 mS/cm

1.2.1. Détermination de la texture

La caractérisation pédologique de la région où la récolte de l'espèce a été effectuée est nécessaire, vue l'influence directe de l'environnement de la plante sur la composition chimique de ses extraits ainsi que leur activité biologique (**Karousou et al., 2005 ; Thompson et al., 2003**). .

L'analyse réalisée dans la présente étude nous a permis de définir le sol de la région de Berrahal comme étant argileux. Ces types de sol sont lourds et compacts, ils retiennent bien l'eau et les minéraux, c'est ce qui en fait des sols très fertiles, ils sont néanmoins mal aérés et mal drainés du fait de leur manque de porosité, ils ont donc tendance à être collant en hiver et à craqueler en été.

1.2.2. Détermination de la conductivité

Le sol de la région de récolte est non salé ceci pourrait suggérer que le Thym de Numidie est non tolérant à la salinité.

1.2.3. Détermination du pH

Le sol possède un pH de 6,45, ce qui concorde avec sa texture car d'après le **CRAAQ (2003)**, les sols argileux ont des pH qui varient entre 6 et 7, ils sont donc considérés comme des sols faiblement acides. D'après **Doucet (2006)**, la plus part des plantes se développent dans des sols à pH avoisinant 6,5 et s'accommodent d'un écart de pH atteignant une unité. En effet ce pH est le plus adapté au développement des bactéries fixatrices de minéraux et des vers de terre qui transforment les composés organiques en éléments minéraux assimilables par les racines. Ce processus biologique appelé minéralisation remet en circulation des minéraux qui constituent une réserve d'éléments nutritifs, et qui comblent une partie des besoins de la plante.

1.2.4. Détermination du taux de matière organique

D'après la classification des sols de **SOLTSE (1981)**, l'extrait de sol étudié est faiblement enrichi en matière organique (0,53 %), cela peut être attribué d'une part au faible taux de recouvrement végétal dans cette station et d'autre part au fait que l'espèce se trouve sur une pente sur un sol érodé, la matière organique y est lessivée par les eaux pluviales.

1.2.5. Détermination de la teneur en minéraux

Lorsque le pourcentage de matière organique d'un sol est inférieur à 30%, celui-ci est considéré comme étant minéral. En effet le sol étudié est essentiellement riche en minéraux spécialement en calcium (54,17mg/ml) et en magnésium (13,93 mg/ml). Le taux de potassium (9,40 mg/ml) est aussi non négligeable. Vis-à-vis de la richesse du sol en calcium, on peut dire que le Thym est soit calcifuge ou tolérant puisque, dans la région, le Thym de Numidie accompagne souvent le Chêne liège qui est un calcifuge avéré.

1.2.6. Estimation de la qualité trophique du sol

1.2.6.1. Rapport biomasse racinaire sur biomasse aérienne

Ce rapport est égal à 0.67, donc inférieur à 1. Ce qui laisse supposer que l'apport en azote est satisfaisant (Annexe 03).

Afin de déterminer les stratégies de gestion des ressources hydriques, nous avons calculé ; la surface foliaire de la feuille (SF), la surface foliaire spécifique (SLA) et le LDMC (Leaf Dry Matter Content).

1.2.6.2. Détermination de la surface foliaire

Tableau 13: Détermination de la surface foliaire

M₁ (mm)	M₂ (mm)	E₁	E₂	SF (mm²)
11,575	3,125	4,72	0,96	18,08

M₁ : moyenne des longueurs ; M₂ : moyenne des largeurs ; E₁ : écartype des longueurs
E₂ : écartype des largeurs ; SF : surface foliaire.

1.2.6.3. Détermination de la SLA et la LDMC

Tableau 14 : Détermination de la SLA et de la LDMC

P₁ (mg)	P₂ (mg)	SF (mm²)	SLA (mm²/mg)	LDMC
3	0,8	18,08	22,6	0,26

P₁ : poids moyen d'une feuille fraîche ; P₂ : poids d'une feuille après dessiccation pendant 2h à 105°C ; SF : surface foliaire ; SLA : surface spécifique de la feuille ; LDMC : rapport de la masse de matière sèche par unité de matière fraîche.

Les plantes à fort LDMC et à faible SLA sont des plantes à feuilles coriaces. A l'opposé, on trouve que les plantes de type herbacé sont à fort SLA et à faible LDMC. C'est le cas du Thym dont les feuilles sont assez tendres et pauvres en matière sèche. Ceci prouve que le niveau trophique du substrat n'est pas un facteur limitant.

2. Prédipositions adaptatives

La Numidie orientale est caractérisée par un climat méditerranéen à pluviosité concentrée durant les saisons froides, avec un été chaud et sec (**Emberger, 1954**). En réponse à ces conditions climatiques, le Thym de Numidie présente plusieurs aspects qui lui permettent de se trouver une niche écologique très significative (**Bennadja, 2007**). Dans la Numidie orientale, on le rencontre sur argile de Numidie et sur grès de Numidie sur des substrats secs (**Bennadja, 2007**).

Les réponses de cette espèce aux contraintes découlant de ce type de climat sont d'ordre anatomique, morphologique et physiologique.

2.1. Type biologique:

Selon la Classification de **Raunkier (1934)**, Le thym, qui est un arbrisseau vivace bas (1m du sol) est une chaméphyte. En effet, il présente une faible hauteur au-dessus du sol (inférieur à 30 cm) et forme de petits buissons à l'aspect de touffe (Photo 3). Ceci le met à l'abri du vent et participe dans la limitation de l'évapotranspiration.

2.2. Phénologie

- Le stade végétatif s'installe au mois de mars alors que la plante commence à fleurir à partir du mois de mai et se poursuit jusqu'à juin, c'est à dire sous une chaleur intense. d'ailleurs en pénétrant une foret où pousse le Thym de Numidie on peut flairer sa senteur aromatique de loin.
- Les dates sont approximatives puisque selon les conditions climatiques propres à chacune des années, ces dates reculent ou avancent d'une quinzaine de jours.



Photo 3: *Thymus numidicus* Poiret (Cliché de Kouch M.)



Photo 4 : Fleurs de *Thymus numidicus* Poiret (Cliché de Kouch M.)

2.3. Morphologie

- **Feuilles :** Les feuilles de *T. numidicus* sont minuscules, avec une longueur moyenne de 11,57 mm et une largeur moyenne de 3,12 mm. Ces feuilles sont des microphylles molles et glabres sur les deux faces. Les feuilles sont linéaires, obtuses, entières, possédant à leur base de nombreuses stipules filiformes (Photos 5, 6 et 7).

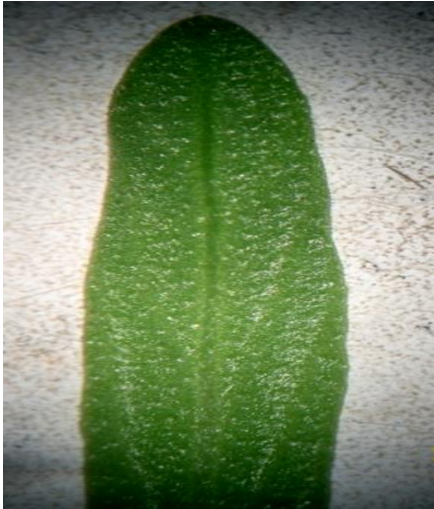


Photo 5 : Morphologie de la feuille de *T. numidicus* (face supérieure)
vue sous binoculaire
(Cliché de Kouch M.)



Photo 6 : Morphologie de la feuille de *T. numidicus* (face inférieure)
vue sous binoculaire
(Cliché de Kouch M.)

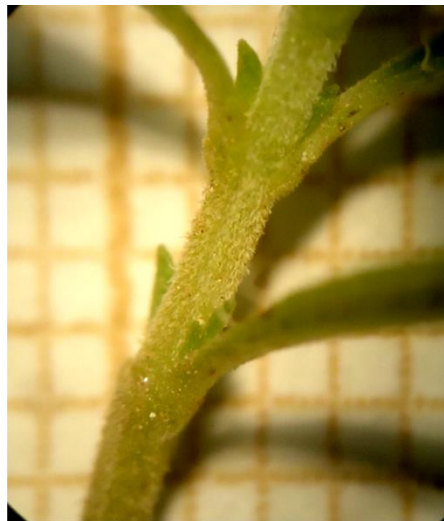


Photo 7 : Feuille stipulée de *T. numidicus*
(Cliché de Kouch M.)

- **Tige :** la tige est couverte de poils tecteurs pour retenir l'humidité rejetée au niveau des stomates et des poils sécréteurs pour libérer des essences volatiles qui en s'évaporant diminuent la température interne et donc l'évapotranspiration.

- **Appareil racinaire:** Les racines sont pivotantes comme toutes les dicotylédones, de profondeur allant jusqu'à 12 cm. Le rapport de la longueur de la racine sur la longueur de la tige est de 0,70 en moyenne (annexe 2) et avec une faible ramification, ce qui dénote un approvisionnement satisfaisant en eau (Photo 8).



Photo 8 : Plant de *Thymus Numidicus*

(Cliché de Kouch M.)

2.4. Adaptation anatomique

Les coupes histologiques réalisées sur les tiges et les feuilles de l'espèce étudiée ont permis l'observation des structures représentées dans les figures ci-dessous, notamment les poils sécréteurs qui sont à l'origine de la sécrétion des huiles essentielles.

- **Feuilles**

Les feuilles de *T. numidicus* sont de type dicotylédone avec une nervure principale formée essentiellement par un faisceau cribro-vasculaire, le mésophylle y est hétérogène avec un parenchyme palissadique sur la face supérieure où s'effectue la photosynthèse et un

parenchyme lacuneux siège des échanges gazeux. Cette hétérogénéité du mésophylle est dictée par le plagiophototropisme des feuilles qui s'orientent obliquement aux rayons solaires.

La structure de la feuille est adaptée à la sécheresse par sa cuticule épaisse sur la face supérieure et sa forme à bords enroulés vers l'intérieur, on observe sur les deux faces de la feuille, la présence de cryptes pilifères et des poils sereteurs disposés en papillon.

L'abondance de ces cryptes est une caractéristique du genre *Thymus*. Ces cryptes servent à limiter les pertes en eau. Les stomates sont en outre protégés du milieu ambiant puisque la feuille ourlée et concave du Thym crée des cryptes pilifères plus ou moins fermées. Toutes ces stratégies adoptées par la plante permettent de créer un microclimat foliaire qui tamponne les rigueurs extérieures en réalisant une masse d'air immobile au niveau de l'ostiole des stomates, diminuant la demande en eau (**Vailaud, 2011**).

On note aussi la présence de cystolithes épidermiques (fines aiguilles d'oxalate de calcium stockées dans une matrice cellulosique). Ces derniers ont été découverts par Meyen 1827, de par la complication de leur structure et leur existence exclusive dans quelques rares familles végétales, elles constituent une des formes les plus intéressantes des dépôts minéraux dans les tissus des plantes. C'est Weddel, qui leur a donné le nom de cystolithes en 1854. Mis à part leur utilité taxinomique certaine, on ignore jusqu'à présent leur rôle chez les végétaux.

Le faisceau libéro-ligneux au niveau de la nervure principale est soutenu par un amas très dense de sclérenchyme. Les tubes criblés, dont la structure est cellulosique sans parois secondaire, se trouvent ainsi protégés.

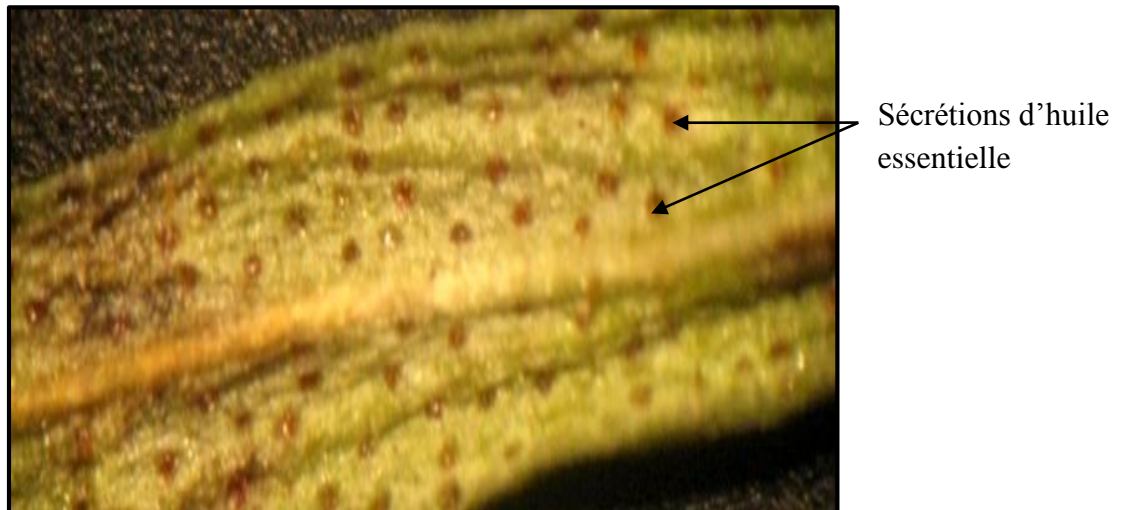


Photo 9 : Aspect de la face ventrale d'une feuille de *Thymus numidicus* vue sous binoculaire (Cliché de Kouch M.)

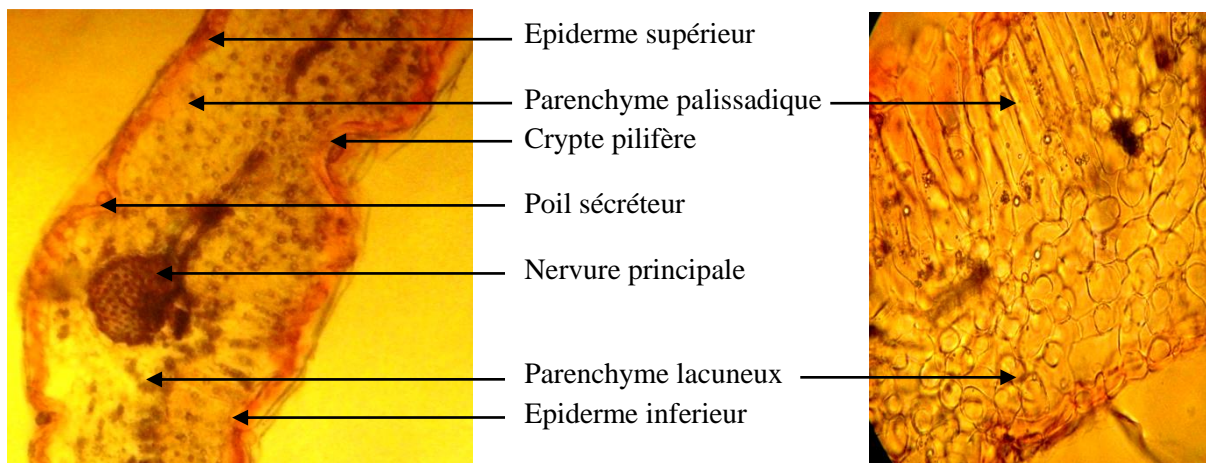


Photo 10 : Coupe transversale d'une feuille de *T. numidicus* vue au microscope optique (Gr X 10) (Cliché de Kouch M.)

Photo 11 : Mésophile de *T. numidicus* vue au microscope optique (Gr X 40) (Cliché de Kouch M.)

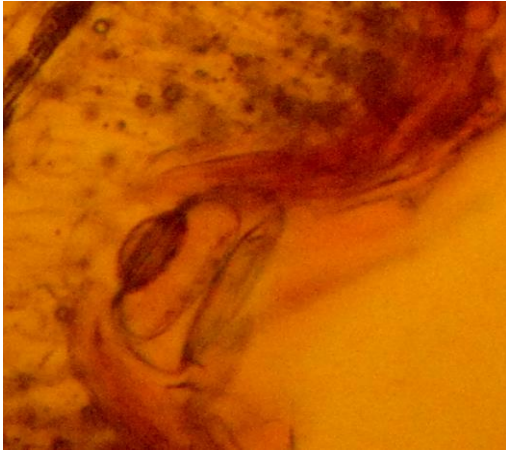
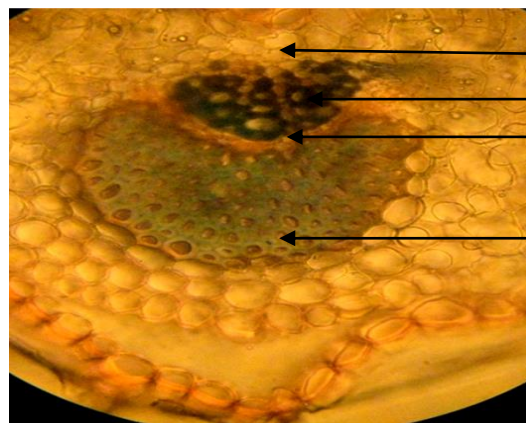


Photo 12: Détail de la crypte vue au microscope
microscope optique (Gr X 40)
(Cliché de Kouch M.)



Photo 13: Extrémité de la feuille vue
au microscope optique (Gr X 40)
(Cliché de Kouch M.)



Parenchyme
Xylème secondaire
Phloème secondaire
Sclérenchyme

Photo 14: Structure anatomique de la nervure principale de *T. numidicus*
(Cliché de Kouch M.)

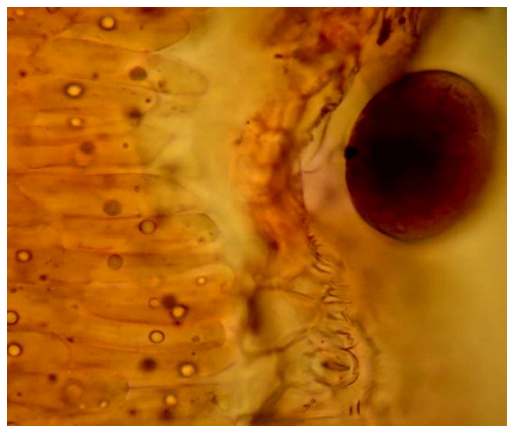


Photo 15 : Détail des stomates sur la face supérieure (Cliché de Kouch M.)

- **Tige**

En observant les coupes transversales réalisées sur les tiges de *T. numidicus*, nous avons pu apprécier l'aspect quadrangulaire de celles-ci, caractère typique de la famille des Lamiacées et qui est dû aux amas de collenchyme sous-épidermique, en effet ces cellules rigides fusiformes à parois cellululosiques épaisses, contribuent à la solidité mécanique de la tige. L'appareil conducteur y est du type pachyte continu/cambium continu (Photo 16).

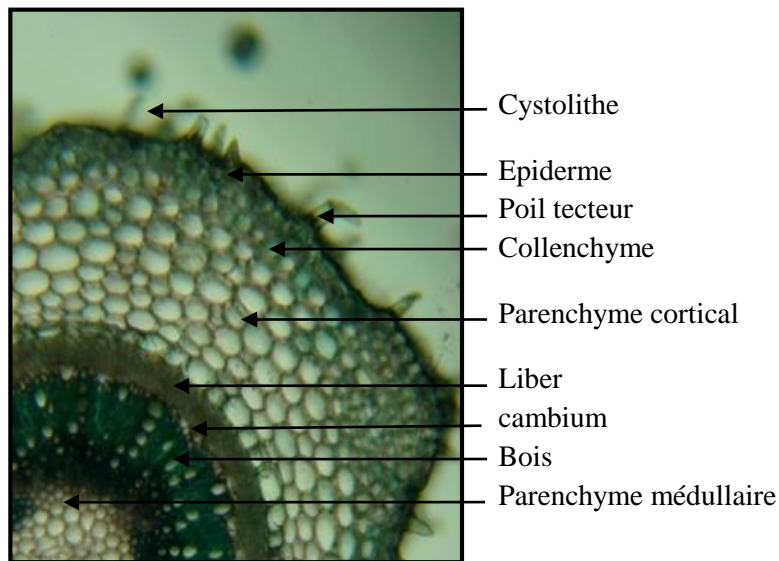


Photo 16: Structure secondaire d'une tige jeune de *T. numidicus* (Cliché de Kouch M.)



Photo 17: Ecorce de la tige avec Cystolithe (Cliché de Kouch M.)

Le tissu de revêtement est l'épiderme, il est constitué par une couche unique de cellules recouvertes d'une cuticule plus au moins épaisse conférant aux cellules leur imperméabilité. L'épiderme émet des prolongements pour former des poils tecteurs et des cystholites. Mais dans le stade avancé, le thym voit sa moelle se résorber, ce qui limite les tissus hydrophiles au seul phloème secondaire et le remplacement de l'épiderme par le suber, un tissu d'origine secondaire (Photo 18).

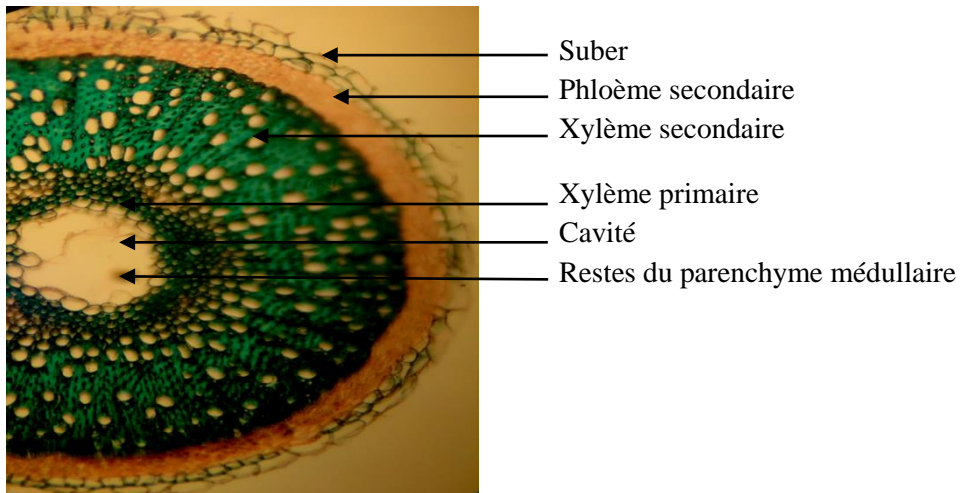


Photo 18: Structure secondaire d'une tige âgée de *T. numidicus* (Cliché de Kouch M.)

L'observation microscopique de la feuille et de la tige jeune du Thym de Numidie révèle que l'anatomie de cette plante comporte beaucoup plus de tissus celluloseux hydrophiles que des tissus lignifiés hydrophobes. On en déduit que le Thym requiert une importante humidité mais en même temps il est capable de résister à la saison sèche grâce à ses multiples prédispositions adaptatives.

- **Racine**

La racine âgée est de structure très simple, constituée principalement de xylème secondaire surmonté d'un phloème secondaire et protégée par du suber (Photo 19).

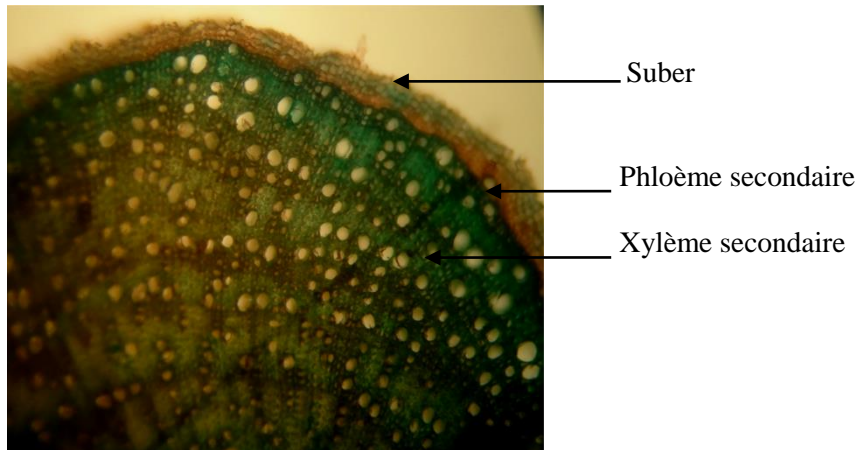


Photo 19 : Structure d'une racine âgée de *T. numidicus* (Cliché de Kouch M.)

2.5. Adaptation physiologique

2.5.1. Screening phytochimique

Les résultats du criblage phytochimique sont représentés dans le tableau 15 et les figures ci-dessous.

Tableau 15 : Criblage chimique des feuilles de *Thymus numidicus*

Composant chimique	Présence / absence
Alcaloïdes	-
Tanins catéchiques	+
Tanins galliques	-
Saponines	-
Coumarines	-
Terpènes et stérols	+
Flavonoïdes	+

(+) présence/ (-) absence

Le screening phytochimique des alcaloïdes, des saponines ainsi que des coumarines s'est révélé négatif, il a été cependant, positif pour les tanins, les flavonoïdes et les terpènes. Les tanins jouent un rôle défensif contre les herbivores. Ce sont des polyphénols peu toxiques mais abondants car ils ne sont efficaces qu'à forte dose : en se liant aux protéines, ils en diminuent la digestibilité (Marcel et al., 2000). Les flavonoïdes, quant à eux, remplissent de

nombreuses fonctions: pigments floraux, antifongiques, écrans UV, antioxydants... (Morel, 2000).

Les terpènes, par leur volatilité et leur odeur marquée constituent des éléments de la communication chimique (Bruneton, 1999). Ils auraient, aussi, un rôle de mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante. Ils réguleraient la transpiration diurne en absorbant les rayons ultraviolets par leurs constituants insaturés (Croteau, 1986). Les terpènes et spécialement les monoterpènes représentent la classe chimique qui nous intéresse, puisque ces derniers seraient à l'origine de l'effet antibactérien des huiles essentielles d'après plusieurs auteurs. (Dorman & Deans, 2000 ; Lambert et al., 2001 ; Thrombetta et al., 2002 ; Amarti et al., 2010)

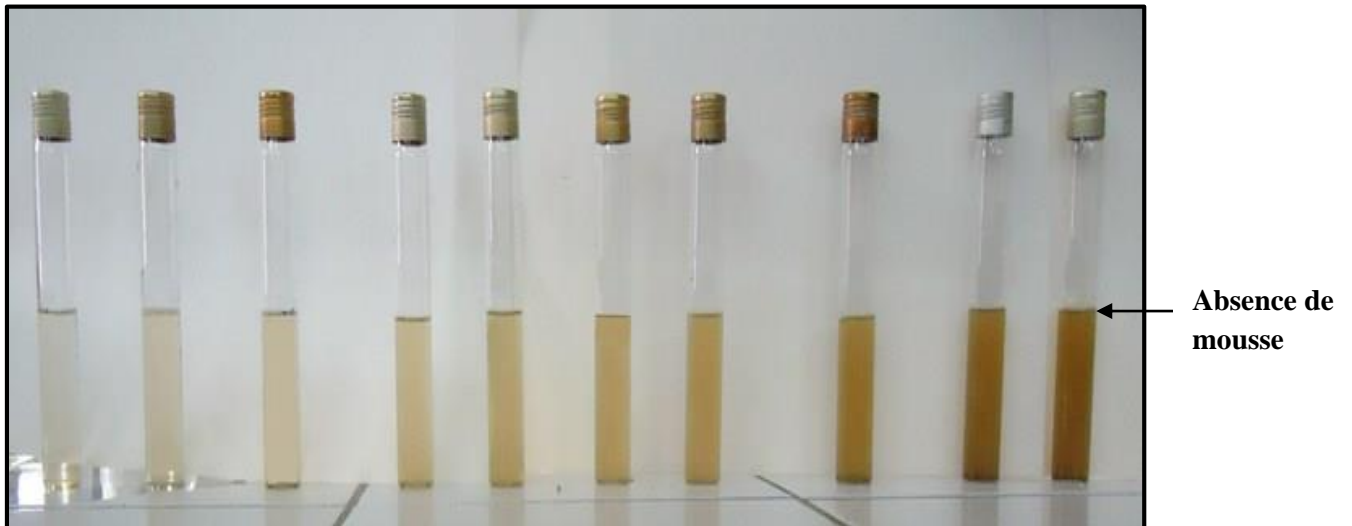


Photo 20: Screening des saponines



Photo 21: Screening des flavonoïdes

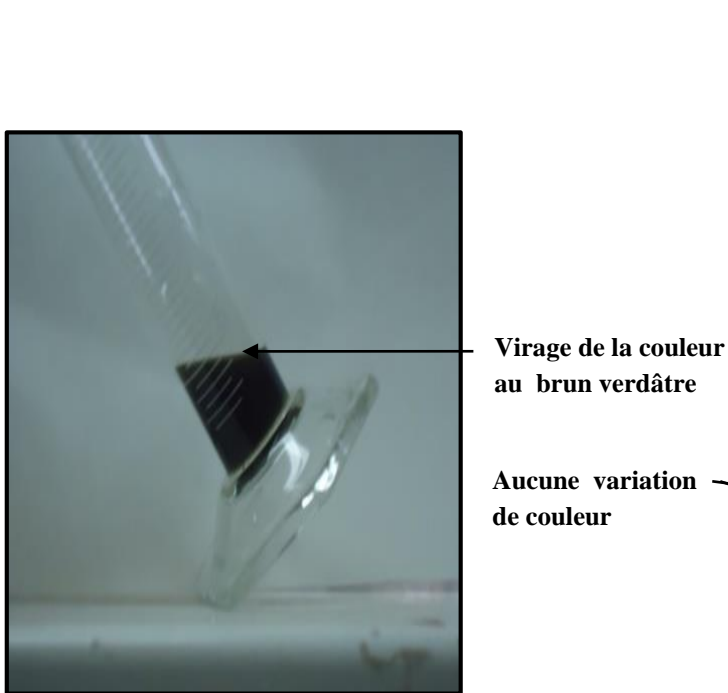


Photo 22: Screening des tannins

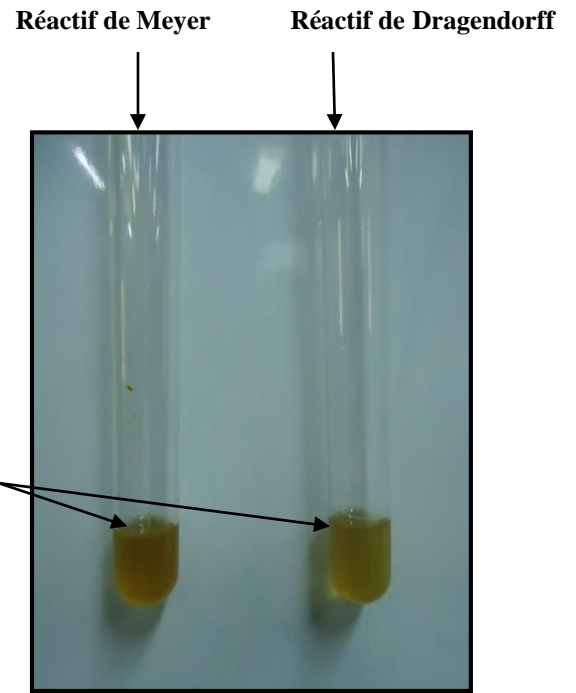


Photo 23: Screening des alcaloïdes

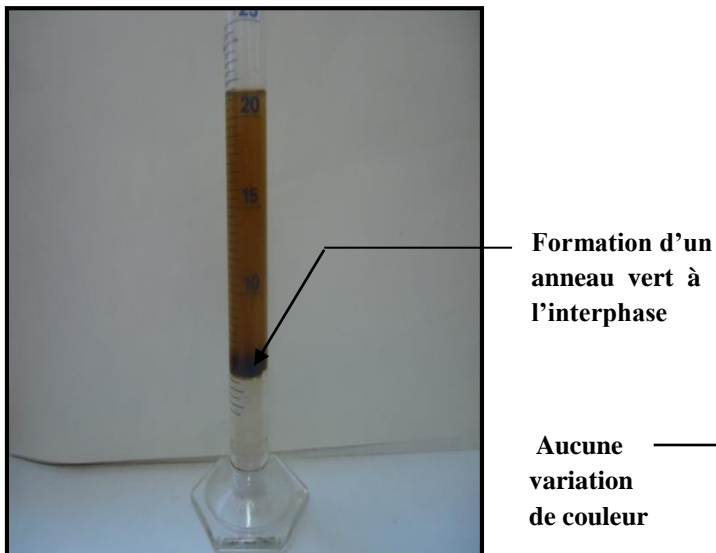


Photo 24: Screening des terpènes

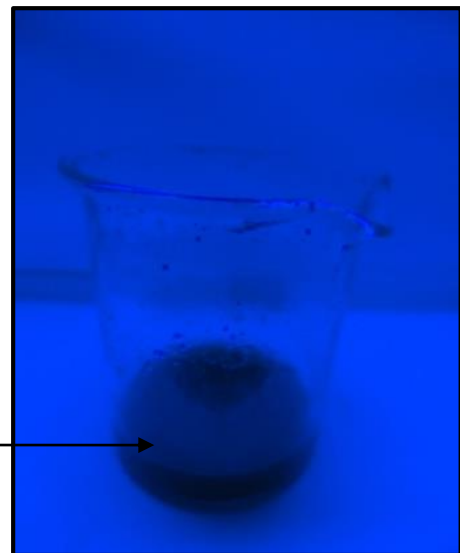


Photo 25: Screening des coumarines

2.5.2. L'huile essentielle de *T. numidicus*

2.5.2.1. Extraction et calcul du rendement

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation est de couleur jaune, elle a une saveur fortement piquante et une odeur forte caractéristique des plantes aromatiques. L'extraction de l'huile essentielle a donné un rendement de 1,92% pour une prise d'essai de 100 gr de matière végétale sèche. Ce rendement peut être considéré comme important si on le compare à celui rapporté par **Hadef et al., (2004)**, lors d'un travail réalisé sur la même espèce, poussant dans le même biotope et qui est de 1,1%. Même constatation quant aux résultats de **Djeddi et al., (2015)** qui ont obtenu un rendement de 1,02% pour la même espèce récoltée à Annaba en période de floraison.

Des rendements plus élevés ont été rapportés par **Ghorab et al., (2014)**, ils sont de l'ordre de 2% pour l'huile essentielle de *T. numidicus* de la région de Constantine et de 2,4% pour l'huile essentielle de *T. numidicus* de la région d'Azzazga.

Les divergences observées seraient dues à plusieurs facteurs, notamment les facteurs bioclimatiques et environnementaux, Il ne faut pas perdre de vue, l'effet de la technique d'extraction sur le rendement (**Sanchez et al., 2010 ; Hosni et al., 2013**), car aussi importants soient-ils les rendements qui découlent de l'hydrodistillation restent relativement faibles.

2.5.2.2. Composition chimique

L'analyse des constituants chimiques de l'huile essentielle de *T. numidicus* a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à spectroscopie de masse, les résultats obtenus sont représentés dans le tableau n°16.

Tableau 16: Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* Poiret

Composants	RT (min)	Pourcentage
α -phellandrène	7,59	0.2
α - pinène	7,71	1.01
δ - 3- carène	8,19	0.18
α -terpinène	10,67	0.40
p- cymène	10,85	10.10
γ - terpinène	12,10	6.38
β -pinène	13,63	3.16
bornéol	15,83	0.2
Thymol	20,37	77.5
carvacrol	23,24	0.17
Guaia 3,9 diène	26,10	0,2
γ -cadinène	27,26	0.08
δ -cadinène	27,51	0.4

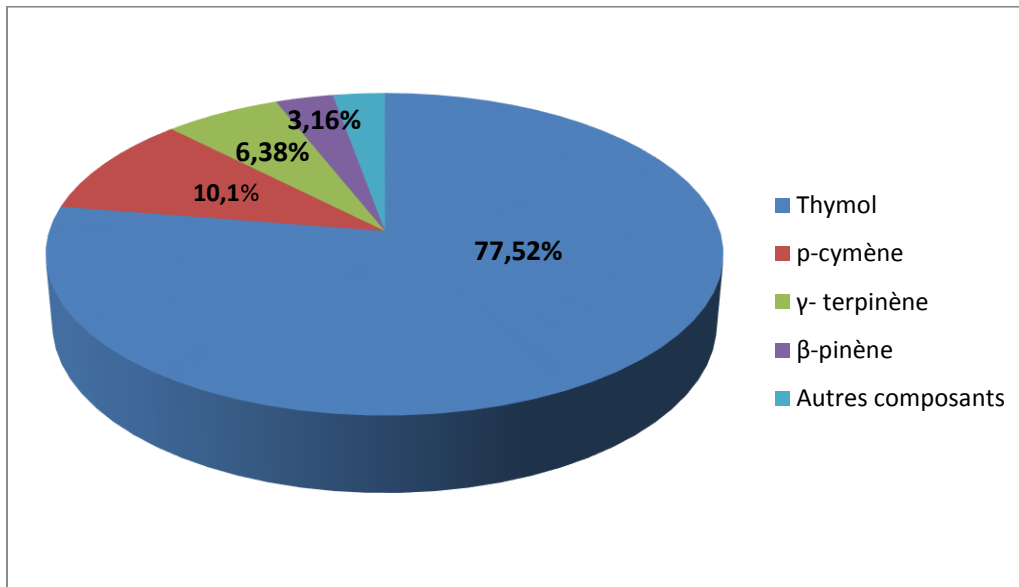


Figure 15 : Composants majoritaires de l'huile essentielle de *T. numidicus*

L'analyse de l'huile essentielle par CPG/SM a révélé la présence de 13 composants, principalement des phénols et des terpènes dont le Thymol est l'élément majoritaire avec 77,52%. Les autres constituants importants sont respectivement le *P*-cymène (10,10%), le γ -terpinène (6,38%) et le β -pinène (3,16%), le carvacrol quant à lui est à l'état de traces (0,17%). (Fig.15).

En 2007, **Hadef et al.** ont trouvé chez la même espèce dans la même région 11 constituants dont le thymol est également le composant majoritaire avec seulement 49,4% (Tab.17). On peut, d'emblée, remarquer la forte teneur de notre huile essentielle en thymol. Des divergences au niveau des teneurs de certains composants sont aussi à noter, comme la présence de carvacrol à l'état de trace dans notre huile essentielle, ou encore l'absence de linalool.

Les travaux de **Saidj et al., (2008)** qui ont porté sur *Thymus numidicus* de la région de Yakouren (Tizi Ouzou) récoltées au mois d'avril de l'année 2004 ont montré une prédominance des composés oxygénés dont le thymol (51%) et le carvacrol (9,4%), mais aussi une faible proportion de *p*-cymène (0,5%), alors qu'un tout autre chémotype a été identifié par METICA en 2013, lors d'une étude menée sur l'huile essentielle de *Thymus numidicus* de la région de Bejaia et qui est principalement riche en carvacrol (46,8%) en *P*-cymène (21,2%) et en γ -terpinène (5,9%). **Ghorab et al., (2014)** qui ont mené une étude comparative sur les huiles essentielles de *Thymus numidicus* de plusieurs régions d'Algérie démontrent l'existence de plusieurs chémotypes, l'huile essentielle de la région de Constantine est de chémotype thymol/linalol, celle de Djebel el wahch est de chémotype thymol/carvacrol et celle de Azzazga est dominée par l' α -terpinéol et le thymol. L'huile essentielle de la Kabylie est quant à elle exempt de thymol, elle semble être de chémotype carvacrol/*p*-cymène. (Tab.17)

Tableau 17 : Comparaison entre les composants majoritaires de l'huile essentielle de *T. numidicus* provenant de différentes régions d'Algérie

Composants	Pourcentages				
	Constantine	Constantine (Djebel el wahch)	Azzazga (foret de Yakouren)	Kabylie	Berrahal 2007
<i>o</i> -cymène	11,41	/	/	/	/
<i>p</i> -cymène	/	/	6,70	8	10,1
γ -terpinène	10,84	/	8,4	/	11,7
Linalool	17,20	11,50	/	/	10
Thymol					
méthyle- éther	6,73	/	/	/	/
α -terpinéol	/	/	34,40	/	/
Thymol	23,92	68,20	15	/	49,9
Carvacrol	6,02	16,90	6,80	28,10	2,5

D'après plusieurs auteurs (Svoboda et al., 1999 ; Ruberto et al., 2000 ; Thompson et al., 2003 ; Karousou et al., 2005 ; Sanchez et al., 2010), les variations dans la composition chimique des huiles essentielles du point de vue qualitatif et quantitatif sont dues à des facteurs génétiques, à des facteurs écologiques, à la partie de la plante étudiée, à l'âge de celle-ci et enfin à son stade de développement. Ce dernier facteur peut être tributaire des divergences existants entre les résultats de Hadeff et les nôtres, en effet la récolte de *Thymus numidicus* de l'année 2011 a été réalisée avant floraison, on constate malgré cela une forte concentration en thymol (77.5%).

Outre l'absence de certains composants, on note la présence de leurs précurseurs, on peut donc déduire leur formation ultérieure au cours du cycle végétatif, on constate notamment la présence du carvacrol à l'état de traces mais aussi la présence du *p*-cymène qui en est le précurseur (Simon, 1973 ; Burt et al., 2007). On observe également l'absence de linalool dans l'huile essentielle de 2011, les variations climatiques peuvent être mises en cause car elles ont une incidence majeure sur la composition chimique des huiles essentielles, surtout chez les espèces qui possèdent des structures histologiques de stockage superficielles tel que les poils sécréteurs chez les lamiacées, car lorsque la localisation de l'huile essentielle

est profonde sa qualité est beaucoup plus constante (Bruneton, 1993). Le moindre facteur extérieur aussi minime soit-il peut avoir une influence sur les composants des huiles essentielles, c'est ce qui a été rapporté par Moghddam et al., (2011), qui affirment que la durée de l'exposition à la lumière augmente considérablement la teneur en huile essentielle ainsi que la qualité des ses composants actifs.

3. Etude thérapeutique

3.1. Activité antioxydante

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle a été évaluée par le test du piégeage du DPPH, elle a été exprimée par le calcul de l'IC 50. Une fois obtenue, cette valeur a été comparée à celle du BHT et de l'acide ascorbique qui sont des antioxydants synthétiques de référence. Les figures 16, 17 et 18 représentent respectivement le suivi de la réduction du DPPH en solution par le BHT, par l'acide ascorbique et par l'huile essentielle de *Thymus numidicus*.

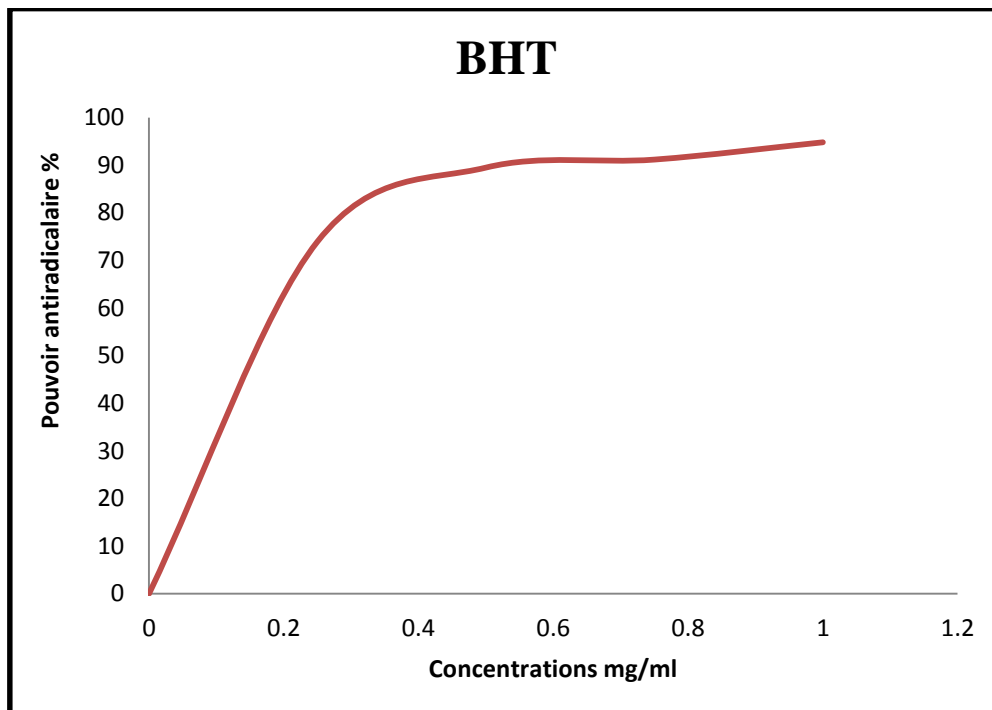


Figure 16 : Activité antiradicalaire du BHT
(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm 0,02$)

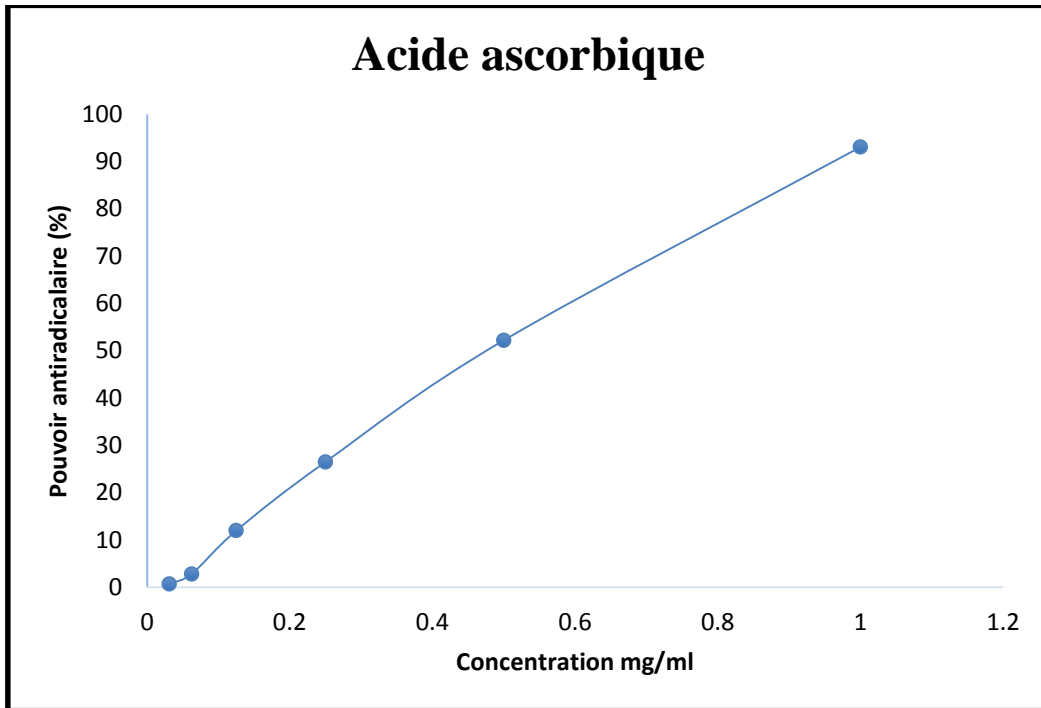


Figure 17 : Activité antiradicalaire de l'acide ascorbique
(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm 0,004$)

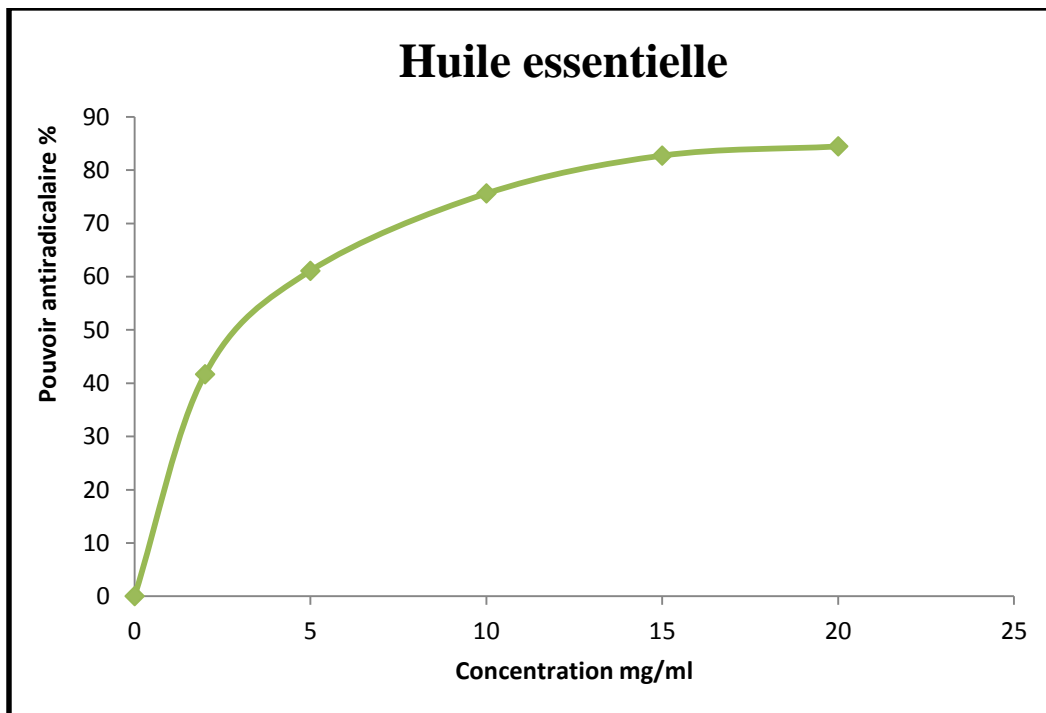


Figure 18 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle de *Thymus numidicus*.
(Chaque valeur représente la moyenne de trois essais $\pm 0,07$)

Les résultats obtenus nous permettent de constater que l'activité antiradicalaire est dose dépendante, comme cela a été rapporté par plusieurs auteurs (**Popovici et al., 2009 ; Dongmo et al., 2010**), car elle augmente avec l'augmentation de la concentration de l'antioxydant dans le milieu réactionnel, aboutissant à un plateau qui correspond à l'éradication presque totale du DPPH.

La cinétique du pourcentage antiradicalaire nous a permis de déterminer l'IC₅₀, qui correspond à la concentration d'huile essentielle, de BHT ou d'acide ascorbique nécessaire à l'inhibition de 50 % du DPPH présent dans le milieu. La valeur obtenue est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante du composé testé.

Dans la présente étude, l'IC₅₀ de l'huile essentielle de *T. numidicus* a été estimé à $2,51 \pm 0,07$ mg/ml. Ce résultat témoigne d'une capacité réductrice modeste, comparée à celle du BHT ($0,17 \pm 0,02$ mg/ml) et de l'acide ascorbique ($0,51 \pm 0,004$ mg/ml).

Les résultats des travaux réalisés sur notre espèce sont divergents, ceux de **Djeddi et al., (2015)** qui ont travaillé sur *T. numidicus* d'Annaba sont en accord avec les nôtres, puisque l'IC₅₀ rapporté s'élève à 2,26 mg/ml. Ceci dit les résultats obtenus par **Hazzit et al., (2006)** attestent que l'huile essentielle de *T. numidicus* récolté au centre algérien (Azzazga) est dotée d'un fort potentiel antioxydant. L'huile essentielle en question est de chémotype α -terpinéol.

De faibles potentiels antiradicalaires ont également été observés chez *T. lotocephalus* (**Costa et al., 2012**) et *T. algeriensis* (**Hazzit et al., 2009**).

D'après **Ruberto et al., (2000)**, les composés terpéniques sont à l'origine de l'activité antioxydante des huiles essentielles, leur mécanisme d'action est le piégeage des radicaux libres par transfert d'un atome d'hydrogène sur le DPPH qui devient stable sous sa forme DPPHH. (**Sanchez et al., 1998 ; Molyneux et al., 2004**).

Des études ont également démontré que l'effet antioxydant d'un composé est non seulement dose-dépendant mais aussi structure-dépendant (**Rodriguez et al. 2009**), Il existerait donc une relation entre la structure chimique des composés phénoliques et leur pouvoir piégeur des radicaux libres, l'activité antiradicalaire dépendrait ainsi du nombre, de la position et de la nature des groupements présents sur les différents composés (**Nanjo et al. 1996 ; Pannala et al. 2001 ; Karamac et al. 2005 ; Tabart et al. 2009**),

la polarité des composés influencerait aussi sur leur pouvoir antioxydant selon certains auteurs (**Karamac et al., 2005 ; Hatzidimitriou et al., 2007**).

Malgré la forte teneur de notre huile essentielle en terpènes notamment en thymol, sa capacité antioxydante est relativement faible, ceci peut être du à l'absence de certains composés comme le linalool et au faible taux de certains autres comme le carvacrol. Car il serait erroné d'attribuer le pouvoir antioxydant d'une huile essentielle à un simple composé puisque celle-ci présente un mélange complexe de composés qui agissent ensemble.

Le stade de développement de la plante pourrait avoir un effet sur son activité antioxydante, c'est ce qui a été démontré par **Bounatirou et al., (2007)**, lors d'une étude menée sur *T. capitatus*. Après avoir été modeste au stade végétatif, l'activité antiradicalaire de l'espèce a été remarquablement forte après floraison. Cette dernière semble avoir une activité similaire à celle du BHT.

3.2. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle a été évaluée sur un total de 49 souches bactériennes, sur lesquelles une étude complète a été réalisée comprenant : l'étude du comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques, la détermination des diamètres des zones d'inhibition et enfin la détermination des CMI et des CMB. Afin d'interpréter nos résultats, nous nous sommes appuyés sur la littérature.

Selon **Sagdac et al., (2003)**, un extrait végétal serait doté d'une activité antibactérienne si son diamètre d'inhibition est supérieur à 12 mm.

Une interprétation plus précise a été apportée par **Duraffour (1987)**, selon ce dernier, une souche bactérienne est considérée comme résistante (-) à un extrait végétal si son diamètre d'inhibition est égal à 6 mm ou inférieur à 8 mm, elle serait de sensibilité limitée (+) si son diamètre d'inhibition est compris entre 8 et 14 mm, de sensibilité moyenne (++) si son diamètre d'inhibition est compris entre 14 mm et 20 mm et enfin très sensible (+++) si son diamètre d'inhibition est supérieur à 20 mm.

Aligiannis et ses collaborateurs (2001) ont proposé une classification des extraits végétaux sur la base des résultats des CMI, selon eux l'extrait étudié posséderait une forte inhibition si sa CMI est inférieure à 0,5 mg/ml, elle serait modérée si elle est comprise entre 0,6 et 1,5 mg/ml et enfin faible si elle est supérieure à 1,6 mg/ml.

3.2.1. *Staphylococcus aureus*

L'analyse du comportement des souches de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des antibiotiques nous a démontré que celles-ci sont résistantes à de nombreux ATB, notamment à la céfoxitine (100%), au céfotaxime (90%), à la pénicilline G (80%) et à la rifampicine (70%). Elles sont aussi moyennement résistantes à la gentamicine (50%) et totalement sensible à la ciprofloxacine et à la tetracycline (Fig. 19)

Ces mêmes souches se sont montrées très sensibles à l'huile essentielle testée puisque les diamètres des zones d'inhibitions sont très importants, ils sont compris entre 32 et 78 mm, la CMI quant à elle est de 0,34 mg/ml. (Tab.18)

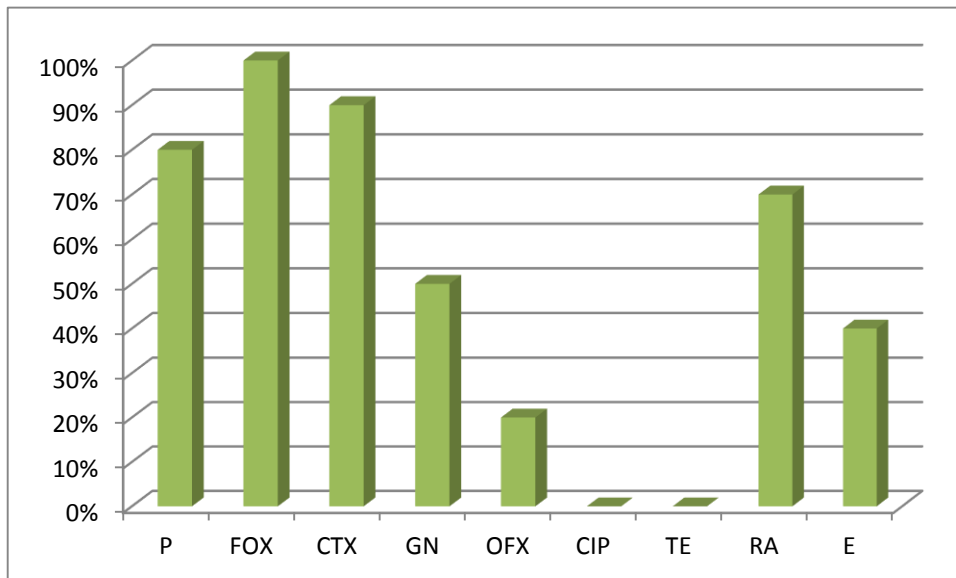


Figure 19 : Pourcentages de résistance des souches SARM aux ATB

Tableau 18: Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. numidicus*
vis-à-vis des souches SARM

Souches	Sensibilité à l'HE	CMI (mg/ml)	CMI (%)	CMB (mg/ml)	CMB (%)
S 43300	+++	0,34	0,05	0,67	0,1
S 25923	+++				
S 13	+++				
S 14	+++				
S 47	+++				
S 119	+++				
S 178	+++				
S 182	+++				
S 186	+++				
S 187	+++				

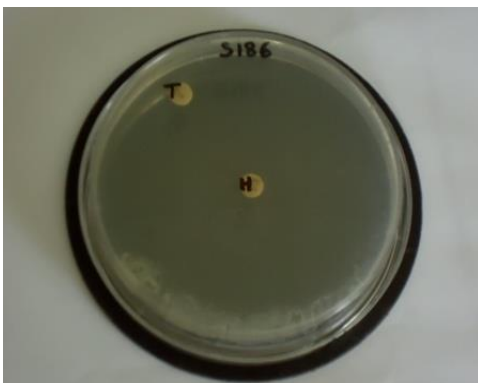


Photo 26: Aromatogramme de la souche
SARM 186



Photo 27: Aromatogramme de la souche
SARM 182

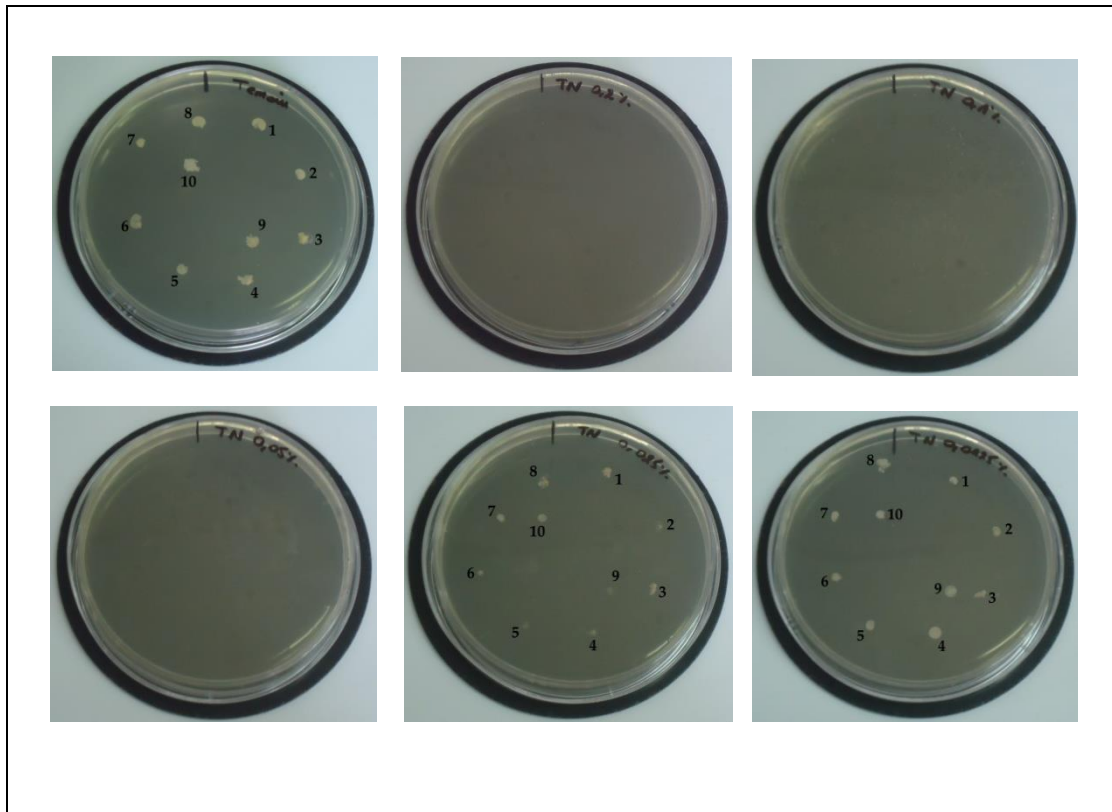


Photo 28: Détermination des CMI des souches SARM

3.2.2. *Acinetobacter spp*

Les souches d'*Acinetobacter spp* sont totalement résistantes à la céftazidim, à l'association ticarcilline-acide clavulanique, à la ticarcilline, à la pipéracilline et à la fosfomycine, elles affichent aussi 90% de résistance à l'aztréonam, 80% de résistance au chloramphénicol, 70% de résistance à l'imipénème, et 60% de résistance à la gentamicine. Elles sont cependant sensibles à l'amikacine et à la colistine (Fig.20). Ces souches sont les plus sensibles à l'action de l'huile essentielle de *T. numidicus*, elles affichent des diamètres d'inhibition allant de 32 à 65 mm et une CMI de 0,16 mg/ml (Tab.19)

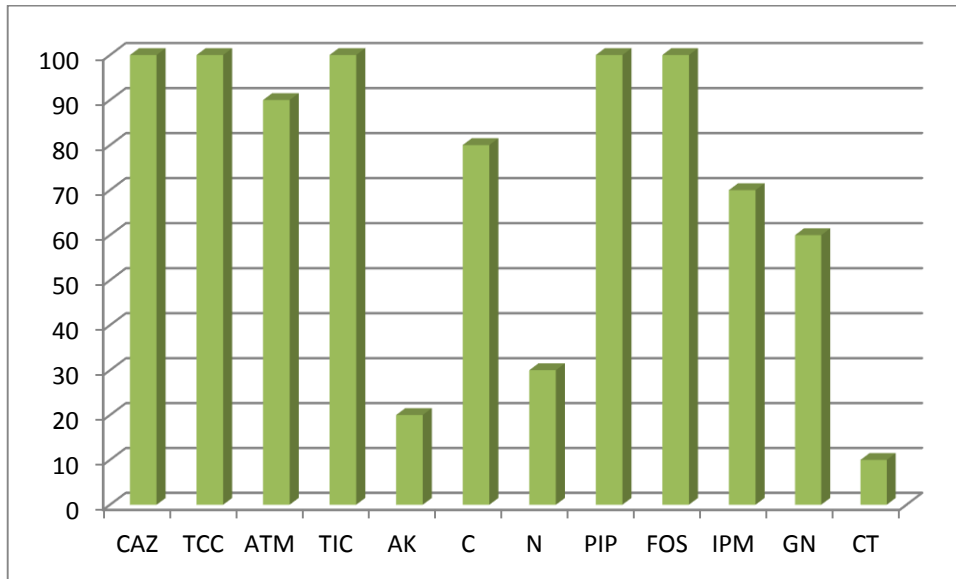


Figure 20 : Pourcentage de résistance des souches d'*Acinetobacter* spp aux ATB

Tableau 19 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. numidicus* vis-à-vis des souches d'*Acinetobacter* spp

Souches	Diamètres d'inhibition (mm)	CMI (mg/ml)	CMI (%)	CMB (mg/ml)	CMB (%)
S 27	39	0,16	0,025	0,16	0,025
S 64	32				
S 70	56				
S 141	65				
S 143	52				
S 144	49				
S 213	63				
S 237	47				
S 239	62				
S 241	48				



Photo 29 : Aromatogramme de la souche *Acinetobacter spp 213*

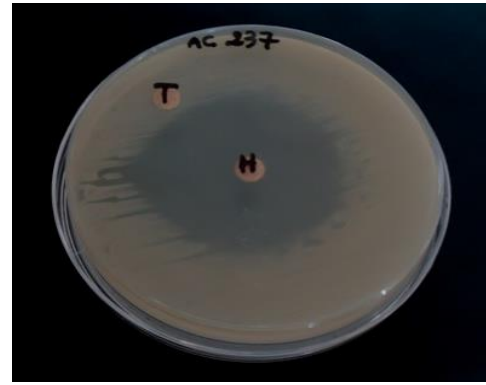


Photo 30: Aromatogramme de la souche *Acinetobacter spp 237*

3.2.3 *Klebsiella pneumoniae*

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* ont exprimé une forte résistance aux ATB avec 100% de résistance à l'amoxiciline, à l'association amoxiciline –acide clavulanique et à la colistine, 90% de résistance à la céfazoline, céfotaxime, céfoxitine et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole et 80% de résistance à la gentamycine. Elles sont cependant sensibles à la pefloxacine et à la ciprofloxacine. (Fig.21)

Ces souches ont certes montré une sensibilité vis-à-vis de l'huile testée avec des diamètres allant de 27 à 50 mm, cette sensibilité reste toutefois moins importante que celle des autres souches puisque la CMI obtenue est de 1,33 mg/ml (Tab.20).

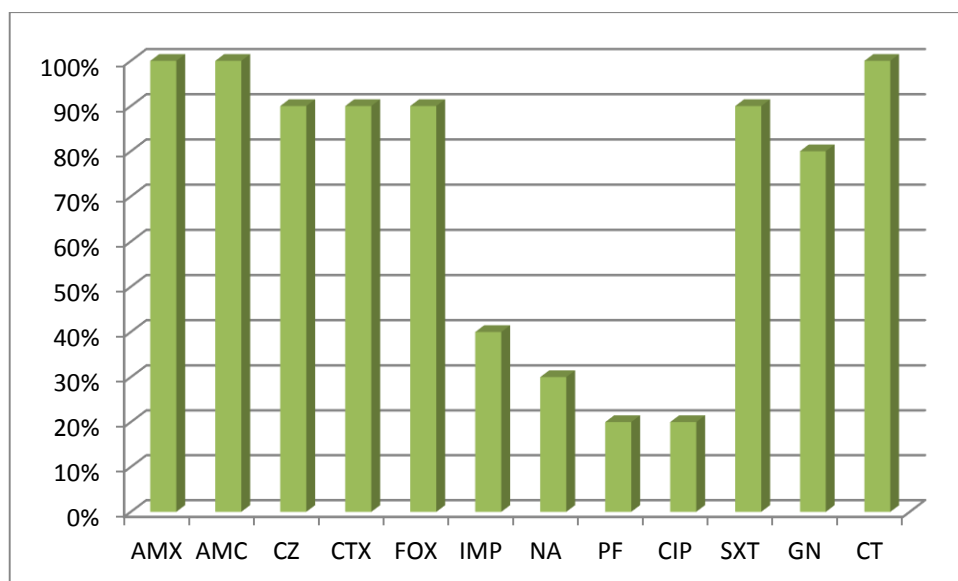


Figure 21 : Pourcentages de résistance des souches de *Klebsiella pneumoniae* aux ATB

Tableau 20: Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. numidicus* vis-à-vis des souches de *Klebsiella pneumoniae*

Souches	Sensibilité à l'HE	CMI (mg/ml)	CMI (%)	CMB (mg/ml)	CMB (%)
S 20	++	1,33	0,2	1,33	0,2
S 58	+++				
S 104	+++				
S 113	+++				
S 126	+++				
S 138	+++				
S 158	++				
S 197	+++				
S (kpc-)	+++				
S (kpc+)	++				



Photo 31 : Aromatogramme de la souche *Klebsiella pneumoniae* Kpc-



Photo 32: Aromatogramme de la souche *Klebsiella pneumoniae* 104

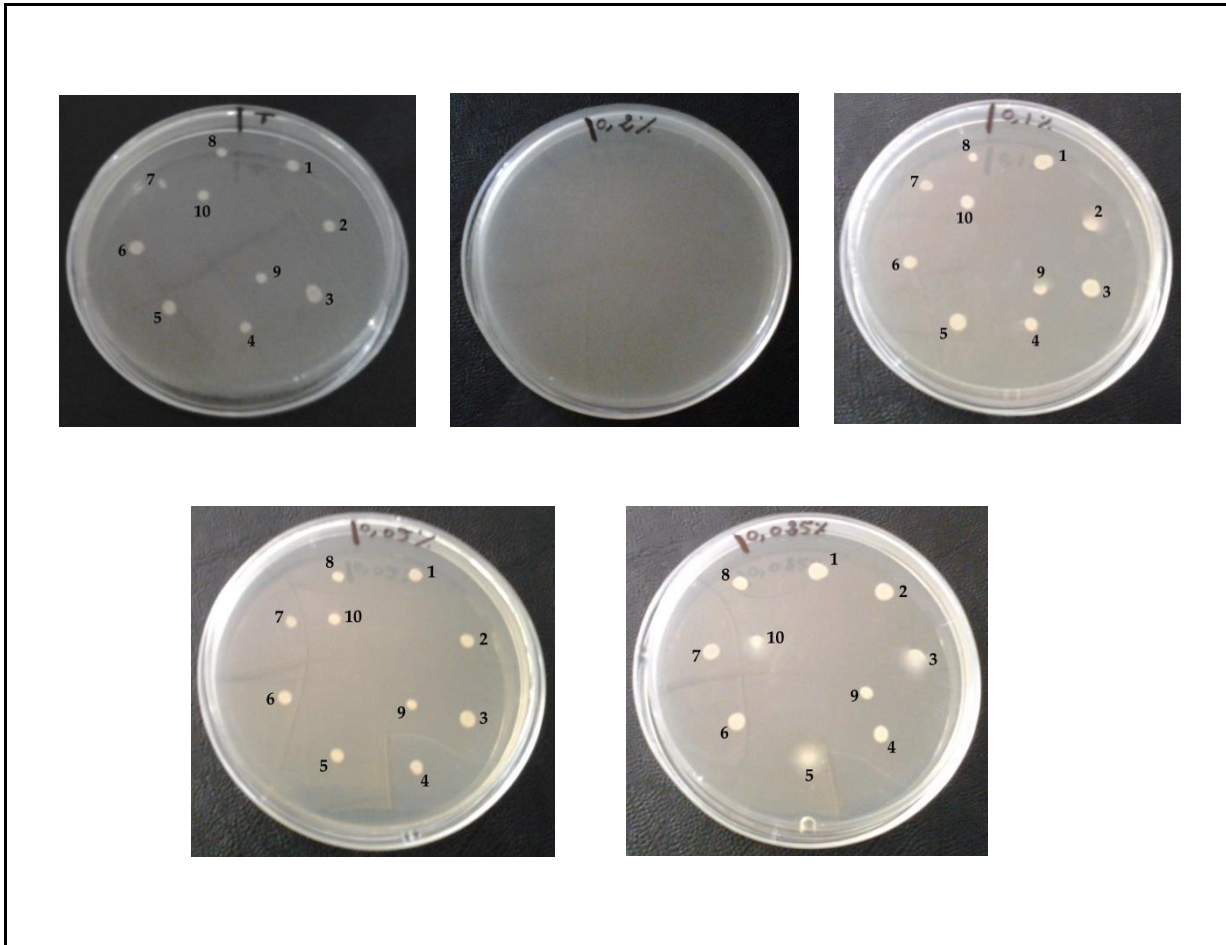


Photo 33 : Détermination de la CMI des souches de *Klebsiella pneumoniae*

3.2.4. *Escherichia coli*

L'antibiogramme des souches d'*Escherichia coli* révèle que ces souches expriment une forte résistance à l'amoxiciline (100%), à l'association amoxiciline-acide clavulanique (80%), à l'acide nalidixique (80%), à la pefloxacine (70%) et à la colistine (70%). Elles sont moyennement résistantes à la ciprofloxacine et à l'association Triméthoprime-sulfaméthoxazole. Elles sont néanmoins sensibles à l'imipénème et au céfotaxime (Fig.22).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE sur ces souches sont tout à fait satisfaisants, les diamètres obtenus vont de 49,1 à 69 mm et la CMI varie entre 0,34 et 0,67 mg/ml (Tab.21).

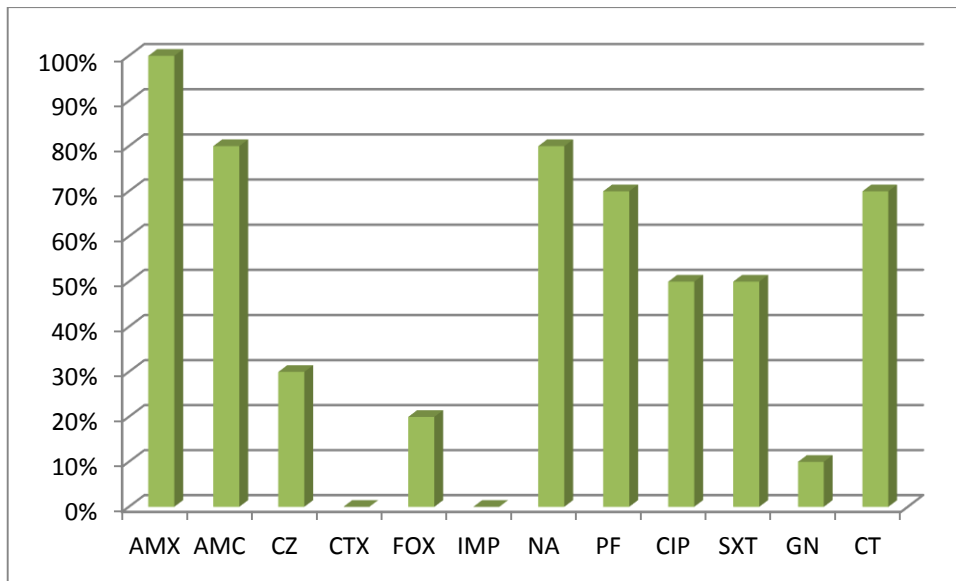


Figure 22 : Pourcentage de résistance des souches d'*Escherichia coli* aux ATB

Tableau 21: Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. numidicus* vis-à-vis des souches d'*Escherichia .coli*

Souches	Sensibilité à l'HE	CMI (mg/ml)	CMI (%)	CMB (mg/ml)	CMB (%)
S 11	+++	0,34	0,05	0,67	0,1
S 25	+++	0,67	0,1	0,67	0,1
S 26	+++	0,34	0,05	0,34	0,05
S 35	+++	0,34	0,05	0,34	0,05
S 42	+++	0,67	0,1	0,67	0,1
S 46	+++	0,67	0,1	0,67	0,1
S 52	+++	0,34	0,05	0,67	0,1
S 53	+++	0,34	0,05	0,34	0,05
S 122	+++	0,67	0,1	0,67	0,1
S 199	+++	0,67	0,1	0,67	0,1

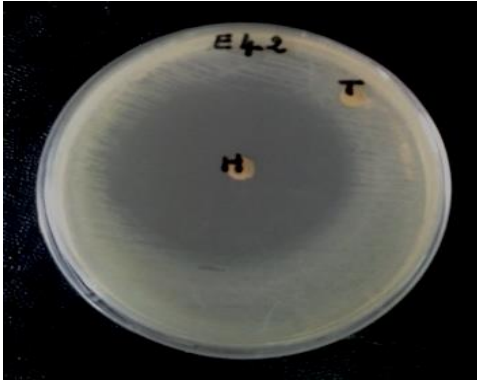


Photo 34 : Aromatogramme de la souche *Escherichia coli* 42

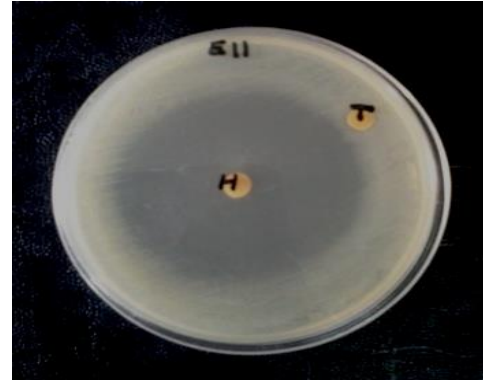


Photo 35: Aromatogramme de la souche *Escherichia coli* 11

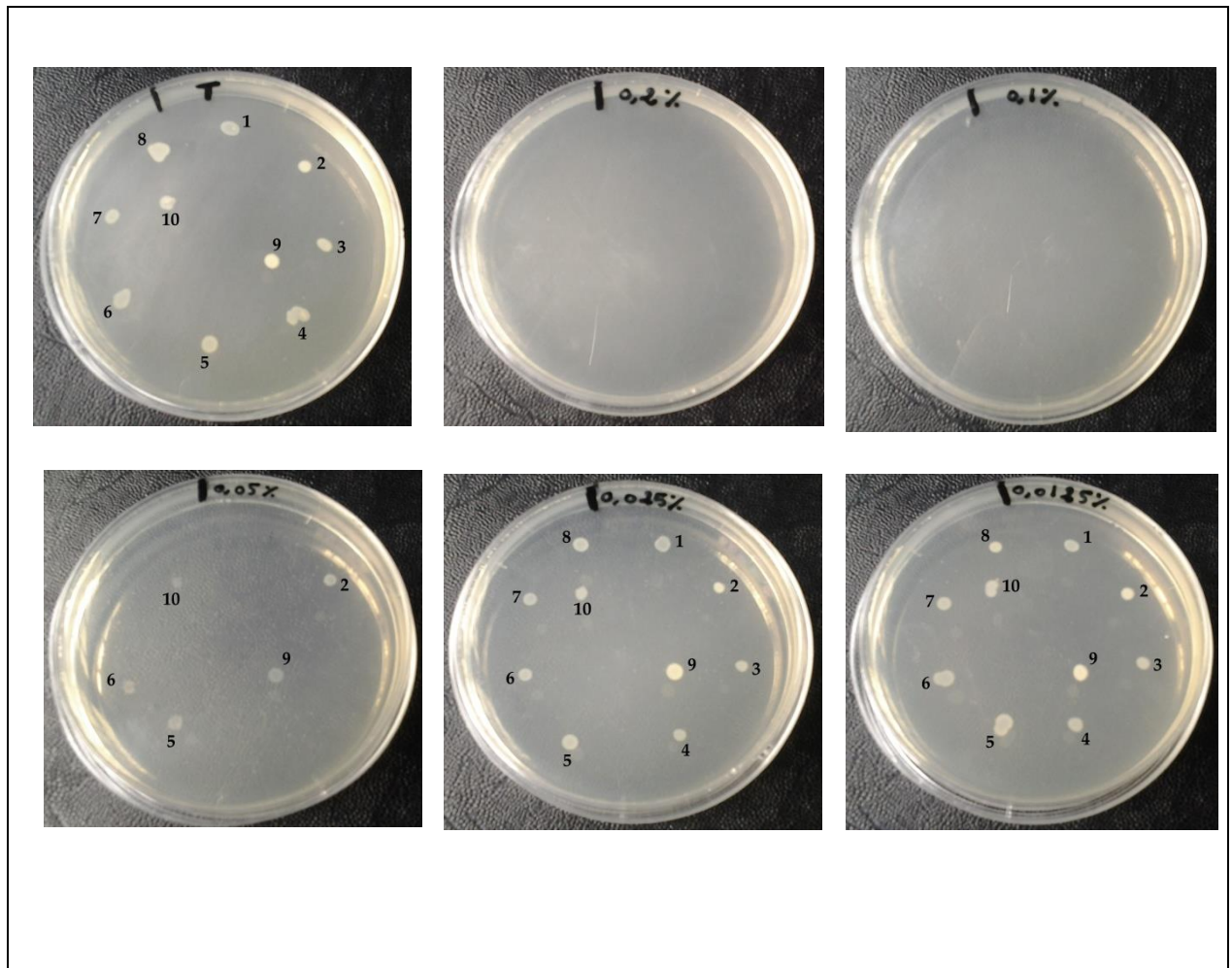


Photo 36 : Détermination de la CMI des souches d'*Escherichia coli*

3.2.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Enfin les souches de *Pseudomonas aeruginosa* sont totalement résistantes à l'imipénème, elles expriment aussi 45% de résistance à l'aztréonam, ticarcilline, fosfomycine, chloramphénicol et l'association ticarcilline-acide clavulanique, elles sont cependant sensibles à l'amikacine et l'acide nalidixique (Fig.23). Malgré la résistance des bactéries gram négative aux huiles essentielles (Trombetta et al. 2005 ; Burt et al. 2007), celle de *Thymus numidicus* présente une activité intéressante vis-à-vis des souches de *Pseudomonas aeruginosa*, avec des zones d'inhibition allant de 17,5 à 55 mm. La CMI obtenue et qui est de 0,4 mg/ml est très intéressante et dénote une forte activité de cette huile sur l'espèce bactérienne en question. (Tab.22)

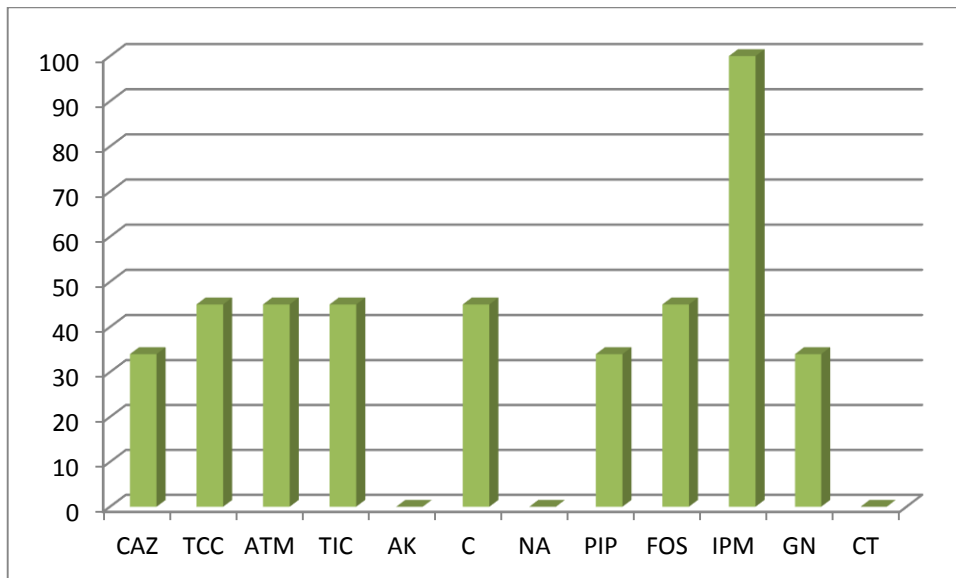


Figure 23: Pourcentage de résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux ATB

Tableau 22 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* vis-à-vis des souches de *Pseudomonas aeruginosa*

Souches	Sensibilité à l'HE	CMI (mg/ml)	CMI (%)	CMB (mg/ml)	CMB (%)
S ATCC 25853	+++	0.4	0,06	0.4	0,06
S 36	+++				
S 67	++				
S 71	+++				
S 72	+++				
S 74	+++				
S 87	+++				
S 139	++				
S 218	++				



Photo 37 : Aromatogramme de la souche *Pseudomonas aeruginosa* 67

Conclusion partielle

L'exposition excessive et massive de certaines populations bactériennes aux antibiotiques, engendre des résistances au sein de celles-ci, menant à de véritables impasses thérapeutiques, en effet les bactéries ont recourt à un arsenal de mécanismes de résistance, l'un d'entre eux est l'inactivation enzymatique, par production d'enzymes capables de modifier ou de détruire un ATB donné, c'est ce qui cause la résistance aux β -lactamines (pénicillines et céphalosporines), aux aminosides et aux phénicolés. L'acquisition de plasmides portant des gènes de résistance à certains antibiotiques pose aussi un sérieux problème car elle est transférable, les gènes en cause se situent sur des supports mobiles, la transmission se fait via intégrons situés dans des plasmides de conjugaisons (Poirel et al., 2000 ; Grall et al., 2011) ce qui cause une grande dissémination des souches résistantes.

Les bactéries ont également la faculté de modifier la constitution de leur propre membrane cytoplasmique et créer des mutations chromosomiques au niveau de la cible de certains antibiotiques, réduisant l'affinité de l'antibiotique pour sa cible et rendant sa fixation impossible (Avril, 1999 ; Xian-Zhi, 2005 ; Honoré et al., 2006), c'est le cas de la résistance aux quinolones, qui est due à une mutation au niveau de l'ADN gyrase cible. A titre d'exemple, la résistance de *Staphylococcus aureus* à la méticilline, qui est due à une modification au niveau des protéines liant les pénicillines (PLP).

Un tout autre mécanisme est établi par les entérobactéries ; c'est l'expression de plusieurs systèmes d'efflux, procurant à ces souches la capacité d'expulser les antibiotiques dans le milieu extérieur à la manière d'une pompe, en utilisant l'énergie du gradient électrochimique de la membrane plasmique (Bert et al., 1999 ; Barbier et Wolff., 2010), la diminution de la perméabilité de cette dernière est l'une des stratégies adoptée par certaines souches comme *Pseudomonas aeruginosa*, qui acquièrent une résistance à l'imipénème par perte d'une porine (Chun-Xin, 2006).

Face à ces résistances, des solutions alternatives doivent être envisagées notamment le recours aux huiles essentielles. D'après la présente étude, l'huile essentielle de *Thymus numidicus*, jouit d'un large spectre d'action puisqu'elle est efficace tout aussi bien sur les bactéries Gram- que sur les Gram+. Nos résultats sont nettement supérieurs à ceux rapportés par plusieurs auteurs, notamment ceux de Zhiri et al., (2010), qui ont testé l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *T. satureioides* sur un large spectre bactérien, celle-ci

a affiché une CMI de 0,35% pour les souches d'*E. coli*, 0,47% pour *K. pneumoniae*, 0,49% pour *A. baumannii*, 0,29% pour *S. aureus* et une CMI supérieure à 10% pour les souches de *P. aeruginosa*.

Hussain et al., (2009) ont évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles de 3 espèces de Thym vis-à-vis des souches de *S. aureus*, de *P. aeruginosa* et d'*E. coli*. L'huile essentielle de *T. linearis* à chémotype thymol a donné respectivement les CMI de 0,16 mg/ml, 1,25 mg/ml et 2,08 mg/ml. *T. vulgaris* à chémotype thymol a donné respectivement les CMI de 0,16 mg/ml, 1,25 mg/ml et 0,83 mg/ml. Enfin l'huile essentielle de *T. serpyllum* à chémotype carvacrol a donné respectivement les CMI de 0,21 mg/ml, 2,08 mg/ml et 1,04 mg/ml.

Le grand potentiel antibactérien de l'huile étudiée peut être expliqué par la présence de dérivés phénoliques qui sont à l'origine de l'effet antibactérien des huiles essentielles selon plusieurs auteurs (**Cosentino et al., 1999 ; Aligianni et al., 2001 ; Trombetta et al., 2002 ; Amarti et al., 2010**). Selon **Lambert et al., (2001)** l'activité antibactérienne de l'huile essentielle est attribuée en partie à sa forte teneur en thymol, qui se lie aux protéines membranaires et fait augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire bactérienne.

D'autres travaux suggèrent que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris celles impliquées dans la production énergétique et la synthèse des constituants structuraux (**Lambert et al., 2001 ; Trombetta et al., 2002 ; Walsh et al., 2003 ; Xu et al., 2008**). C'est ce qui a été conclu par **Shapira et Mimran (2007)**, qui en traitant une cellule d'*E. coli* par le thymol, ont observé que celui-ci causait la lyse des lipopolysaccharides, et la perturbation de la membrane bactérienne.

Dorman et al. ,(2000) ont étudié l'activité antibactérienne de plusieurs terpénoïdes et ce, contre 25 espèces bactériennes, ils ont démontré que le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne.

Malgré la faible teneur de notre huile essentielle en carvacrol, on note la présence de son précurseur biologique le *p*-cymène à forte concentration, Il a été rapporté que le *p*-cymène utilisé seul avait peu ou pas d'activité antibactérienne (**Aligianni et al., 2001; Bagamboula et al., 2004**), il est cependant très actif lorsqu'il est au sein du mélange (**Ultee et al., 2002; Rattanachaikunsopon et al., 2010**). D'après **Ultee et al., (2002)**

le *p*-cymène agit en causant le gonflement de la membrane cytoplasmique et en provoquant des perturbations au sein de sa structure.

Les composants mineurs ne sont pas de moindre importance car ils produisent des synergies avec d'autres composants et potentialisent leurs effets, c'est ce qui a été découvert par **Marino et al., (2001)** lors d'un travail réalisé sur la sauge. La synergie entre les composants des huiles essentielles a été également mise en évidence par **Lambert et al., (2001)** qui ont testé l'activité du thymol et du carvacrol sur des souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Le thymol et le carvacrol sont des isomères structuraux qui ont dans l'ensemble le même mode d'action (**Hyldgaard, 2012**). Selon plusieurs auteurs, (**Ettayebi et al., 2000; Friedman et al., 2002 ; Chun et al., 2005**) ces deux composants peuvent causer la perforation de la membrane bactérienne et le flux rapide des composants cytosoliques (**Thuille et al., 2003 ; Shunying et al., 2005**). L'efficacité optimale d'un extrait ne peut donc pas être le résultat d'un constituant actif principal mais à la combinaison des différents composés (**Essawi et al., 2000**). De part leur nature hydrophobe, les huiles essentielles et leurs constituants ont la capacité de s'intégrer aux lipides de la membrane bactérienne, de perturber sa structure et d'augmenter sa perméabilité, c'est donc un outil de choix dans la lutte contre les résistances bactériennes.

3.2.6. Recherche d'une synergie HE/ATB

Les résultats du test de synergie entre l'HE et l'ATB sont représentés dans les tableaux n°23 et 24.

Tableau 23 : Potentiel synergique entre l'HE de *T. numidicus* et l'imipénème

HE (%) ATB (µg/ml)	0,5	0,25	0,125	0,06
16	-	-	+	+
8	-	-	+	+
4	-	-	+	+
2	-	-	+	+

(-) inhibition , (+) Croissance bactérienne

Tableau 24: Détermination du FICI

Souche	Imipénème			HE de <i>T. numidicus</i>			
	CMI _{ATB} (µg/ml)	CMI _{ATB combiné} (µg/ml)	FIC	CMI _{HE} (mg/ml)	CMI _{HE combinée} (mg/ml)	FIC	FICI
<i>P. aeruginosa</i> VIM-2	8	2	0,25	1,66	1,66	1	1,25

Malgré la résistance des souches de *P. aeruginosa* aux huiles essentielles, celle de *T. numidicus* a donné de très bons résultats, ce qui nous a poussé à poursuivre les investigations sur cette espèce. D'autant plus que la souche VIM-2 est productrice d'une metallo-β-lactamase, ces enzymes sont codées par des éléments mobiles transmissibles, causant l'émergence de souches hautement résistantes aux carbapénèmes. (Corvec et al., 2008).

Dans la présente étude nous avons observé que la CMI de l'huile essentielle reste stable, elle est de 0,25% soit 1,66 mg/ml aussi bien lorsqu'elle est utilisée seule que lorsqu'elle est combinée à l'ATB. La CMI de l'ATB quant à elle varie, elle est de l'ordre de

8 µg/ml lorsqu'il est employé seul et de 2 µg/ml lorsqu'il est en association avec l'HE, ce résultat témoigne que l'HE potentialise l'effet de l'ATB.

Malgré cette constatation, on remarque que le FICI obtenu s'élève à 1,25, or selon **Odds (2003)**, on parle d'une synergie entre HE et ATB lorsque le FICI est inférieur ou égal à 0,5, on parle d'antagonisme lorsqu'il est supérieur à 4, enfin il n'y aurait aucune interaction lorsque le FICI est compris entre 0,5 et 4. Selon cette classification, il n'y aurait aucune synergie entre notre huile essentielle et l'imipénème, ce résultat nous laisse perplexe quand on voit la régression de la CMI de l'antibiotique qui passe de 8 à 2µg/ml.

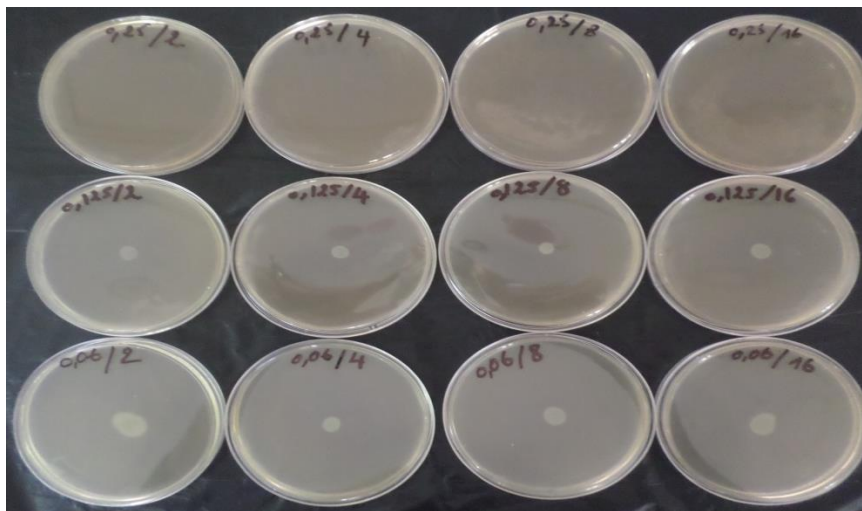


Photo 38 : Test de synergie entre HE/ATB

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'Algérie jouit, de par sa situation géographique, d'une grande variation climatique et de grandes ressources hydriques, cela en fait un pays qui regorge d'espèces végétales dotées de pouvoirs thérapeutiques. Parmi ces plantes miraculeuses «*Thymus numidicus* Poiret», une espèce endémique de l'Est algérien, qui a fait l'objet de peu d'investigations tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacognosique. La valorisation de cette espèce constitue le but ultime de ce travail, qui englobe plusieurs aspects dont une étude botanique et environnementale et une étude biologique (antibactérienne et antioxydante).

De cette étude, il ressort que:

- *Thymus numidicus* possède des traits morphologiques, anatomiques et physiologiques qui lui permettent de s'adapter au climat méditerranéen à longue saison sèche, qui peut durer près de 05 mois. En effet, ses feuilles sont minuscules et tomenteuses et son port est touffu.
- L'anatomie révèle la prépondérance des tissus cellulosiques aussi bien chez la feuille que chez la tige, ce qui dénote l'importance du facteur hydrique chez le Thym. On note la présence de poils épidermiques sécréteurs, ces derniers dégagent une huile essentielle. La présence de cryptes pilifères a aussi été observée. Toutes ces structures contribuent à économiser l'eau pendant la mauvaise saison. On a aussi détecté la présence de cystolithes dont le rôle reste à ce jour inconnu.
- Le screening phytochimique a révélé la présence de tanins catéchiques, de flavonoïdes et de terpènes (huiles essentielles).
- L'extraction de l'huile essentielle a donné un rendement de 1,92%. Son analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a révélé que le Thymol est le composant majoritaire avec 77,52%.

- La composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* lui confère une grande activité antibactérienne sur la totalité des souches testées, avec des zones d'inhibition allant de :

- 32 mm à 78 mm chez *Staphylococcus aureus* avec une CMI égale à 0,34 mg/ml.
- 32 mm à 65 mm chez *Acinetobacter ssp* avec une CMI égale à 0,16 mg/ml.
- 27 mm à 50 mm chez *Klebsiella pneumoniae* avec une CMI égale à 1,33mg/ml.
- 49 mm à 69 mm chez *Escherichia coli* avec une CMI allant de 0.34 à 0.67 mg/ml.
- 17.5 mm à 55mm chez *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI égale à 0.4mg/ml.

Concernant l'activité antiradicalaire, l'IC50 de l'huile essentielle de *T. numidicus* a été estimé à $2,51 \pm 0,07$ mg/ml. Ce résultat témoigne d'une capacité réductrice modeste, comparée à celle du BHT ($0,17 \pm 0,02$ mg/ml) et de l'acide ascorbique ($0,51 \pm 0,004$ mg/ml).

Perspectives

- Réalisation d'une cartographie de l'espèce pour délimiter son aire de répartition.
- Fractionnement et isolement des différents constituants de l'huile essentielle afin de connaître la ou les molécules à l'origine des effets antibactériens et l'éventuelle synergie entre elles.
- Détermination du mécanisme d'action exact de l'huile essentielle en identifiant sa cible cellulaire.
- Poursuite des investigations sur les synergies entre HE/ATB afin de remédier au problème des résistances bactériennes.
- Détermination du potentiel conservateur des huiles essentielles sur des denrées alimentaires.
- Soumission de l'HE à une étude toxicologique.
- Protection, culture à grande échelle et valorisation de cette espèce.

Références bibliographiques

A

AFNOR., 1986. Recueil des Normes Françaises «huiles essentielles», AFNOR, Paris, P 57.

Aissa N., Stola D., Legrand P., 2004. Performance de quatre méthodes de l'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé et de l'automate vitek2 TM pour la détection de la résistance chez les staphylocoques à coagulase négative. *Pathologie et biologie*. (52): 26-32.

Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S., Chinou IB., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 40: 4168-4170.

Alpin., 2005. La phytothérapie de A à Z. La santé par les plantes. Ed., Alpen, Monaco. P : 73.

Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M., et Chaouch A., 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(1): 141-148

Angelov G., Boyadzhiev L., Georgieva S., 2008. Antioxydant properties of some Bulgarian wines. *Journal of International Scientific Publication: Materials, Methods and Technologies*. 3(1): 143-150.

ANNE P. (1945). Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. Ed., *Ann. Agron.*, 5^{ème} édition, n° 2, pp 161-172.

Astani A., Reichling J., Schnitzler P., 2011. Screening for Antiviral Activities of Isolated Compounds from Essential Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Article ID 253643, 8 pages

Avril JL., Dabernat H., Denis F., Monteil H., 1992. Bactériologie clinique, 2^{ème} édition, Ed., Marketing. Pp -268-276.

B

Badiaga M., 2012. Etude ethnobotanique, phytochimique et activité biologique de *Nauclea latifolia* smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali, Thèse de doctorat en chimie organique, université du mali. Pp74-75.

Bagamboula CF., Uyttendaele M., Debevere J., 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymène towards *Shigella sonnei* and *S.flexneri*. *Food Microbiol.* 21: 33-42.

Bagnouls F., Gaussen H., 1953. Les climats et leur classification. *Ann. Géogr.* Pp 193-220.

Bagnouls F., Gaussen H., 1953. Saison sèche et indice xéothermique. *Bull.Soc.Nat. de Toulouse*, 88: 193- 240.

Bakkali AB., Averbeck AD., Averbeck AM., Idaomar B., 2008. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicologie*, 46: 446-475.

Barbier F et Wolff M., 2010. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end? *MS. Médecine sciences*, 26(11): 960-968.

Baser KHC and Buchbauer G., 2010. Handbook of Essential oils : Science, Technology and Applications. CRC Press. UK.

Benjlali B., Hammouni M., Richard H., 1987. Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization. *Sci.Aliments.* 7: 77-91.

Benkiniouar R., Touil A., Zaidi F., Rhouati S., Chosson E., Seguin E., Comte G., Bellvert F., 2010. Isolation and identification of five free flavonoid aglycones from *Thymus numidicus*. *J.Soc.Alger.Chim.* 20(1) : 11-15

Bennadja Salima., 2007. Etude de l'écologie et de la régénération du chêne liège dans la Numidie orientale. Thèse de Doctorat d'Etat. Université Badji Mokhtar, Annaba. Algérie

Benslimani A., 2011. Techniques. In : Réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries (Eds) Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire, 6^{ème} édition. PP: 23-37.

- Bergogne-Berezine E., Towner KJ.,** 1996. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological Clinical and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews*. 9(2): 148-165.
- Bert F., Lambert-Zechovzki N.,** 1999. Problèmes microbiologiques d'actualité = Current concepts on antibiotic resistance and therapeutic problems raised by *Pseudomonas aeruginosa*: Today's challenges in microbiology. *La Presse médicale*. 28(8): 451-458.
- Biendo M., Yala F., Kounkou R., Boudjoumba.,** 1991. Sensibilité à 9 antibiotiques de 46 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au CHU de Brazzaville. *Médecine et maladies infectieuses*. 21: 668-670.
- Billerbeck VG., Roques C., Vanière P., Marquier P.,** 2002. Activité antibactérienne et antifongiques de produits à base d'huiles essentielles. *Hygiènes*. 3(10): 248-251.
- Blois MS.,** 1958. Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*. 181: 1199-1200.
- Botineau M.,** 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Edition Tec & Doc. Lavoisier, Paris. Pp: 1021-1043.
- Bouchonnet S., Hoppilliard Y., Kargar-Grisel T.,** 1999. Les différents types de spectromètres de masse utilisés pour l'analyse des composés organiques et bio-organiques. *Spectra Analysis*, 207: 11-25.
- Bounatirou S., Smiti S., Miguel MG., Faleiro L., Rejeb MN., Neffati M., Costa MM., Figueiredo AC., Barroso JG., Pedro LG.,** 2007. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. et Link. *Food Chem*. 105 : 146-155.
- Bousbia N.,** 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produits naturels et de co-produits agro-alimentaires. Thèse en co-tutelle en chimie, Université d'Avignon et Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'Alger. Pp : 3-27.
- Brain Y., Hadda BD., Bonniun M.,** 1989. *Pseudomonas aeruginosa* et antibiotiques, Bulletin De L'institut Pasteur, Ed : Elsevier, 87, Paris. Pp 125-170.
- Brand-Williams W., Cuvelier ME., Berset C.,** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wiss.U.Technol*. 28: 25-30.

Brenes A., Roura E., 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158: 21-14.

Brou Kouassi G., Akhanovna Mamyrbekova-Bekro J., Dogbo Danazon O., Gogbeu Seu J., Bekro YA., 2010. Sur la Composition Phytochimique Qualitative des Extraits bruts Hydrométhanoliques des Feuilles de 6 Cultivars de *Manihot Esculenta* Crantz de Cote d'Ivoire. *European Journal of Scientific Research.* 45(2): 200-211.

Bruneton J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2^{ème} édition TEC&DOC-Lavoisier, Paris. Pp: 406-417.

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, 3^{ème} édition, Lassay les chateaux, Europe Média Duplication S.A. Pp: 446-497.

Bruneton J., 2008. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2^{ème} édition, Paris, Tec & Doc- Editions médicales internationales. P1188.

Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. *Int. J. Food Microbiol,* 94: 223-253.

Burt S., Van der Zee R., Koets AP., De Graaff AM., Knapen F., Gaastra W., Aagsman HP and Veldhuizen EJA., 2007. Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology.* 73(14): 4484–4490.

C

Caballero B., Trugo RC., Finglas PM., 2003. Encyclopedia of food sciences and nutrition, *Academic Press,* Amsterdam.

Carret G., Cavallo J.D. (2004). Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie.

Carrick J., 1977. Studies in Australian Lamiaceae. Eichlerago, a new genus allied to Prostanthera. *J. Adelaide Bot. Gard.* 1(2), 1977, 115-122.

Ceballos L. & Gibernau M., 2000. Molecular multifunctionarity in terrestrial plants. *Annals of Chemical Ecology,* 19: 145-159.

Charles-Edwards DA., (1981). The mathematics of photosynthesis and productivity, Experimental Botany Monograph vol. 17, Academic Press, London, 127 p.

Chaabane A., 2010. Flore et végétations méditerranéennes. (d'après Médail & Quézel 1997, complété) in Médail F, Baumel A, Diadema K et Migliore J (2012). La biodiversité végétale méditerranéenne, organisation et évolution. <http://www.sfecologie.org/>

CRAAQ (Centre de références en agriculture et agroalimentaire de Québec)., 2003. Guide de référence en fertilisation. 294p.

Chouiteh O., 2012. Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de Doctorat en biochimie, Université d'Oran. Pp: 16-42.

Chun SS., Vattem DA., Lin YT., Shetti K., 2005. Phenolic antioxydants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *helicobacter pylori*. *Process. Biochem.* 40: 809-816.

Chun-Xin Wang and Zu-Huang Mi., 2006. Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP 1 metallo B-lactamases and lacking the outer membrane protein Opr D. *Journal of Medical Microbiology.* 55(3): 353-354.

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie., 2012. Communiqué 2012, Paris, France, 2012, 5-7.

Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P., 2008. Long term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J. Hosp. Infect.* 68 : 73-82.

Cosentino S., Tuberoso CIG., Pisano B., Satta M., Mascia V., Arzedi E., Palmas F., 1999. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology.* 29: 130– 135.

Costa P., Grosso C., Gonçalves S., Andrade P.B., Valentão P., Bernardo-Gil M.G., Romano A. 2012. Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Indust. Crops and Prod.* 36: 246–256

Croteau R., 1986. Biochemistry of monoterpenes and sesquiterpenes of the essential oils. In *Herbs, spices and medicinal plants: Recent advances in botany, Horticulture and pharmacologie*. Vol., 1, Ed, Craker and Simon, Phoenix, AZ : Oryx Press. P: 81-133.

D

Dabin B., 1967. Application des dosages automatiques à l'analyse des sols. Cah. O.R.S.T.O.M. Série pédologique, N°3. P: 265-271.

Deysson G., 1965. Eléments d'anatomie des plantes vasculaires. Société d'Edition d'Enseignement Supérieur (SEDES), Paris, 266p.

Djeddi S., Yannakopoulou E., Papadopoulos K., Skaltsa H., 2015. Activités anti-radicalaires de l'huile essentielle et des extraits bruts de *Thymus numidicus* Poiret., Algérie. *Afrique SCIENCE*. 11(2) : 58-65.

Dohou N., Yamni K., Tahrouch S., Idrissi Hassani LM., Badoc A., Gmira N., 2003. Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine, *THYMELAEA LYTHROIDES*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. 142: 61-78.

Dongmo PMJ., Tchoumboungang F., Ndongson B., Agwanand W., Sandjon B., Zollo PAA., Menut C., 2010. Chemical characterization, antiradical, antioxydant and anti-inflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroun. *Agric. Bio. J.N. Am.* 1(4): 606-611.

Dorman HJD & Deans SG., 2000. Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88: 308-316.

Doucet R., 2006. Le climat et les sols agricoles, Ed : Berger, Eastman, Quebec, P: 280-382.

Duraffourd C., D'Hervicourt L., Lapraz JC., 1990. Cahier de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Eléments Thérapeutiques Synergiques. 2^{ème} édition, Ed., Masson (Paris), 87 p.

E

Essawi T., Srour M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharm.* 70: 343-349.

Ettayebi K., El yamani J., Rossi-Hassani BD., 2000. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *listeria monocytogenes* and *bacillus subtilis*. *FEMS microbiology letters*. 183: 191-195.

F

Fauchère JL., Avril JL., 2002. Bactériologie générale et médicale. Ed., Ellipse. Pp: 213-281.

Fred C., Tenorer P., 2006. Mecanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Assouciation for professionals in infections control and epidemiology*. 48: 3-10.

Friedman M., Henika PR., Mandremm RE., 2002. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogene* and *Salmonella enterica*. *J. Food Prot.* 65: 1545-1560.

G

Garnier E., Shipley B., Roumet C., Laurent G., 2001. A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.*15: 688-695.

Gauchers F., Soltser H., 1981. Base de la production végétale : le sol. Ed., Techniques Agricoles.

Gaucher G., 1968. Traité de pédologie agricole : le sol et ses caractéristiques agronomiques. Ed. Dunod, Paris. 578p.

George DR., Smith TJ., Shiel RS., Sparagano OAE., Guy GH., 2009. Mode of action and variability of efficacy in plant essential oils showing toxicity against the poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*. *Vet. Parasitol.*161: 276-282.

Ghanmi M., Sartani B., Aafi A., Isamili MR., Houti H., El Monfalouti H., Benchakroun KH., Aberchane M., Harki L., Boukir A., Chaouch A., Charrouf Z., 2010. Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l'armoise blanche (*Artemisia Herba-alba*) de la région de Guercif (Maroc oriental). *Phytothérapie*. 8: 295-301

Ghorab H., Kabouche A., Kabouche Z., 2014. Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.* 5 (1): 298-303.

Gral N., Andreumont A., Armand Lefèvre L., 2011. Résistance aux carbapénèmes: vers une nouvelle impasse? *Journal des Anti-infectieux*, ANTINF-16: N° 16. Doi.10.1016/ J. antinf, 2011.03.005.

Guery B., 2009. Antibiothérapie des infections à *Acinetobacter* et *Pseudomonas*. CHRU Lille, DESC Maladies Infectieuses, St Antoine. Pp 3-16.

Guignard JL. et Dupont F., 2004. Botanique. Systématique moléculaire. 13^{ème} édition. Ed., Masson, 284 p.

Guignard JL., 1994. Botanique. 9^{ème} édition, Ed., Masson, Paris. 276P.

Gulcin I., Mshvildadze V., Gepdiremen A. and Elias R., 2003. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F. *Planta Med.* 70: 561-563.

H

Hadef Y., Kaloustian J., Chefrour A., Mikail C., Abou L., Giodani R., Nicolay L., Portugal H., 2007. Chemical composition and variability of the essential oil of *Thymus numidicus* Poir. from Algeria. *Acta Bot. Gallica.* 154(2): 265-274.

Hadef Y., Kaloustian J., Giordan R., Regli P., Chefrour A., Abou L., Mikail C., Portugal H., 2004. Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie, 6^{ème} symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France. P: 5.

Haddouchi F., Benmansour A., 2008. Huiles essentielles, utilisations et activité biologiques. Application à deux plantes aromatiques. *Les technologies de laboratoire, Article de synthèse.* 8: 1-8.

Hatzidimitriou Ef., Nenadis N., Tsimidou MZ., 2007. Changes in the catechin and epicatechin content of grape seeds on storage under different water activity (a_w) conditions. *Food Chemistry.* 105: 1504-1511.

Hazzit M., Baaliouamer A., Faleiro ML., Miguel MG., 2006. Composition of the essential oils of thymus and origanum species from Algeria and their antioxydant and antimicrobial activities. *J. Agric. Food Scien.* 54 : 6314-6321.

Hazzit M., Baaliouamer A., Verissimo AR., Faleiro ML., Miguel MG., 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian thymus oils. *Food Chem.* 116(3): 714-721.

Hinneburg I., Damien Dorman HJ., Hiltunen R., 2006. Antioxydant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.* 97: 122-129.

Hladik CM., Simmen B., Ramasiarisoa PL., Hladik A., 2000. Rôle des produits secondaires (tannins et alcaloïdes) des espèces forestières de l'Est de Madagascar face aux populations animales. Mémoires de la Société de Biogéographie de Paris. P: 105-114.

Hodgson JG., Montserrat-Martí G., Charles M., Jones G., Wilson P., Shipley B., Sharafi M., Cerabolini BEL., Cornelissen JHC., Band SR., Bogard H., Castro-Díez P., Guerrero-Campo J., Palmer C., Pe´rez-Rontome MC., Carter G., Hynd A., Romo-Díez A., De Torres Espuny L and Royo Pla F., 2011. Is leaf dry matter content a better predictor of soil fertility than specific leaf area? *Annals of Botany.* 108: 1337–1345.

Honoré S., Lascols C., Malin D., Targaouchi R., Cattoir V., Legrand P., Soussy CJ., Cambau E., 2006. Emergence et diffusion chez les enterobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultat de l'Hôpital Henri Mondor 2002-2005), *Pathologie Biologie.* 54: 270-279.

Hosni K., Hassen I., Chaâbane H., Jemli M., Dallali S., Sebei H., 2013. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Ind. Crop Prod.* 47: 291–299.

Hussain AI., 2009. Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Thèse en chimie. Université d'agriculture, Faisalabad, Pakistan. P: 134-144.

Hyldgaard M., Mygind T., Meyer RL., 2012. Essential oils in food preservation : mode of action, synergies and interaction with food matrix components. *Frontier in Microbiology.* 3: 1-24.

I

I.N.R.A., 2000. Guide des analyses en pédologie. 2^{ème} édition revue et augmentée, Paris. P: 103-107.

J

Jamagne., 1980. Les bases de la description des sols, Ed. Dunod, Paris. 125p.

Judd WS., Campbell CS., Kellogg EA., Steven PF., 2002. Botanique systématique: Une perspective phylogénétique. Traduction et révision scientifique de la 1^{ère} édition américaine par Jules Bouharmont et Charles-Marie Evrard. De Boeck Université. 467 p.

K

Kal S., Achour W., Abdelhamid A., Benjaoui M., Ben Hassen A., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* isolées de patients immunodéprimés: résistance aux antibiotiques, sérotypage et typage moléculaire. *Médecine et maladies infectieuses*. 35: 530-535.

Karamac M., Kosicska A., Pegg RB., 2005. Comparison of radical-scavenging activities for selected phenolic acids. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 14/55 (2): 165-170.

Karousou R., Koureas DN., Kokkini S., 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Corido thymus capitatus* and *Satureja thymbrina* NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*. 66(22): 2668-2673.

Kim SI., Roh JY., Kim DH., Lee HS., Ahn YJ., 2003. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored Products Research*. 39(3): 293-303.

Knobloch K., Weigand H., Weis N., Schwarm HM., Vigneschow H., 1986. Action of terpenoids on energy metabolism, In: Brunke, E.J. (Ed.), Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils, De Gruyter, Berlin. P: 429– 445

L

Laib I., 2010. Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs séchées de *Lavandula Officinalis* sur les moisissures des légumes secs. Mémoire de Magister. Option : Technologie alimentaire. Université Mentouri Constantine.

Lambert RJW., Skandamis PN., Coote P., Nychas GJE., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. 91: 453–462.

Langeron M., 1934. Précis de microscopie. Collect. Précis médicaux. Masson & Cie, Paris. 1205 p.

M

Maataoui BS., Hmyene A., Hilati S., 2006. Activités Anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de Barbarie (*Opuntia Ficus Indica*). *Libanese Science Journal*. 7(1): 3-7.

Maillard P., Bonhomme R., 1998. Fonctionnement des peuplements végétaux sous contraintes environnementales. INRA éditions, les colloques n°93. P: 309.

Mann J., 1987. Secondary metabolism, 2^{ème} édition, Ed., Oxford, Clarendon Press.

Marino M., Bersani C., Comi G., 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*. 67: 187– 195.

Médail & Quézel, 1997. Compété in Médail F, Baumel A, Diadema K et Jérémy M (2012). La biodiversité végétale méditerranéenne, organisation et évolution. <http://www.sfecologie.org/>

Mellouk K., 2007. Etude ethnobotanique et phytochimique d'une plante medicinal *Chrysanthemum fuscatum*. Mémoire de Magistère en Chimie. Université d'Annaba.

Mesaros M., Van Bambeke F., Glupczynski Y., Vanhoof R., Tulkens PM., 2005. L'efflux des antibiotiques: Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain Médical*. 124(8): 308-320.

Messegue M., 1975. Mon herbier de santé, les plantes qui guérissent. Ed., Opera Mundi, Paris. P: 404-407.

METICA (Méthodologie Traitement de l'Information en Chimie Analytique), 2013. Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* poiret. d'origine algérienne sur des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline. *Thème produits naturelles*.

Meyen S., Abhandl DA., 1827. Phytotomie. , pag. 257 in Müller J. (1839)- Archiv. fur Anatomie, Physiologie, pag. 255, traduit sous le titre : Matériaux pour servir à l'histoire du

développement des diverses parties dans les plantes. (Ann, des Sc. nat. Bot., sér. 2, vol. 12, 1839, pag. 257.)

Michel T., 2011. Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse pour l'obtention du grade de : Docteur de l'université d'Orléans. Discipline : Chimie Analytique – Phytochimie. France. P: 181-182.

Miladi H., Ben Slama R., Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E., 2013. Essential oil of *Thymus vulgaris* L. et *Rosmarinus officinalis* L.: Gas chromatography- mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxydant properties and antibacterial activities against foodborn pathogens. *Natural Sciance*. 5(6): 729-739.

Moghaddam AMD., Shayegh J., Mikaili P. and Sharaf JD., 2011. Antimicrobial activity of essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic bacteria. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(15): 3453-3456.

Molyneux P., 2004. The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 26 (2): 211-219.

Morel S., 2011. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat. Université d'Angers. 267 p.

Murphy J., Riley JP., 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta*. 27 : 31-36

N

Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M., Hara Y., 1996. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md*. 21(6): 895-902.

Nicholas HJ., 1978. Phytochemistry Organic Metabolites, Vol. 2, Yonkers, New York.

O

Odds FC., 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 1.

Okoh OO., Sadimenko AP., Afolayan AJ., 2011. Antioxydant activities of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained by hydro-distillation and solvent free microwave extraction. *Afr. J. Biotechnol.* 10(20): 4207-4211.

Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture., 2006. *Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques* INRAA / Juin 2006.

Ozenda P., 2004. Flore et végétation des sahara. 3^{ème} édition, Ed., CNRS édition. Paris. P: 399-402.

P

Pannala AS., Chan TS., O'Brien PJ., Rice-Evans CA., 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 282: 1161-1168.

Paterson YL., Pittsburgh MD., 2006. Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae.* *Association for professionals in infections control and epidemiology.* 48: 20-28.

Peel MC., Finlayson BL., McMahon TA., 2007. Updated world map of the Koppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11: 1633–1644

Pelloux P., Dabin B., Fillmann G., Gomez P., 1971. Méthodes de détermination des cations échangeables et de la capacité d'échange dans les sols, Office de la recherche scientifique et techniques Outre-Mer (O.R.S.T.O.M), Paris. P: 8-20.

Poirel L., Naas T., Nicolas D., Collet L., Bellais S., Cavalo JD., Nordmann P., 2000. Characterization of Vim-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 44: 891-897.

Poiret., JLM 1785 & 1786. Voyage en Barbarie, ou Lettres écrites de l'ancienne Numidie. Seconde partie : recherches sur les sciences naturelles. Libraire, rue du Hurepoix. n°13. P 187.

Popovici C., Saykova I., Tylkowski B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel.* 4: 25-39.

Prescott L., Harley J., Klein D., 2010. Microbiologie 3^{ème} Ed., De Boeck. P: 520-582.

Q

Quezel P. et Santa S., 1963. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome II. Ed., CNRS. Paris. P 805.

Quezel P. et Santa S., 1962. La nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. Ed., CNRS. Paris. 565p.

Quezel., 1964. L'endémisme dans la flore de l'Algérie *in* Compte rendu sommaire des séances de la société de Biogéographie n°323, 324, 325. P:137-149.

R

Rasool R, Ganai BA., Akbar S., Kamili AN., Masood A., 2010. Phytochemical screening of *Prunella vulgaris* L. An important medicinal plant of KASHMIR. *Pak. J.Pharm. Sci.* 23(4): 399-402.

Rattanachaikunsopon P and phumkhachorn P., 2010. Assesment of factors influenizing antimicrobial activity of carvacrol and cymène against *Vibrio cholera.* *in food. J. Biosci. Bioeng.* 110: 614-619.

Raunkiær C., 1934. The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography, being the collected papers of C. Raunkiær., Oxford University Press. P: 2-104.

Richer De Forger A., Feller C., Jamagne M., Arrouays D., 2008. Perdus dans les triangles des textures. *Etude et Gestion des Sols.* 15(2): 97-111.

Ruberto G., Baratta MT., 2000. Antioxydant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. *Food Chem.* 69: 167-174.

Ruget F., Bonhomme R., Chartier M., 1996. Estimation simple de la surface foliaire de plantes de maïs en croissance. *Agronomie.* 16 : 553-562.

Rodriguez B., De Quirs A., Lage Yusti MA., Lopez-Ernandez J., 2009. HPLC- analysis of polyphenolic compounds in spanish white wines and determination of their antioxydant activity by radical scavenging assay. *Food Research International*. 42: 1018-1022.

Roginsky V., Lissi EA., 2005. Review of method to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food chemistry*. 92: 235-254.

Rosato A, Vitali C, Laurentis ND, Armenise D, Milillo MA. 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 14: 727–732.

S

Saidj F., Rezzoug SA., Bentahar F., Boutekedjiret C., 2008. Chemical Composition and insecticidal Properties of *Thymus numidicus* Poiret Essential Oil from Algeria. *journal of essential oil-bearing plants*. 11(4): 397-405.

Sagdic O., 2003. Sensitivity of four pathogenic bacteria to turkish thym and origano hydrosols. *LWT-Food Science and Technology*. 36(5): 467-473.

Sanchez E., Garcia S., Heredia N., 2010. Extracts of edible and medicinal plants damage membrans of *vibrio cholera*. *Appl, Environ, Microbiol*. 76: 6888-6894.

Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A., Saura-Calixto F., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76(2): 270-276.

Sanchez-Moreno C., 2002. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8 (3): 12-137.

Schachter ., Medoff , Eisenstein., 1999. Microbiologie et pathologie infectieuse. Ed: De Boeck et Larcier. P: 81-181.

Scherer R., Godoy HT., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl. method. *Food Chemistry*. 112: 654-658.

Schnelle F., 1955. Plante - Phenologie. Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Porting K.-G., Leipzig.

Seung-Joo L., Katumi U., Takayuki S., Kwang-Geun L., 2005. Identification of volatile components in basilic (*Ocimum basilicum* L.) and thym leaves (*Thymus vulagaris* L.) and their antioxydant properties. *Food Chem.* 91: 131-135.

Shapira R., Mimran E., 2007. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. *Microb. Drug Resist.* 13: 157-165.

Shunying Z., Yang Y., Huaidong Y., et al. 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *J.Ethnopharmacol.* 93: 151-158.

Silva F., Ferreira S., Duarte A., Mendonca DI., Domingues FC., 2011. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil : its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine.* 19: 42-47.

Simon JA., 1973. The total synthesis of natural products, Vol (2), A Wiley-interscience publication, Jhon Wiley & sons, Toronto, 1973, P: 1-197.

Simpson MG., 2006. Plant Systematics. Academic Press, Elsevier. P : 8.

Singleton P., 1999. Bactériologie. 4^{ème} édition, Ed., Dunod. P: 153-156.

Svoboda KP., Hampson JB., 1999. Bioactivity of essential oil of selected temperate aromatic plants : antibacterial, antioxydant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Oral Microbiology and Immunology*, 9(4): 202-208.

T

Tabart J., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J., Dommès J., 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry.* 113: 1226-1233.

Talon D., Lallemand De Conto S., Thouverez M., Bertand X., 2004. *Escherichia coli*: résistance aux quinolones et aux béta-lactamines des souches cliniques isolées en Franche Coté. Ed: Elsevier, France. 52 (2): 76-81

Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B., 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype. *J. Chem. Ecol.* 29(4): 859-880.

Thrombetta D., Castelli F., Sarpietro MG., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2474-2478.

Thrombetta D., Saija A., Bisignano G., Arena S., Caruso S., Mazzanti G., Uccella N., Castelli., 2002. Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha, beta-unsaturated aldehydes. *Lett. Appl. Microbiol.* 35(4): 285-290.

Thuille N., Fille M., Nagle M., 2003. Bactericidal activity of herbal extracts. *Int. J. Hug. Environ. Health,* 206: 217-221.

Tortora GJ., Funke BR., Case CL., 2012. Introduction à la microbiologie 2^{ème} édition, Ed., ERPI Science. Pp : 141-145.

Touati M., Diene SM., Dekhil M., Djahoudi A., Racherache A., Rolain JM., 2013. Dissemination of a Class I Integron Carrying VIM-2 Carbapenemase in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Hospital Intensive Care Unit in Annaba, Algeria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57(5) : 2426-2427.

Trease GE, Evans WC., 1989. A Text Book Of pharmacognosy. 13^e édition, Ed., Bailliere Tindall. LTD., Londres.

Tripti M, Padma S, Shailja P, Nirpendra C and Hema L., 2011. Potentiation of Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* Essential Oil against Selected Uropathogens. *Phytother.* 25(8): 1225–1228.

U

U.S.S.L.S. (United State Salinity Laboratory Staff), 1954. Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. USDA, Handbook n°60, U. S. Gov. Print. Office, Washington DC, P147.

Ultee A., Bennik MHJ., Moezelaar R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus. cereus.* *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1561–1568.

V

Vaillaud M., 2011. Adaptation à la sécheresse des guarrigue méditerranéennes. 8p.
<http://fr.calameo.com/books>.

Valnet M., 2005. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* intyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology*.85: 73-81.

Véla E., Benhouhou S., 2007. Évaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin méditerranéen (Afrique du Nord). *C. R. Biologies*. 330: 589–605

Verhoff J., Schmitz FJ., 2000. Antimicrobial resistance in European isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of clinical infectious diseases*. 19: 370-374.

Villano D., Fernandez-Pachon MS., Moya ML., Troncoso AM., Garcia-Paria MC., 2007. Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*. 71: 230-235.

W

Wagner H., Ulrich-Merzenich G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* .16 : 97–110.

Waldi D. (1965).Spray Reagents for thin layer chromatography-a Laboratoryhandbook. *Academic press Inc*, New York (U.S.A), 491p.

Walsh SE., Maillard JY., Russell AD., Catrenich CE., Charbonneau DL., Bartolo RG., 2003. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J.Appl.Microbiol*. 94: 240-247.

Willem JP., 2002. Les huiles essentielles, Médecine d'avenir. Ed., Dauphin, Paris. 311 p.

X

Xu J., Zhou F, Ji PB., Pei RS., Xu N., 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett. Appl.Microbiol*. 47: 174-179.

Z

Zeraia L., 1983. Liste et localisation des espèces assez rares, rares et rarissimes. I.N.F. Alger. 136 p.

Zhiri A., Mayaud L., Bouhdid S., Baudoux D., Abrini J., Aubert G., 2010. Evaluation de l'activité bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques. Congrès Francophone de Phytothérapie au Liban, place de la phytothérapie dans les systèmes de santé. P: 1-18.

Zhiri A., Baudoux D., 2005. Les huiles essentielles chémotypées et leurs synergies. Aromathérapie scientifique. Ed. Inspir development. S.A, Luxembourg. 84p.

Adresses électroniques

[http//www.Bioquell.com](http://www.Bioquell.com)

[http//www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

[http//www.google earth.com](http://www.google earth.com)

[http//www.Pasteur.fr](http://www.Pasteur.fr)

[http//www.tela-botanica.org](http://www.tela-botanica.org)

Annexe

Annexe 01 : Largeurs et longueurs de 60 échantillons de feuilles de *T. numidicus*

E	Long (mm)	Larg (mm)	E	Long (mm)	Larg (mm)	E	Long (mm)	Larg (mm)
1	11	3	25	7.5	2	49	9.5	3
2	17	4	26	8	2	50	12	2
3	17	3	27	7	2	51	15	3
4	15	4	28	7.5	1	52	16.5	3
5	16	4	29	8	3	53	6	1
6	10	3	30	7	2.5	54	16	4
7	17	3.5	31	9	2.5	55	6	3.5
8	15	3	32	14	4	56	8	2.5
9	15	4	33	13	4	57	1	3
10	19	5	34	18	5	58	1	3
11	13	2.5	35	17	3	59	9.5	2.5
12	18	5	36	9	4	60	16	3
13	20	4	37	11	4			
14	8	2	38	17	4.5			
15	7	2	39	11.5	3.5			
16	1	2	40	8	5			
17	9	2.5	41	14	3			
18	9.5	3.5	42	17	4			
19	16.5	4	43	9.5	3.5			
20	8	2.5	44	16.5	4			
21	8	2	45	16	4			
22	6	1.5	46	14.5	3.5			
23	8	2	47	16	3.5			
24	7	2	48	11	2.5			

Annexe 02 : Longueurs des racines et des tiges de 10 échantillons

Echantillon	Racine (cm)	Tige (cm)
1	11,5	15
2	12	12,5
3	6	19
4	10	18,5
5	18	17
6	9	19,5
7	11	24
8	14.5	11
9	12.5	22
10	25	26
Moyenne	12.95	18.45
Rapport racine/tige		0.70

Annexe 03 : Biomasse racinaire/ biomasse aérienne

Echantillon	Racine (g)	Tige (g)	R/T
1	0,44	0,26	1,69
2	0,99	0,73	1,35
3	0,81	0,99	0,81
4	1,38	2,48	0,55
5	0,70	2,12	0,33
6	0,53	0,43	1,23
7	0,31	1,02	0,30
8	0,39	0,14	2,78
Moyenne	0.69	1.02	0.67

Travaux en rapport avec la thèse

- **KOUCH M.**, BENNADJA S., DJAHOUDI A., AOUADI S. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* poiret vis-à-vis des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2014 ; 25(2): 149-153.
- **KOUCH M.**, OUIBRAHIM A., BENNADJA S., DJAHOUDI A. Activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Thymus numidicus* poiret vis-à-vis des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Les Deuxièmes Journées du Département de Pharmacie. 28-29 Mai 2014. Faculté de Médecine, Département de Pharmacie, Université Badji Mokhtar, Annaba.
- BENNADJA S., **KOUCH M.**, MAHFOUF N. Synergie entre antibiotiques (imipénème et ceftazidime) et l'huile essentielle de Thym : tests préliminaires. Congrès international « PHYT'AROM GRASSE ». 11-13 Avril 2014. Grasse. France.



Antipseudomonal Activity of the Essential Oil of *Thymus numidicus* Poiret

¹Kouch Mina*, ^{1,2}Bennadja Salima, ²Djahoudi Abdelghani, ³Aouadi Saoudi.

¹Laboratory of Biochemistry and environment Toxicology. University Badji Mokhtar Annaba, Algeria.

²Department of Pharmacy, University of Annaba. Algeria.

³Department of Biochemistry, University of Annaba. Algeria.

*Corresponding author's E-mail: kouchmina@hotmail.fr

Accepted on: 29-01-2014; Finalized on: 31-03-2014.

ABSTRACT

The essential oil extracted from the leaves of *Thymus numidicus* Poiret harvested in the region of Berrahel (Annaba) gave a yield of 1.92%. Its analysis by CG/SM allowed the identification of 13 components, principally phenols and terpenes. The main constituents are thymol (77,5 %), P-cymene (10,1 %) and γ -terpinene (6,37 %). The antibiotic activity of this essential oil was assessed on 9 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, using the method of diffusion in a solid medium. MIC was determined by the method of integration in an agar medium. The nine strains showed high sensitivity towards the essential oil with inhibition diameters ranging from 17.5 mm to 55 mm and a MIC of 0.4 mg/ml. The essential oil of *Thymus numidicus* proved to be endowed with bactericidal properties against *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Thymus numidicus* Poiret, Essential oil, GC/MS, antibacterial activity.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative ubiquitous bacterium, very common in hospitals. It is resistant to numerous antibiotics such as penicillin, cephalosporin of 1st and 2nd generations, carbapenem, aminoglycosides and fluoroquinolones.¹

In fact, this germ fits quickly in medicinal attacks and poses a major health problem because of its multi-antibiotic resistance. This resistance responds to several defense mechanisms like the impermeability of the bacterial membrane to antibiotics¹⁻⁴ and the expression of several efflux systems, enabling these strains to expel antibiotics in the outside environment like a pump, using the energy of the electrochemical gradient of the cytoplasmic membrane.^{5,6}

The acquisition of plasmids carrying resistance genes to certain antibiotics is also a serious problem favoring the dissemination of the resistance factor.

Strains of *Pseudomonas aeruginosa* are also able to modify the constitution of their own cytoplasmic membrane and to create chromosomal mutations in the target of some antibiotics, reducing the affinity of the antibiotic for its target and making its fitting impossible.⁷⁻⁹

The aim of this study is to test the antibacterial activity of the essential oil of Thyme of Numidia on *P. aeruginosa* strains resistant to imipenem, which is the last beta-lactam antibiotic, it has a wide bacterial spectrum and a high stability against beta-lactamases. Its main action mode is the inhibition of the bacterial wall synthesis by fixing to the binding proteins.⁶ The strains of *Pseudomonas aeruginosa* are of wild-type sensitive to imipenem. They are however endowed with a high plasticity and a remarkable adaptation power involving

the appearance of resistant strains for which the rate never stops increasing. The acquisition of this resistance may be enzymatic, making use of metallo- β -lactamase. This mechanism leads us straight to a therapeutic impasse because it is transferable. The genes coding for the production of these enzymes are located in mobile platforms, transmission is realized by integrons situated in associated plasmids^{10,11} which causes high spread of resistant strains. The other mechanism of resistance is the loss of the porin Opr D2 in these strains reducing imipenem permeability.¹²

To address this well-established resistance⁶, aromatherapy could be an alternative to fight against this problem. Thymes are part of those miraculous plants that have many therapeutic properties and a recognized antibacterial activity.

This genus comprises more than 300 species, *Thymus numidicus* Poiret, which is typically endemic to north eastern Algeria and Tunisia¹³ is a bushy plant with erect stems, leaves are lanceolate, 2-5 times longer than wide, the floral leaves are distinctly broader while the flowers are pink, sessile or nearly so. Although it is a major element of Algerian traditional medicine, this species remains to date little known and has been the subject of few investigations. Its study is therefore well-founded.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Essential oil of *Thymus numidicus*

The extraction of the essential oil was performed by hydrodistillation method (Likens Nickerson apparatus) during 1h30 min on dry leaves, harvested in April 2012 before flowering in Berrahel (Annaba) area. The oil

obtained was dried and then stored at 4° C in a dry place inaccessible to light and moisture.

Bacterial strains

The test strains were isolated from hospitals (University Hospitals, health centers) and private clinics of Annaba (Algeria). The tests were performed on nine strains of *Pseudomonas aeruginosa*: ATCC 27853, S36, S67, S71, S72, S74, S87, S139 and S218. All these strains are resistant to imipenem.

Methods

Chromatographic Analysis of the essential oil

The chemical composition of the oil was determined by the technique of gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). The apparatus used is a gas chromatograph (GC UltraTrace) with a VB-5 column combined with a mass spectrometer (MS Polarisation trap). The analysis required ethyl acetate as solvent and XEI ionization type (70 eV) with a temperature of 200°C at the source. The carrier gas is helium, the injection mode is the split mode, the injection temperature is 220°C, while the interface temperature is 300°C. The column temperature follows an increase of 40 to 300°C at a rate of 4°C min⁻¹, and the injected volume is 1µl.

The identification of the chemical constituents of the essential oil was performed with reference to the following databases: NIST/ EPA /NIH Mass Spectral Library Version 2.0, January 2002 buildju.

Microbiological study

Aromatogram

The aromatogram has the same principle as the antibiogram technique. On Mueller Hinton medium we performed seeding tested strains as recommended by the Comity of the Antibiogram of French Society of Microbiology (CASFM)¹⁴. On the surface of the agar we introduced two sterile discs: one is impregnated with pure Thyme oil, the other is a witness disk devoid of any substance. After an incubation of 24 hours at 37° C, we proceeded to the reading of the results by measuring the diameter of the inhibition zones formed around the disc.

Determination of MIC (minimal inhibition concentration)

MIC is the lowest concentration of essential oil to which no bacterial drive is observed. The calculation of the MIC was conducted by the method of incorporation agar following the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)¹⁵, the principle is to prepare dilutions of the essential oil in Dimethylsulfoxid (DMSO) from a stock solution; each dilution is incorporated into a fixed volume of medium Mueller Hinton then poured into a Petri dish. After the drying of the medium, we have placed on the surface of each dish spots, each one representing a tested strain. After an incubation of 24 hours, we distinguished susceptible strains from resistant strains for each concentration.

Determination of MBC (minimal bactericidal concentration)

The MBC is the lowest concentration of essential oil which destroys 99.9% of the bacterial inoculum, which is a bacterial count lower than an interval between 104 and 102 CFU/ml after 24 hours of incubation (the initial inoculum is between 106 and 108). Using a platinum loop, we collected a sample from each dish that showed no bacterial growth. Then these samples were plated on a nutritive agar and incubated at 37 °C for 24 hours. The minimum bactericidal concentration is the lowest concentration of the essential oil for which no growth was observed.

RESULTS AND DISCUSSION

Essential oil yield

Thyme leaves gave 1.92 % of essential oil to a test sample of 100 g of dried plant material. This result can be considered important when compared to the yield of 1.1% reported by Hadeef et al.,¹⁶ on the same species, growing in the same environment, harvested at the flowering stage (June). The difference would be due to the climatic conditions corresponding to the two years in question. It is important to mention the relationship between the yield and the distillation quality.

Chemical composition of the essential oil of *Thymus numidicus* Poiret

Analysis of the essential oil by GC/MS revealed the presence of 13 components, thymol is the major element with 77.52%. The other important components are respectively P-cymene (10.10 %), γ-terpinene (6.38%) and β-pinene (3.16). Carvacrol is in trace level (0.17%), but we note the presence of p-cymene which is its precursor. In 2007, Hadeef et al.,¹⁷ found in the same species within the same region 11 components (Table 1) whose thymol is also the major component with only 49.4%.

According to several authors¹⁸⁻²⁰, variations in the chemical composition of essential oils from the qualitative and quantitative stand point are due to genetic factors, environmental factors, the part of the plant used, its age and finally the period of the vegetative cycle during which the harvest has been made. The differences between our results and those of Hadeef can be attributed to this last factor. *Thymus numidicus* of 2011 was harvested in April thus before flowering; we note nevertheless a high concentration of thymol (77.5 %). Besides the absence of some components, we note the presence of their precursors; we can deduce their subsequent development during the vegetative cycle. We note particularly, the presence of carvacrol at a very low concentration level and also the presence of p-cymene of which it is the precursor^{21,22}. We remark also the absence of linalool in the essential oil of 2011. Climate variations can be implicated because they have a significant impact on the chemical composition of essential oils, especially in species with superficial storing histological structures such the secretory bristles in Lamiaceae, for when the

location of the essential oil is deeper quality is much more constant²³. Works of Saidj et al.,²⁴, which focused on *Thymus numidicus* in the area of Yakouren (Tizi Ouzou) harvested in April 2004, showed a predominance of oxygenated compounds which are thymol (51%) and carvacrol (9.4%) but also a small proportion of p-cymene (0.5%). Comparison between these results allows us to conclude that Thymol always prevails in this species.

Table 1: Chemical composition of the essential oil of *T. numidicus* in 2007 and 2011

Components	<i>T. numidicus</i> 2011	<i>T. numidicus</i> 2007
α -phellandrène	0.2 %	0.4%
α- pinène	1.01 %	1.8%
δ- 3- carène	0.18 %	/
α -terpinène	0.40 %	2.3%
p- cymène	10.10 %	10.1%
γ- Terpinène	6.38 %	11.7%
β-pinène	3.16 %	2.5%
Bornéol	0.2%	/
Thymol	77.5 %	49,9%
Carvacrol	0.17 %	2.5%
Guaia 3,9 diène	0,2 %	/
γ -Cadinène	0.08 %	/
δ-cadinène	0.4 %	0.7%
Linalool	/	10%

T. numidicus: *Thymus numidicus*

Results of antimicrobial study

Table 2 shows the inhibition diameters, MIC and MBC of *Pseudomonas aeruginosa* strains.

Table 2: Activity of the essential oil of *T.numidicus* on *Pseudomonas aeruginosa*

Strains	D (mm)	MIC (mg/ml)	MIB (mg/ml)
S ATCC27853	38.5	0,4	0,4
S 139	21		
S 36	55		
S 67	22		
S 71	30		
S 72	46		
S 74	34		
S 87	43.5		
S 218	17.5		

D ; inhibition diameters, MIC ; minimal inhibitrice concentration, MIB ; minimal bactericidal concentration

Despite the resistance of gram-negative bacteria to essential oils²¹, strains of *Pseudomonas aeruginosa* showed an interesting sensitivity against the essential oil of *Thymus numidicus*, with inhibition zones ranging from 17.5 mm in strain S 218 to 55 mm in S 36. MIC obtained

for all strains investigated (0,4 mg/ml) is very interesting and indicates a high activity of this oil on this bacterial species. This efficiency can be explained in terms of the high prevalence of phenolic derivatives that are the source of the antibacterial effect of essential oils according to several authors.²⁵⁻²⁷ The antibacterial activity of the essential oil of *T. numidicus* can be partly attributed to its high content level of thymol which, according to Lambert et al.,²⁸ binds to membrane proteins and increases the permeability of the bacterial cell membrane. Dorman et al.,²⁹ demonstrated that thymol is the compound that has the widest spectrum of antibacterial activity and that against 25 types of bacteria tested. Other studies suggest that volatile compounds are responsible of the inactivation of enzymes, including those involved in energy production and synthesis of structural components^{26,29}.

Minor components are not of lesser importance since they produce synergies with others and potentiate their effects; this is what was discovered by Marino et al.,³⁰ in a study on the sage. This was also highlighted by Lambert et al.,²⁸ who have tested the activity of thymol and carvacrol on strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Despite the low level of carvacrol in our essential oil we note the presence of its biological precursor P-cymene at high concentrations. It would appear that the P-cymene is a very good antibacterial agent. Ultee et al.,³¹ reported that P-cymene could cause swelling of the cytoplasmic membrane of *Bacillus cereus* and disturbances in its structure. Due to their hydrophobic nature, essential oils and their constituents are able to integrate with the bacterial membrane lipids, disrupt its structure and increase its permeability³². Therefore, it is an option tool in the fight against bacterial resistance.

CONCLUSION

The essential oil of *Thymus numidicus* Poiret harvested in the region of Berrahal (Eastern Algeria) is characterized by the presence of 13 components; the most important are thymol, P-cymene and γ-terpinene. The essential oil was tested over nine strains of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, S36, S67, S71, S72, S74, S87, S139 and S218. All these strains have a profile of resistance to imipenem. The tests showed a strong antibacterial activity of essential oil of *Thymus numidicus* towards all the strains tested. This strength is mostly attributed to the high concentration of terpenes and phenolic compounds in this essential oil including thymol which is the major component. The minor components are not of lesser importance.

REFERENCES

- Brain Y, Hadda BD, Bonniem M, *Pseudomonas aeruginosa* et antibiotiques, Bulletin De L'institut Pasteur, Ed : Elsevier, 87, Paris, France, 1989, 125-170.
- Biendo M, Yala F, Kounkou R, Boudjoumba, Sensibilité à 9 antibiotiques de 46 souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées au CHU de Brazzaville, Médecine et maladies infectieuses, 21, 1991, 668-670.
- Barbier F et Wolff M, Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: towards a therapeutic dead end? MS. Médecine sciences, 26(11), 2010, 960-968.
- Kal S, Achour W, Abdelhamid A, Benjaoui M, Ben Hassen A, *Pseudomonas aeruginosa* isolées de patients immunodéprimés: résistance aux antibiotiques, sérotypage et typage moléculaire, Médecine et maladies infectieuses, 35, 2005, 530-535.
- Bert F, Lambert-Zechovzki N, Problèmes microbiologiques d'actualité = Current concepts on antibiotic resistance and therapeutic problems raised by *Pseudomonas aeruginosa*: Today's challenges in microbiology, La Presse médicale, 28(8), 1999, 451-458.
- Mesaros M, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R, Tulkens PM, L'efflux des antibiotiques: Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques, Louvain Médical, 124(8), 308-320.
- Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H, Bactériologie clinique, 2^{ème} édition, Edition Marketing, 1992, Pp -268-276.
- Xian-Zhi Li, Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms, International Journal of Antimicrobial Agent, 25, 2005, 453-463.
- Honoré S, Lascols C, Malin D, Targaouchi R, Cattoir V, Legrand P, Soussy CJ, Cambau E, Emergence et diffusion chez les enterobactéries du nouveau mécanisme de résistance plasmidique aux quinolones Qnr (résultat de l'Hôpital Henri Mondor 2002-2005), Pathologie Biologie. Ed: Elsevier, France, 54, 2006, 270-279.
- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo J D, Nordmann P, Characterization of Vim-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid-and integron-borne gene from a *pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France, *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 2000, 891-897.
- Gral N, Andremont A, Armand lefèvre L, Résistance aux carbapénèmes: vers une nouvelle impasse? Journal des Anti-infectieux, ANTINF-16: N° 16. Doi.10.1016/ J. antinf, 2011.03.005.
- Chun-Xin Wang and Zu-Huang Mi, Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing IMP 1 metallo B-lactamases and lacking the outer membrane protein Opr D, JMM: Journal of Medical Microbiology, 55(3), 2006, 353-354.
- Quezel P et Santa S, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Edition Centre national de la recherche scientifique, Tome 2, 1963, 805.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué 2012, Paris, France, 2012, 5-7.
- Benslimani A, Techniques. In: Réseau Algérien de surveillance de la résistance aux antibiotiques des bactéries (Eds) Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale, médecine humaine et vétérinaire, 6^{ème} édition, 2011, 23-37.
- Hadef Y, Kaloustian J, Giordan R, Regli P, Chefrou A, Abou L, Mikail C et Portugal H, Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et *Thymus numidicus* Poiret d'Algérie, 6^{ème} symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France, 2004, pp 5.
- Hadef Y, Kaloustian J, Chefrou A, Mikail C, Abou L, Giodani R, Nicolay L and Portugal H, Chemical composition and variability of the essential oil of *Thymus numidicus* Poir. from Algeria, *Acta Bot. Gallica*, 154(2), 2007, 265-274.
- Karousou R, Koureas DN & Kokkini S, Essential oil composition is related to the natural habitats: *Corido thymus capitatus* and *Satureja thymbrina* NATURA 2000 sites of Crete, *Phytochemistry*, 66(22), 2005, 2668-2673.
- Thompson JD, Chalchat JC, Michet A, Linhart YB, Ehlers B, Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotype, *J. Chem. Ecol*, 29(4), 2003, 859-880.
- Benjilali B, Hammouni M, Richard H, Chemical polymorphism of Moroccan thyme essential oils: compounds characterization, *Sci. Aliments*, 7, 1987, 77-91.
- Burt S, Van der Zee R, Koets AP, De Graaff AM, Knapen F, Gastra W, Aagsman HP and Veldhuizen EJA, Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 2007, 4484-4490.
- Simon JA, The total synthesis of natural products, Vol (2), A Wiley-interscience publication, John Wiley & sons, Toronto, 1973, Pp: 1-197.
- Bruneton J, Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2^{ème} édition TEC&DOC-Lavoisier, Paris, 1993, Pp: 406-417.
- Saidj F, Rezzoug SA, Bentahar F, Boutekedjiret C, Chemical Composition and insecticidal Properties of *Thymus numidicus* Poiret Essential Oil from Algeria, *Journal of essential oil-bearing plants*, 11(4), 2008, 397-405.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F, In vitro antimicrobial activity and

- chemical composition of Sardinian Thymus essential oils, Letters in Applied Microbiology, 29, 1999, 130– 135.
26. Trombetta D, Saija A, Bisignano G, Arena S, Caruso S, Mazzanti G, Uccella N Castelli, Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant alpha, beta-unsaturated aldehydes, *Lett. Appl. Microbiol*, 35(4), 2002, 285-290.
27. Amarti F, Satrani B, Ghanmi M, Farah A, Aafi A, Aarab L, El Ajjouri M et Chaouch A, Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14 (1), 2010, 141-148.
28. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote P, Nychas GJE, A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol, *Journal of Applied Microbiology*, 91, 2001, 453–462.
29. Dorman HJD & Deans SG, Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils, *J. Appl. Microbiol*, 88, 2000, 308-316.
30. Marino M, Bersani C, Comi G, Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiacea and Compositae, *International Journal of Food Microbiology*, 67, 2001, 187– 195.
31. Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ, Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol, *Archives of Microbiology*, 174(4), 2000, 233– 238.
32. Knobloch K, Weigand H, Weis N, Schwarm HM, Vigneschow H, Action of terpenoids on energy metabolism, In: Brunke, E.J. (Ed.), *Progress in Essential Oil Research: 16th International Symposium on Essential Oils*, De Gruyter, Berlin, 1986, 429– 445.

Source of Support: Nil, Conflict of Interest: None.

