

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Département de Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

**Mémoire présenté dans le cadre de l'arrêté ministériel 1275 en vue de l'obtention du
diplôme de Master et diplôme startup –diplôme brevet**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biotechnologie
Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la plante de *Thymus vulgaris* et Élaboration d'une lotion de bain de bouche.

Présenté par : Zaibet Fatima Zohra

Le 09/07/2023

Adoui Assala

Jury d'évaluation :

Encadreur : Dr. BOULAHROUF Khaled (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Présidente : Dr. BENKAHOUL Malika (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Dr. MEGHNOUS Ouissem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Incubateur : BELLIL Ines (Professeur - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Cati : BETINA Soumia (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Secteur Socioéconomique : BENLATRECHE Salim (Catalyse Lab).

Année universitaire 2022 - 2023

Remerciement

Nous remercions en premier lieu et avant tout mon « Dieu » le tout puissant qui nous a éclairé le chemin de vie, et nous a donné le courage, la force, la patience jusqu'au dernier moment de ce long parcours d'étude. Nos remerciements vont particulièrement à Monsieur Khaled BOULAHROUF, notre encadrant, pour son aide et le temps qu'il nous a consacré, pour son soutien moral qui nous a été bénéfique jusqu'au dernier moment de ce travail, tout en nous faisant profiter de sa culture et de sa rigueur scientifique. Nous remercions également tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail. Il nous reste à remercier toutes les personnes nous ayant directement ou indirectement, scientifiquement et/ou moralement aidés et encouragés pendant la réalisation de ce mémoire. Enfin, il nous a été très difficile d'écrire cette page par souci d'oublier les nombreuses personnes qu'il nous faut citer pour leur aide, leur accueil, leur soutien...Qu'elles soient toutes assurées de notre plus profonde reconnaissance même si leurs noms n'y figurent pas.

Zaibet Fatima Zohra

Adoui Assala

Dédicace

- ❖ *C'est grâce à dieu, tout puissant qui m'a donné le courage et la Volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :*
- ❖ *A mon très cher papa et ma très chère maman qui tiennent une place immense dans mon cœur pour leurs Sacrifices, leurs soutiens moraux, de leur tendresse, de leurs encouragements tout au long de mes études et durant ce mémoire, ils m'ont offert tout pour que je réussisse, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait, j'espère qu'ils sont fiers de moi.*
- ❖ *A mon petit frère que j'aime Takieddine a ma belle-sœur Waad*
- ❖ *A ma très chère sœur warda pour leur soutien.*
- ❖ *A mon binôme Zahra*
- ❖ *A mes très chères amies : Amani, Racha, Lamis, Chaima.*
- ❖ *J'espère qu'ils sont fiers de moi.*

Dédicace

- ❖ *C'est grâce à dieu, tout puissant qui m'a donné le courage et la Volonté pour achever ce modeste travail que je dédie :*
- ❖ *A mon très cher papa et ma très chère maman qui tiennent une place immense dans mon cœur pour leurs Sacrifices, leurs soutiens moraux, de leur tendresse, de leurs encouragements tout au long de ma vie, ils m'ont offert tout pour que je réussisse, je ne les remercierai jamais assez pour tout ce qu'ils m'ont fait, j'espère qu'ils sont fiers de moi.*
- ❖ *A mon âme sœur Esma ma seule sœur et ma vie, et à mes cher frères, grâce à vous je n'ai besoin a personne.*
- ❖ *A mon binôme Assala.*
- ❖ *A mes très chères amies : Maria, Rihab, Houda, Lamis tellement je vous aime.*
- ❖ *J'espère qu'ils sont fiers de moi.*

Thymus vulgaris est une espèce botanique appartenant à la famille des Lamiaceae, et fait partie des plantes aromatiques médicinales (PAM), également connue sous le nom de "Zaïter" en Algérie. Les huiles essentielles (HE) sont des métabolites secondaires des plantes aromatiques qui possèdent des vertus thérapeutiques grâce à leurs activités biologiques. Notre étude vise à valoriser l'espèce *Thymus vulgaris*. Nous avons localisé les sites de sécrétion de l'huile essentielle en réalisant une étude anatomique des feuilles fraîches collectées à Ain Djarlab, dans la wilaya de Mila. L'extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles séchées a été réalisée par hydrodistillation selon la méthode de Clevenger. Nous avons évalué la qualité de l'huile essentielle selon les normes AFNOR, puis nous avons étudié ses activités biologiques in vitro, notamment son activité antimicrobienne par la méthode des disques sur gélose, ainsi que sa concentration minimale inhibitrice (CMI) contre six souches microbiennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*). Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE du *Thymus vulgaris* ont été soumis à une analyse de la variance à 3 facteurs (ANOVA 3) : Concentration, Souches, et leur interaction Concentration : Souches, afin de déterminer s'il y a un effet significatif sur la variable réponse "zone" en utilisant le logiciel statistique Excel. Nous avons également évalué sa toxicité aiguë in vivo et analysé sa composition chimique par CG/MS. L'huile essentielle est sécrétée au niveau des poils sécréteurs. Le rendement en huile essentielle obtenue était de 2,09 %. Cette huile présente un large spectre d'action contre toutes les souches testées, avec des diamètres d'inhibition variant de 7 à 46,5 mm pour les souches bactériennes et de 7 à 44,5 mm pour les souches fongiques, avec différentes concentrations d'huile essentielle testées (25 %, 50 %, 75 % et 100 %). La CMI obtenue pour les bactéries était semblable et égale à la CMI obtenue pour les champignons, avec une valeur estimée de 0,281 mg/ml. L'analyse de variance (ANOVA) que nous avons réalisée montre que les facteurs concentration, souche et leur interaction ont un effet significatif sur la variable réponse "zone". L'analyse de la composition chimique a permis d'identifier 39 constituants, les composés majoritaires étant le thymol (44,44 %) et le γ -terpinène (28,18 %), suivis du p-cymène (10,10 %), de l' α -terpinène (3,77 %), du bêta-myrcène (2,52 %), de l' α -phyllandrène (1,77 %) et du T-caryophyllène (1,44 %), avec un chémotype riche en thymol et moins riche en carvacrol. L'étude de la toxicité aiguë a révélé que cette huile essentielle était toxique chez les souris albinos à des doses supérieures à 1000 mg/kg (DL50). En conclusion, cette étude suggère que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle dépend des caractéristiques physico-chimiques, des composés présents et des souches microbiennes utilisées. Notre objectif est de développer une lotion pharmaceutique (bain de bouche) à base de cette huile essentielle, dans le but de l'utiliser pour les soins buccodentaires.

Mots clés : *Thymus vulgaris*, Huile essentielle, Extraction, Activité antimicrobienne, CMI, CG/MS, Thymol, DL50, Bain de Bouche.

Thymus vulgaris is a botanical species belonging to the Lamiaceae family and is part of medicinal aromatic plants (MAPs), also known as "Zaiter" in Algeria. Essential oils (EOs) are secondary metabolites of aromatic plants that possess therapeutic properties due to their biological activities. Our study aims to valorize the *Thymus vulgaris* species. We located the sites of essential oil secretion by conducting an anatomical study of fresh leaves collected in Ain Djarlab, Mila province. The extraction of essential oil from dried leaves was carried out through hydrodistillation using the Clevenger method. We evaluated the quality of the essential oil according to AFNOR standards and investigated its in vitro biological activities, including antimicrobial activity using the disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) against six microbial strains (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, and *Aspergillus brasiliensis*). The results of the antimicrobial activity evaluation of *Thymus vulgaris* EO were subjected to a three-factor analysis of variance (ANOVA 3): Concentration, Strains, and their interaction Concentration: Strains, to determine if there is a significant effect on the response variable "zone" using the statistical software Excel. We also evaluated its acute toxicity in vivo and analyzed its chemical composition by GC/MS. The essential oil is secreted at the level of secretory hairs. The obtained essential oil yield was 2.09%. This oil exhibits a broad spectrum of action against all tested strains, with inhibition diameters ranging from 7 to 46.5 mm for bacterial strains and from 7 to 44.5 mm for fungal strains, with different tested concentrations of essential oil (25%, 50%, 75%, and 100%). The MIC obtained for bacteria was similar and equal to the MIC obtained for fungi, with an estimated value of 0.281 mg/ml. The ANOVA analysis we performed shows that the factors Concentration, Strains, and their interaction have a significant effect on the response variable "zone". The analysis of the chemical composition identified 39 constituents, with the major compounds being thymol (44.44%) and γ -terpinene (28.18%), followed by p-cymene (10.10%), α -terpinene (3.77%), beta-myrcene (2.52%), α -phellandrene (1.77%), and T-caryophyllene (1.44%), with a chemotype rich in thymol and less rich in carvacrol. The acute toxicity study revealed that this essential oil was toxic to albino mice at doses higher than 1000 mg/kg (LD₅₀). In conclusion, this study suggests that the antimicrobial activity of the essential oil depends on physicochemical characteristics, present compounds, and microbial strains used. Our objective is to develop a pharmaceutical lotion (mouthwash) based on this essential oil for oral care purposes.

Keywords: *Thymus vulgaris*, Essential oil, Extraction, Antimicrobial activity, MIC, GC/MS, Thymol, LD₅₀, Mouthwash.

يعد الزعتر البري (*Thymus vulgaris*) نوعًا نباتيًا ينتمي إلى عائلة الشفويات (Lamiaceae) ويعتبر جزءًا من النباتات العطرية الطبية (MAPs)، والمعروف أيضًا بـ "الزعتر" في الجزائر. الزيوت الأساسية (EOs) هي مركبات ثانوية مستخلصة من النباتات العطرية وتتمتع بخصائص علاجية بفضل نشاطاتها البيولوجية. تهدف دراستنا إلى تعزيز نوعية الزعتر البري. قمنا بتحديد مواقع إفراز زيت الزعتر البري من خلال إجراء دراسة تشريحية للأوراق الطازجة التي تم جمعها في عين جرابلس، ولاية ميله. تم إجراء استخلاص الزيت الأساسي من الأوراق المجففة بواسطة التقطير البخار باستخدام طريقة كليفنجر. قمنا بتقييم نوعية الزيت الأساسي وفقًا لمعايير AFNOR وقمنا بدراسة نشاطاتها البيولوجية *in vitro*، بما في ذلك النشاط المضاد للميكروبات باستخدام طريقة انتشار الأقراص على الجيلاتين، بالإضافة إلى تحديد التركيز الحد الأدنى للتثبيط (MIC) ضد ستة سلالات ميكروبية (إيشيريشيا كولاي، بسودوموناس أيرجنوسا، ستافيلوكوكوس أوربيوس، باسيليسوبتيليس، كانديد أليكانس، وأسبرجيلوس برازيلينسيس). تم تقديم نتائج تقييم النشاط المضاد للميكروبات لزيت *Thymus vulgaris* لتحليل تباين ثلاثي العوامل (ANOVA 3) التركيز، السلالات، وتفاعلهما "التركيز: السلالات" لتحديد ما إذا كان هناك تأثير كبير على المتغير الاستجابة "المنطقة" باستخدام برنامج إكسل الإحصائي. قمنا أيضًا بتقييم سميتها الحادة *in vivo* وتحليل تركيبها الكيميائي بواسطة GC/MS. يتم إفراز الزيت الأساسي على مستوى شعيرات الإفراز. كانت نسبة الزيت الأساسي المستخلص 2.09%. يعرض هذا الزيت نطاقًا واسعًا من التأثير ضد جميع السلالات التي تم اختبارها، بأقطار تثبيط تتراوح من 7 إلى 46.5 ملم لسلالات البكتيريا ومن 7 إلى 44.5 ملم لسلالات الفطريات، مع تراكيز مختلفة مختبرة من الزيت الأساسي (25%، 50%، 75%، و100%). كانت قيمة MIC المحصلة للبكتيريا مشابهة ومتساوية للقيمة المحصلة للفطريات، بقيمة تقدر بـ 0.281 ملغ/مل. يوضح تحليل ANOVA الذي أجريته أن التركيز، السلالات، وتفاعلهما له تأثير كبير على المتغير الاستجابة "المنطقة". تحليل التركيب الكيميائي قد حدد 39 مكونًا، وكانت المركبات الرئيسية هي الثيمول (44.44%) والجاما-تيربينين (28.18%)، يليهما الباراسايمين (10.10%)، ألفا-تيربينين (3.77%)، بيتا-ميرسين (2.52%)، ألفا-فيلاندين (1.77%)، والتي-كاريوفيلين (1.44%)، مع نوع كيميائي غني بالثيمول وأقل غنى بالكارفاكرون. كشفت دراسة السمية الحادة أن هذا الزيت الأساسي كان سامًا لفئران الألبينو بجرعات تزيد عن 1000 ملغ/كغ. (LD50) في الختام، تشير هذه الدراسة إلى أن النشاط المضاد للميكروبات للزيت الأساسي يعتمد على الخصائص الفيزيوكيميائية والمركبات الموجودة والسلالات الميكروبية المستخدمة. هدفنا هو تطوير محلول صيدلاني (غسول الفم) يستند إلى هذا الزيت الأساسي لأغراض العناية الفموية.

Thymus vulgaris، الزيت الأساسي، الاستخلاص، النشاط المضاد للميكروبات، MIC، GC/MS، الثيمول، LD50، غسول الفم.

Liste des figures

Figure 1: répartition du genre <i>Thymus</i> dans le monde	5
Figure 2 : plante de <i>Thymus vulgaris</i> (thym commun)	8
Figure 3 : les structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielles de Thym	11
Figure 4 : certains effets biologiques de <i>Thymus vulgaris</i>	17
Figure 5 : mécanisme d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne	25
Figure 6 : mécanisme d'action antifongique du thymol	26
Figure 7 : les mécanismes possibles de l'activité antivirale du thymol	27
Figure 8 : moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes sous l'effet de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> testée.	60
Figure 9 : moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques sous l'effet de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> testée.	61
Figure 10 : diamètres des zones d'inhibition de l'activité antifongique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	62
Figure 11 : chromatogramme des composés de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> chromatogramme des composés de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	69
Figure 12 : composition en pourcentage des principaux composés de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	70

Liste des tableaux

Tableau 1 : localisation des principales espèces de genre <i>Thymus</i> en Algérie.	5
Tableau 4 : les souches microbiennes testées.	38
Tableau 5 : les concentrations des huiles essentielles préparées.	43
Tableau 6 : les caractéristiques des souris de l'expérimentation.	47
Tableau 7 : les concentrations d'huile essentielle utilisées pour le test de toxicité pour chaque lot. ...	48
Tableau 10 : rendement en huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	54
Tableau 11 : étude comparative des rendements en huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	55
Tableau 12 : caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	56
Tableau 13 : caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	Erreur !
Signet non défini.	
Tableau 14 : résultats de la densité Optique (Charge microbienne) pour chaque souche testée	58
Tableau 16 : résultats de l'activité antimicrobienne aux différentes concentrations de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	59
Tableau 17 : comparaison des résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> avec d'autres études.	63
Tableau 18 : évaluation de la CMI de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	64
Tableau 19 : évaluation de la CMI de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	64
Tableau 20 : comparaison des CMI et CMF de l'huile essentielle testée avec celles de quelques études.	65
Tableau 21 : analyse de variance de la zone d'inhibition en fonction de la souche, concentration et leur interaction.....	68
Tableau 22 : composition et pourcentages des composés chimiques majeurs de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	70
Tableau 23 : signes de toxicité et nombre de souris décédées après l'administration orale de doses croissantes d'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	72
Tableau 24 : les caractéristiques organoleptiques des deux essais réalisés.	75

Tableau 25 : résultats de la densité des quatre essais réalisés.	76
Tableau 03 : appareillage, verreries, réactifs et solutions.....	93
Tableau 07 : matériels non biologique pour la détermination de la (DL50).	96
Tableau 09 : le volume et les doses testées pour l'administration.....	97
Tableau 15 : activité antimicrobienne des HE de <i>Thymus vulgaris</i> exprimée en ZI (mm) et en CMI (mg/ml).....	98

Liste des photos

Photo 1 : les feuilles fraîches (à droite) les feuilles sèches (à gauches) du <i>Thymus vulgaris</i> utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.	31
Photo 2 : feuilles du <i>Thymus vulgaris</i> immergées dans le mélange d'eau distillée.....	31
Photo 3 : procédé de réalisation des coupes de la feuille du <i>Thymus vulgaris</i>	32
Photo 4 : montage d'extraction de type clevenger.....	34
Photo 5 : procédé de détermination de la densité relative de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> . 36	
Photo 6 : procédé de détermination de l'indice de réfraction de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	37
Photo 7 : procédé de détermination de pH d'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	37
Photo 8 : les souches microbiennes testées.	39
Photo 9 : procédé de dénombrement des suspensions d' <i>Aspergillus brasiliensis</i>	42
Photo 10 : procédé de préparation des dilutions de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	43
Photo 11 : aspect macroscopique des feuilles du <i>Thymus vulgaris</i>	51
Photo 12 : aspect microscopique des poils tecteurs de la feuille du <i>Thymus vulgaris</i> (GrX10).....	52
Photo 13 : aspect microscopique des poils sécréteurs au niveau de la feuille de <i>Thymus vulgaris</i> (GrX40).....	52
Photo 14 : aspect microscopique d'une glande peltée au niveau de la feuille du <i>Thymus vulgaris</i> (GrX40).....	53
Photo 15 : aspect microscopique d'une glande capitée de la feuille du <i>Thymus vulgaris</i> (GRX40)...	53
Photo 16 : aspect de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	56

Liste des planches

Planche 1 : localisation géographique du site de prélèvement	30
Planche 2 : les étapes réalisées pour la technique de double coloration.....	33
Planche 3 : protocole expérimentale d'ajustement de la densité optique des suspensions microbiennes préparées.....	40
Planche 5 : dispositif de l'analyse GC/MS au niveau de laboratoire.	46
Planche 6 : activité antimicrobienne.....	92
Planche 7 : activité antibactérienne de différentes concentrations de l'HE du <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis les souches bactériennes.....	95
Planche 8 : activité antifongiques de différentes concentrations de l'HE pure du <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis les souches fongiques.	96

Liste d'abréviations

<i>T. vulgaris</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
HEs	Huiles essentielles
AFNOR	Association Française de la Normalisation
HA	Hydrolat aromatique
HE	Huile essentielle
CO ₂	Dioxyde de carbone
EFS	Extraction par fluide à l'état supercritique
LOST	Obtention des Substances Thérapeutiques
CG/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
eV	Electronvolt
CRAPC	Centre de Recherche et d'Analyse physiques et Chimiques
mh	Masse d'huiles essentielles
mv	Masse d'essai du matériel végétal
pH	Potentiel d'Hydrogène
<i>ATCC</i>	<i>American Type Culture Collection</i>
SM	Solution mère
DZI	Diamètre zone d'inhibition
D	Diamètre
<i>NCCLS</i>	<i>Clinical and Laboratory Institutes</i>
d	dilution
UFC	Unité Formant Colonie
ml	millilitre
µm	micromètre
nm	nanomètre
°C	degré Celsius
DL50	La dose létale
Gr	Grossissement
LPS	lipopolysaccharides
DO	Densité optique

CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMF	Concentration minimale fongicide
γ -Terpinene	Gamma- Terpinene
β -terpinène	Béta-terpinène
p-cymène	para-cymène
T-caryophyllene	Trans-caryophyllene
TR	Temps de rétention

Table des matières

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des photos.....	
Liste des planches	
Liste d'abréviations	
Sommaire	
Introduction	1
Chapitre1 : La plante de <i>Thymus vulgaris</i>	4
1. Historique.....	4
2. Distribution et habitat.....	4
2.1. Dans le monde.....	4
2.2. En Algérie.....	5
3. Taxonomie et description botanique.....	6
3.1. Position systématique	6
3.2. Description botanique	7
4. Applications médicinale et pharmaceutique de la plante <i>Thymus vulgaris</i>	9
5. Composition chimique de la plante <i>Thymus vulgaris</i>	10
Chapitre2 : Les huiles essentielles.....	13
1. Définition des huiles essentielles.....	13
2. Localisation des huiles essentielles.....	13
3. Caractéristiques et propriétés des huiles essentielles	13
3.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles	13
3.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles.....	13
4. Composition des huiles essentielles.....	14

5. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles de <i>Thymus vulgaris</i>	14
5.1. Techniques d'extraction traditionnelles	14
5.1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	14
5.1.2. Extraction par Hydrodistillation	15
5.1.3. Extraction par solvant	15
5.2. Techniques d'extraction innovantes	16
5.2.1. Extraction par fluide à l'état supercritique	16
5.2.2. Extraction assistée par micro-ondes	16
6. Conservation des huiles essentielles	16
7. Activités biologiques de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	17
Activités antioxydants de <i>Thymus vulgaris</i>	18
<input type="checkbox"/> Activité antimicrobienne de <i>Thymus vulgaris</i>	18
<input type="checkbox"/> Activité antibactérienne de <i>Thymus vulgaris</i>	18
<input type="checkbox"/> Activité antifongique	19
<input type="checkbox"/> Activité antivirale de <i>Thymus vulgaris</i>	19
<input type="checkbox"/> Activité anti-inflammatoire	19
8. Les méthodes d'administration les plus courantes des huiles essentielles	20
8.1. Administration par inhalation	20
8.2. Administration cutanée/muqueuse (topique)	20
8.3. Administration par voie orale	20
9. Précautions d'emploi des huiles essentielles	21
Chapitre3 : Maladies buccales et action des substances bio-actives des bains de bouche	22
1. Le microbiote buccal	22
2. Les maladies bucco-dentaires	23
3. Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les microorganismes	24
3.1. Sur la cellule bactérienne	24
3.2. Sur la cellule fongique	25
3.3. Sur la cellule virale	27

Partie expérimentale	28
Matériels et méthodes	29
1. Matériel végétale	29
1.1. Site de prélèvement	30
1.2. Les traitements préliminaires des échantillons	31
1.3. Étude de la localisation des sites de sécrétion des huiles essentielles dans les feuilles du <i>Thymus vulgaris</i>	31
1.4. La réalisation des coupes de la feuille à étudiée	32
1.5. Coloration des parois	32
1.6. Extraction de l'HE du <i>Thymus vulgaris</i>	33
1.6.1. Protocole d'Extraction de l'HE par hydrodistillation	33
1.7. Détermination du rendement en huiles essentielles	34
2. Les contrôles de qualité de l'huile essentielle	35
2.1. Méthodes de caractérisation de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	35
2.1.1. Evaluation des caractéristiques organoleptiques	35
2.1.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques	35
3. Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du <i>Thymus vulgaris</i>	38
3.1. Les souches microbiennes testées	38
3.2. Culture et conservation des souches	38
3.3. Préparation des suspensions microbiennes (inoculum)	39
3.4. Préparation des concentrations des huiles essentielles testées	42
3.5. L'antibiogramme (Aromatogramme)	44
3.5.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	44
3.5.2. Mise en évidence de l'activité antifongique	44
3.6. Détermination de concentration minimale inhibitrice CMI	44
4. Analyse statistique	45
5. Elaboration des profile chromatographiques	45
6.1. Analyse des constituants chimiques de l'huile essentielle par la GC/MS	45

7. Évaluation de la toxicité de l'huile essentielle du Thym par la détermination de sa dose létale (DL50).....	47
7.1. Préparation des animaux (souris).....	47
7.2. Préparations de matériels non biologiques	47
7.3. Préparation des doses.....	48
7.4. Administration des doses	48
8. La préparation d'une lotion parapharmaceutique	49
8.1. Proposition d'une solution antiseptique pour la cavité buccale (Bain de bouche)	49
Résultats et discussion.....	51
1. Identification macroscopique et microscopique du matériel végétal utilisé.....	51
1.1. Aspect macroscopiques des feuilles du <i>Thymus vulgaris</i>	51
1.2. Aspect microscopique des feuilles du <i>Thymus vulgaris</i>	51
2. Extraction de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	54
2.1. Evaluation du rendement en huile essentielle	54
3. Contrôles de qualités de l'HE du <i>Thymus vulgaris</i>.....	56
3.1. Caractéristiques organoleptiques.....	56
3.2. Caractéristiques physico-chimiques du l'HE du <i>Thymus vulgaris</i>	57
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'Huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	58
4.1. Lecture de la concentration de suspensions microbiennes préparées.....	58
4.2. L'aromatogramme	58
4.2.1. Evaluation qualitative	58
4.2.1.2. Etude comparative de l'activité antimicrobienne.....	62
4.2.2. Evaluation quantitative.....	63
4.2.3. Etude statistique	67
5. Analyse de la composition chimique.....	68
5.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	68
6. Evaluation de la toxicité aigüe de l'huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i>	72
7. Réalisation d'une formulation parapharmaceutique.....	75
7.1. Teste et contrôle du produit effectué pour chaque dosage	75

7.1.1.	Caractéristiques organoleptiques de différents essais réalisés.	75
7.1.2.	Caractéristiques physicochimiques de différents essais réalisés	76
Conclusion		79
Références bibliographiques		
Annexes		

Thymus vulgaris, communément appelé thym, est une plante aromatique largement utilisée dans le domaine de la santé et de la médecine traditionnelle. Cette plante, appartenant à l'ordre des Myrtales et à la famille des Lamiacées, possède des propriétés médicinales précieuses, notamment dans le domaine des soins bucco-dentaires. L'huile essentielle extraite des feuilles et des fleurs du thym est très appréciée pour ses nombreux bienfaits thérapeutiques.

Face à l'essor de la médecine naturelle et à la recherche constante de solutions alternatives et naturelles pour les soins de santé, l'huile essentielle de thym représente un domaine d'étude prometteur. Son utilisation traditionnelle dans les soins bucco-dentaires et son potentiel thérapeutique en font un sujet d'intérêt pour la recherche scientifique [1].

Des études antérieures ont démontré l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thym. Les principaux composés actifs de cette huile essentielle, tels que le thymol et le carvacrol, ont montré des effets bénéfiques contre différentes souches bactériennes, notamment *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* [2]. Cette activité antimicrobienne peut être bénéfique dans le contexte des soins bucco-dentaires pour combattre les infections et promouvoir une santé buccale optimale.

Dans ce mémoire, notre objectif est de valoriser l'huile essentielle de thym en développant une lotion pharmaceutique (bain de bouche) spécifiquement dédiée aux soins bucco-dentaires. Pour atteindre cet objectif, nous prévoyons d'utiliser plusieurs techniques.

Tout d'abord, nous procéderons à une extraction rigoureuse de l'huile essentielle de thym à partir d'échantillons de haute qualité. Cette étape d'extraction nous permettra d'obtenir une huile essentielle pure et de haute qualité [3]. Ensuite, nous évaluerons les caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle selon les normes de référence pour garantir sa qualité et son potentiel thérapeutique [3]. Parallèlement, nous mènerons une analyse complète de la composition chimique de l'huile essentielle en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). Cette analyse nous permettra d'identifier et de quantifier les principaux composés actifs présents dans l'huile de thym, tels que le thymol, le trans-caryophyllène, l'acétylégénol et l' α -caryophyllène [4].

De plus, nous évaluerons l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de thym en utilisant des méthodes appropriées, telles que la méthode de diffusion des disques sur gélose, pour déterminer son efficacité contre différentes souches microbiennes [2]. Nous mesurerons également la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour évaluer la puissance antimicrobienne de l'huile essentielle. Enfin, nous réaliserons un test de toxicité aiguë pour

déterminer la dose létale médiane (DL50) de l'huile essentielle de thym. Cela nous permettra d'évaluer la sécurité de l'utilisation de cette huile essentielle dans la lotion pharmaceutique (bain de bouche) pour les soins bucco-dentaires [5].

En conclusion, ce mémoire vise à valoriser l'huile essentielle de thym en développant une lotion pharmaceutique (bain de bouche) spécifique pour les soins bucco-dentaires. En réalisant une extraction rigoureuse de l'huile essentielle, en évaluant sa composition chimique, son activité antimicrobienne et sa toxicité, nous cherchons à fournir une solution naturelle, efficace et sûre pour l'hygiène buccale quotidienne [1, 2, 3, 4, 5].

Partie bibliographique

1. Historique

Thymus vulgaris, également connu sous le nom de "thym", est utilisé depuis de nombreuses années pour ses qualités aromatiques, culinaires et médicinales. Le thym tire son nom du mot grec "thymos", qui signifie la bravoure ou la robustesse. Selon les écrits de Dioscoride, le thym a d'abord été utilisé comme plante médicinale au premier siècle de notre ère. Cependant, il a été initialement utilisé comme épice dans la région méditerranéenne avant de se répandre dans le monde entier[6].

Le thym a une longue histoire remontant à l'Antiquité, où il était utilisé dans diverses cultures. En Égypte, il était associé à une plante aromatique utilisée pour embaumer les morts. Il était également utilisé pour purifier l'air et parfumer les bains thermaux. Au Moyen-Âge, le thym était brûlé en offrande aux dieux et utilisé pour aromatiser les plats lourds et peu digestes des chasses seigneuriales. Il était également utilisé dans la fabrication de liqueurs, de cosmétiques et d'infusions. Ses propriétés anti-infectieuses, toniques et immunostimulantes en ont fait une plante indispensable pendant l'hiver [7].

Le thym est largement utilisé dans le secteur thérapeutique en raison de ses qualités pharmacologiques et aromatiques, notamment ses propriétés antispasmodiques, antiseptiques, antitussives et expectorantes. Il est l'une des espèces les plus couramment utilisées en médecine conventionnelle pour favoriser les processus corporels et profiter des effets antibactériens des huiles essentielles [8];[9].

Le thym (*Thymus vulgaris L.*) est un arbuste vivace de la famille des Lamiacées, réputé pour son parfum agréable. Il est originaire de nombreuses régions du monde, notamment des régions montagneuses de la côte méditerranéenne de la Turquie. Le thym est utilisé dans ces régions pour sa plante aromatique bien connue, son huile essentielle et son eau aromatique. Dans l'Antiquité, les Romains l'utilisaient en cuisine et comme source de miel, tandis que les Grecs l'utilisaient comme encens dans leurs temples. Les huiles essentielles extraites des feuilles et des fleurs fraîches sont utilisées pour parfumer les aliments, les médicaments et les cosmétiques [10].

2. Distribution et habitat

2.1. Dans le monde

Thymus vulgaris L. est une plante indigène du sud de l'Europe. On la trouve principalement dans cette région, ainsi que dans certaines parties du sud-est de l'Italie et dans la moitié orientale

de la péninsule ibérique. Elle est également cultivée depuis l'est de la péninsule ibérique jusqu'au sud de l'Italie, le long de la côte méditerranéenne française. Aujourd'hui, elle est cultivée à des fins médicinales, pour le thé et comme épice. Dans les plaines et les collines, le *Thymus vulgaris* pousse encore à l'état sauvage, en compagnie de plantes telles que la lavande, le romarin, la sauge et bien d'autres. Du littoral aux montagnes, cette plante prolifère dans des environnements pierreux, arides et ensoleillés [8].

La Figure 01 représente la répartition du genre *Thymus* dans le monde selon Stahl-Biskup et Saez en 2002. La ligne en pointillé représente toutes les sections, à l'exception de Th. Sect. Serpyllum et Th. sect. Hyphodromoisubsect. Serpyllastrum [11].

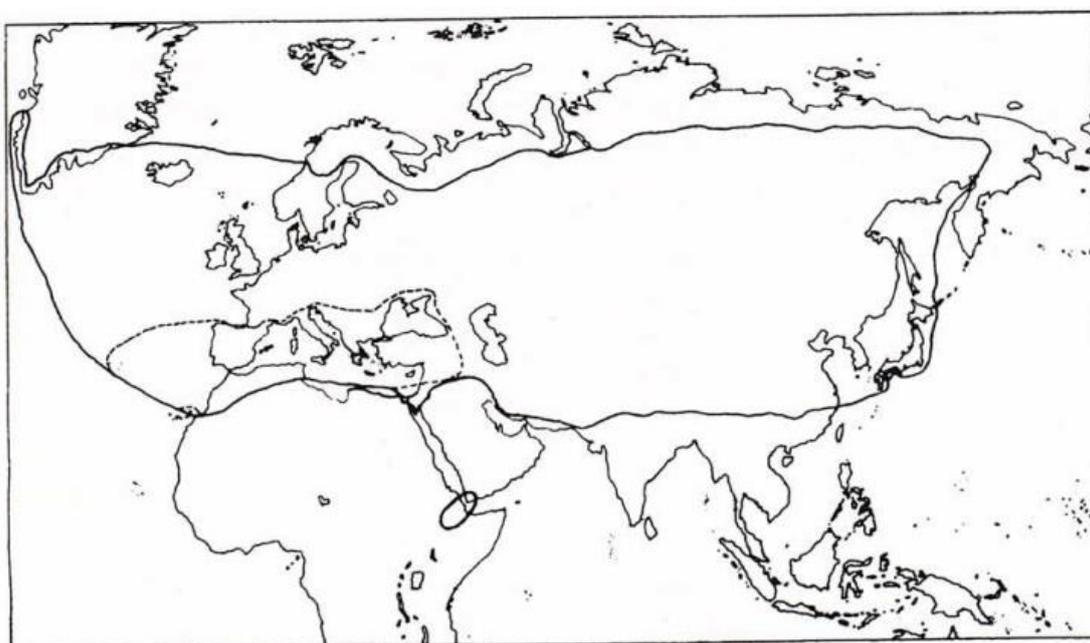


Figure 1: répartition du genre *Thymus* dans le monde [11].

2.2.En Algérie

En Algérie, plusieurs espèces de plantes appartenant au genre *Thymus* peuvent être trouvées le long de la côte ainsi qu'à l'intérieur des terres, principalement dans les régions arides [12]. **(Le tableau 1)** présente leur répartition géographique.

Tableau 1 : localisation des principales espèces de genre *Thymus* en Algérie [13].

Espèces	Découverte par	Localisation
<i>Thymus capitalus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région Tlemcen

<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous-secteur de l'atlas La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois
<i>Thymus guyoni</i>	Noé	Rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois
<i>Thymus pollidus</i>	Coss	Très rare dans le sous-secteur de l'atlas Saharien et constantinois
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous-secteur des hauts plateaux algérois

3. Taxonomie et description botanique

3.1. Position systématique

La classification botanique de *Thymus vulgaris* selon [14] est la suivante :

- **Règne** : plante
- **Sous règne** : phanérogames
- **Embranchement** : Spermaphytes

- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous-classe** : Dialypétales
- **Ordre** : *Lamiales*
- **Famille** : *Lamiaceae*
- **Genre** : *Thymus*
- **Espèce** : *Thymus vulgaris*

La famille des Lamiacées comprend 928 espèces qui composent le genre *Thymus*. Les genres les plus similaires sont *Origanum*, *Satureja*, *Micromeria* et *Thymbra*. Les données chromosomiques, qui jouent un rôle crucial dans l'information taxonomique, sont utilisées pour classer les espèces de *Thymus*. En raison de leur petite taille et de leur apparence similaire, les chromosomes des espèces de *Thymus* sont difficiles à distinguer [15].

3.2.Description botanique

Thymus vulgaris L. est une plante aromatique vivace à croissance verticale, atteignant une hauteur de 10 à 30 cm. Sa base est ligneuse [15].

La **Figure 02** présente la plante de *Thymus vulgaris*, basée sur l'étude de **Halat et al. en 2022** [7].

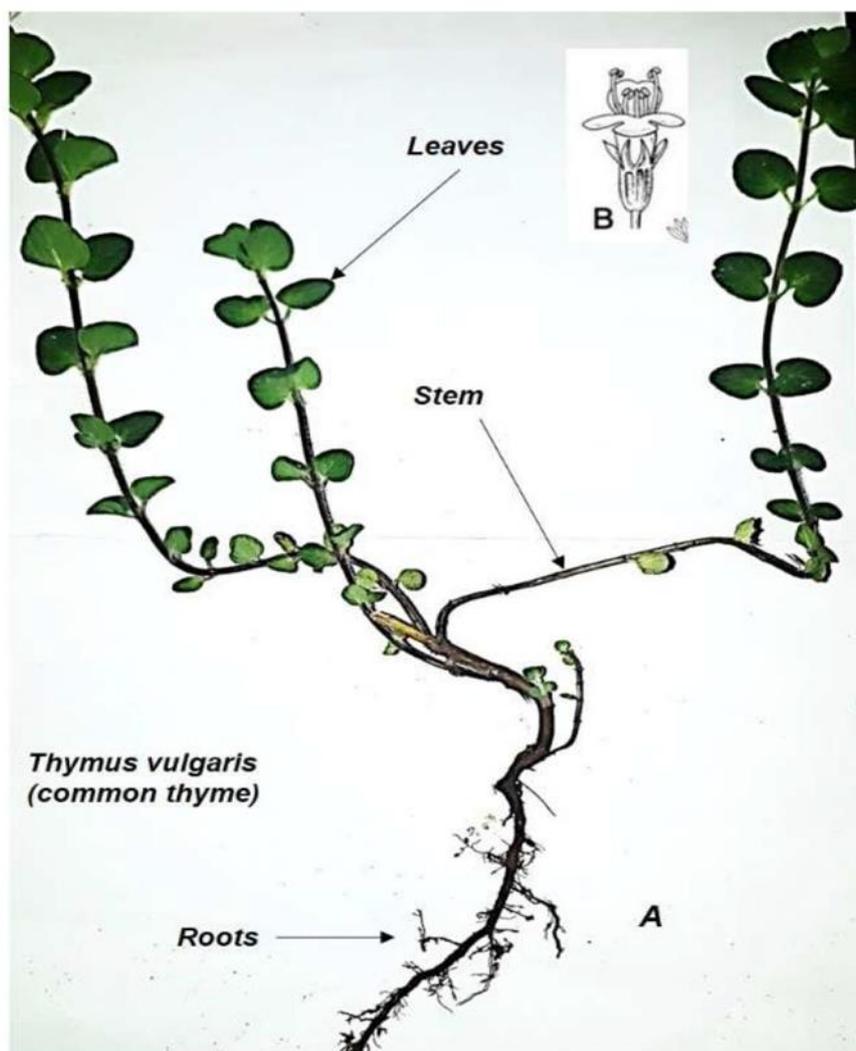


Figure 2 : plante de *Thymus vulgaris* (thym commun) [6].

(A) Parties végétatives de la plante : feuilles, tige et racines

Thymus vulgaris présente des feuilles persistantes, petites et ovales, de couleur verte. Les feuilles sont généralement disposées de manière opposée le long de la tige. La tige est ligneuse à la base et présente une croissance verticale. Les racines de *Thymus vulgaris* sont fibreuses et s'étendent dans le sol pour absorber les nutriments [15].

(B) Partie reproductrice de la plante

Fleur de type cyme, de couleur pourpre et blanche, bisexuée et à deux lèvres avec un calice glandulaire poilu responsable d'un parfum agréable. Le croquis est une gracieuseté des auteurs [6].

- **Tiges** : Les tiges de *Thymus vulgaris* sont ligneuses à la base et herbacées dans la partie supérieure. Elles ont une forme presque cylindrique. Ces tiges sont ligneuses et très

ramifiées, regroupées en touffes ou en buissons denses. Elles peuvent avoir une épaisseur significative vers leur base [15].

- **Feuilles :** Les feuilles de *Thymus vulgaris* sont petites, opposées et de couleur vert grisâtre. Elles ont une forme oblongue-lancéolée à linéaire et sont tachetées de glandes. Les bords des feuilles sont recourbés. Elles mesurent généralement de 5 à 10 mm de longueur et de 0,8 à 2,5 mm de largeur [15].
- **Fleurs :** Les fleurs de *Thymus vulgaris* sont pourpre pâle, avec deux lèvres distinctes. Elles ont un calice glandulaire poilu. Les fleurs sont entourées de bractées ressemblant à des feuilles, disposées en verticilles lâches. Elles se regroupent en grappes axillaires le long des branches ou forment des têtes terminales ovales ou sphériques. Les fleurs mesurent jusqu'à 5 mm de longueur [15].

Thymus vulgaris peut tolérer des conditions froides et sèches, ainsi que des habitats pauvres en nutriments et salins. Il prospère dans des sols neutres à alcalins, limoneux et sablonneux. Sur les roches calcaires du Liban, *T. vulgaris* pousse en grappes. Bien qu'il ne nécessite pas beaucoup d'eau, il a besoin d'une exposition complète au soleil. Sa durée de vie maximale est de 25 ans et il n'a pas tendance à envahir les milieux. La pourriture des racines est la principale maladie affectant *Thymus vulgaris*. Le thym peut également être multiplié par marcottage, boutures et graines [6].

4. Applications médicinales et pharmaceutiques de la plante *Thymus vulgaris*

Le thym (*Thymus vulgaris*) a été largement utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter diverses affections. Il a été notamment utilisé pour soigner les affections respiratoires telles que la coqueluche, la bronchite et l'asthme, en utilisant des tisanes, des pommades, des teintures, des sirops ou en inhalant de la vapeur d'eau [16].

En plus de ses utilisations dans le traitement des maux de dents, des infections urinaires et de la dyspepsie, le thym est également utilisé pour prévenir le durcissement des artères. Le thymol, l'un de ses composés essentiels, possède des propriétés antibactériennes et antiparasitaires, ainsi que la capacité d'éliminer les champignons de l'estomac et de l'intestin. Il a également été démontré qu'il stimule l'appétit [14].

L'huile essentielle de thym, principalement composée de thymol, présente une efficacité antibactérienne contre des germes tels que *Salmonella* et *Staphylococcus*. Les propriétés antibactériennes et toniques du thym en font un stimulant précieux du système immunitaire,

notamment dans le traitement des infections fongiques et des infections thoraciques telles que la bronchite, la coqueluche et la pleurésie [17].

Le thym est considéré comme un antibiotique, un anthelminthique, un astringent, un carminatif, un désinfectant, un complément médical et un tonique[18]. Il est également efficace dans le traitement des inflammations et des laryngites. Le thymol, présent dans l'huile essentielle de thym, possède des propriétés anti-entérobactériennes [19].

En application topique, le thym est utilisé pour traiter les affections cutanées telles que l'acné, les dermatites, les peaux grasses et les piqûres d'insectes. Une variante plus douce appelée "huile de thym blanc" peut être utilisée sur la peau pour traiter les piqûres, les morsures, les névralgies et les douleurs rhumatismales [14].

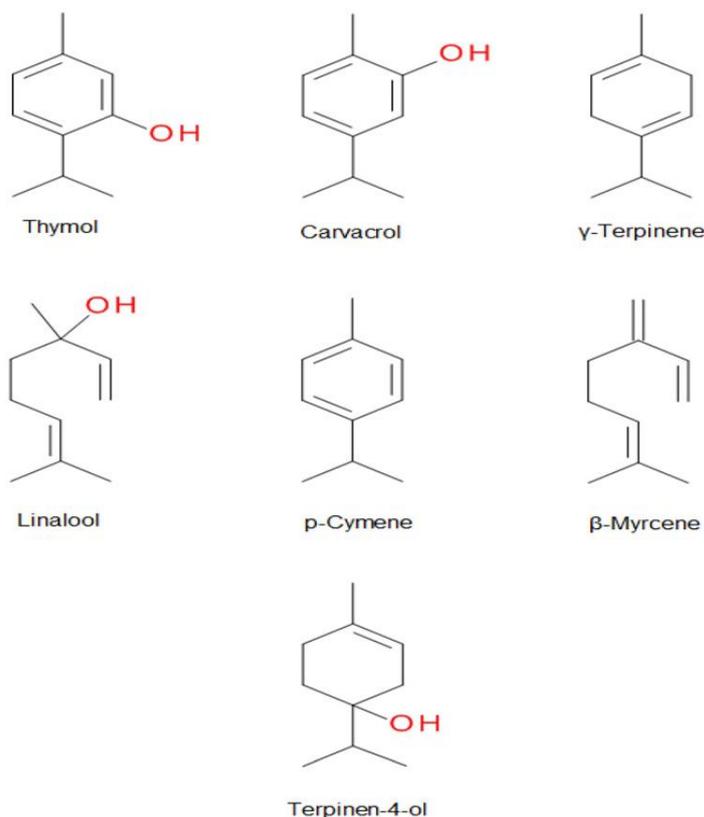
5. Composition chimique de la plante *Thymus vulgaris*

Nombreuses études ont été menées sur la composition chimique de différentes espèces de thym. La composition primaire du thym varie en fonction du climat et de l'emplacement, et elle est caractérisée par une gamme variée de composés chimiques et d'huiles essentielles [6]. L'huile essentielle de thym présente un taux élevé de monoterpènes oxygénés (56,53 %) et de faibles quantités d'hydrocarbures monoterpéniques (28,69 %), d'hydrocarbures sesquiterpéniques (5,04 %) et de sesquiterpènes oxygénés (1,84 %) [18].

Les groupes chimiques auxquels appartiennent les composants de l'huile essentielle (HE) de thym comprennent les monoterpènes, les alcools monoterpéniques, les dérivés phénoliques, les cétones, les aldéhydes, les éthers et les esters. Au sein de l'espèce *T. vulgaris*, il existe plusieurs chémotypes qui diffèrent par le composant primaire de l'HE ; néanmoins, seul le "type thymol", dont le thymol est le composant primaire, est classé dans la pharmacopée européenne. Le thymol (2-isopropyl-5-méthylphénol) et le carvacrol (2-méthyl-5-(propan-2-yl) phénol) sont les deux monoterpènes phénoliques isomériques qui constituent la majorité de l'huile essentielle (HE) de thym. Après l'aromatisation du -terpinène en p-cymène, ces deux monoterpènes sont biosynthétisés par hydroxylation du p-cymène. **Voir (Tableau 02) (Figure 03)[20].**

Tableau 2 : les différents chémotypes de *Thymus vulgaris* L [35].

	Thym à linalol	Thym à thymol	Thym à thujanol	Thym à géraniol	Thym à carvacrol	Thym à paracymène
Famille biochimiques	Monoterpénol	Monoterpénol	Monoterpénol	Monoterpénol	Monoterpénol	Monoterpénol

**Figure 3** : les structures chimiques des composés majoritaires de l'huile essentielles de Thym [19].

Le thym est riche en antioxydants phénoliques et en flavonoïdes tels que la zéaxanthine, la lutéine, la pigénine, la naringénine, la lutéoline et la thymonine. Les feuilles de thym contiennent des quantités concentrées de potassium, de fer, de calcium, de manganèse, de magnésium et de sélénium. Le thymol est le principal ingrédient de l'huile essentielle extraite du thym et joue un rôle essentiel dans son activité antioxydante[14].

Le polymorphisme chimique de *Thymus vulgaris* est bien connu, avec le thymol et le carvacrol comme deux composés à structure phénolique, et le géraniol, le β-terpinéol, le thujanol-4, le linalol et le 1,8-cinéole comme cinq composés sans structure phénolique (**Figure**

03). On a identifié au moins six chimiotypes différents d'huiles essentielles dans *Thymus vulgaris*[6]. Voir (Tableau 02).

La composition chimique de la plante *Thymus vulgaris* est influencée par plusieurs facteurs tels que le génotype, l'écologie et la technologie de culture et de traitement. Ces éléments peuvent entraîner une diversité de caractéristiques et de compositions chimiques parmi les plantes de la même espèce cultivées dans différents environnements [21].

1. Définition des huiles essentielles

Les huiles essentielles, également connues sous le nom d'essences de plantes aromatiques, sont des composés volatils, odorants et huileux principalement produits par les plantes [22]. En 1987 l'Association Française de la Normalisation (AFNOR) a défini les huiles essentielles des produits obtenus à partir de matières premières végétales, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des agrumes, soit par distillation à sec. Elles sont ensuite séparées de la phase aqueuse par des procédés physiques[23].

2. Localisation des huiles essentielles

Tous les organes végétaux, tels que les bourgeons, les fleurs, les feuilles, les tiges, les rameaux, les graines, les fruits, les racines, le bois et l'écorce, sont capables de synthétiser des huiles essentielles. Ces huiles sont ensuite stockées dans des cellules sécrétrices, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires [22]. Les huiles essentielles se trouvent dans le cytoplasme des cellules sécrétrices [24].

3. Caractéristiques et propriétés des huiles essentielles

3.1. Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles présentent les caractéristiques suivantes

- **Aspect** : Elles peuvent être liquides à température normale, mais certaines peuvent être solides ou résineuses [22]. Elles sont peu solubles dans l'eau mais solubles dans les alcools, les huiles fixes et la plupart des solvants organiques [25].
- **Couleur** : Elles existent dans une variété de couleurs, allant du bleu au rouge brunâtre foncé, et du jaune pâle au vert émeraude [22].
- **Odeur** : L'arôme des huiles essentielles est souvent leur caractéristique la plus distincte, pouvant être incroyablement agréable ou répugnant [25].

3.2. Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

En général, les huiles essentielles présentent les propriétés physico-chimiques suivantes

- La densité inférieure à celle de l'eau.
- L'indice de réfraction élevé, ce qui entraîne souvent une polarisation de la lumière [26].

4. Composition des huiles essentielles

Ces huiles essentielles sont des mélanges complexes qui peuvent contenir environ 300 substances chimiques distinctes [27]. Elles sont composées de substances organiques volatiles, ayant généralement un poids moléculaire inférieur à 300. Ces composés volatils appartiennent à différents groupes chimiques, tels que les alcools, les éthers ou oxydes, les aldéhydes, les cétones, les esters, les amines, les amides, les phénols, les hétérocycles et les terpènes, qui représentent la majorité d'entre eux. Les alcools, les aldéhydes et les cétones contribuent à une large gamme d'arômes, tels que les notes fruitées (E)-nerolidol, florales (linalol), d'agrumes (limonène), d'herbes (-sélinène), etc. [24].

De plus, la famille des terpènes constitue la majorité des composants des huiles essentielles. Jusqu'à présent, des milliers de terpènes ont été identifiés dans les huiles essentielles, comprenant des dérivés d'alcools fonctionnalisés (géraniol, -bisabolol), des cétones (menthone, p-vétivone), des aldéhydes (citronellal, sinensal), des esters (acétate de -tépinyle, acétate de cédyle) et des phénols (thymol) [28].

5. Les méthodes d'extraction des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*

Le processus d'extraction est essentiel pour garantir la pureté des huiles essentielles. Les méthodes d'extraction peuvent être divisées en deux catégories : les méthodes classiques et les méthodes innovantes.

5.1. Techniques d'extraction traditionnelles

Les techniques conventionnelles utilisées pour extraire les huiles essentielles végétales sont basées sur la distillation à la vapeur d'eau [29].

5.1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour obtenir des huiles essentielles. Elle consiste à faire passer de la vapeur d'eau à travers le matériau végétal, sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont ensuite condensées, décantées et séparées en une phase aqueuse (HA) et une phase organique (HE).

Cette méthode permet d'éviter certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation qui pourraient altérer la qualité de l'huile. De plus, l'odeur de l'huile essentielle obtenue est plus

délicate, et les notes de tête sont riches en esters grâce au processus de distillation régulier et rapide. Environ 95 % des molécules volatiles peuvent souvent être recueillies en 30 minutes [30].

5.1.2. Extraction par Hydrodistillation

L'hydrodistillation est la méthode d'extraction la plus ancienne et la plus simple des huiles essentielles. Le processus commence par l'immersion directe des composants végétaux dans l'eau à l'intérieur d'un alambic, suivi de l'ébullition de l'ensemble. L'appareil se compose d'une source de chaleur, d'un récipient (l'alambic), d'un condenseur pour transformer la vapeur en liquide, et d'un décanteur pour recueillir le condensat et séparer les huiles essentielles de l'eau. Cette technique permet une extraction des huiles essentielles sans surchauffe, car les huiles sont immergées dans l'eau. L'avantage principal de cette méthode est sa capacité à isoler les composants des plantes en dessous de 100°C. Cependant, certaines parties délicates des plantes, notamment les fleurs, ne supportent pas le traitement par distillation à la vapeur ou hydrodistillation, ce qui constitue un inconvénient de cette méthode. Le rendement et la composition de l'huile essentielle sont fortement influencés par les conditions opératoires, notamment la durée de la distillation [29] ; [30].

5.1.3. Extraction par solvant

La méthode d'extraction par solvant utilise des solvants tels que l'acétone, l'éther de pétrole, l'hexane, le méthanol ou l'éthanol pour extraire les composants floraux délicats ou fragiles qui ne peuvent pas être extraits par la chaleur ou la vapeur d'eau. Les échantillons de plantes sont combinés avec les solvants et légèrement chauffés, puis les solvants sont filtrés et évaporés. Le filtrat contient la résine, qui est une combinaison de cire, d'arôme et d'huile essentielle. L'huile essentielle est ensuite ajoutée au mélange de filtrats pour la dissoudre dans l'alcool, puis elle est distillée à basse température. L'huile absolue aromatique reste dans le résidu du pot tandis que l'alcool absorbe le parfum et s'évapore pendant le processus de distillation [29].

Cependant, cette méthode est plus difficile que les autres procédures, ce qui la rend plus longue et plus coûteuse [29]. Les problèmes de sécurité et de toxicité, ainsi que les lois sur la protection de l'environnement, plaident en faveur d'une utilisation restreinte de l'extraction par solvants organiques volatils. Néanmoins, cette méthode évite l'effet hydrolysant de la vapeur et les rendements sont généralement plus élevés que pour la distillation. Il convient de noter que

deux nouvelles méthodes ont été développées ces dernières années en réponse à ces problèmes : l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction au CO₂ supercritique [30].

5.2. Techniques d'extraction innovantes

5.2.1. Extraction par fluide à l'état supercritique

L'extraction par fluide à l'état supercritique (SFE) est une technique d'extraction qui utilise des solvants à l'état supercritique. Cela signifie que le solvant est dans un état intermédiaire entre la phase liquide et la phase gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment un pouvoir de solvation accru. La SFE est réalisée dans des conditions de température et de pression particulières. Elle est également appelée extraction assistée par CO₂ supercritique car 90 % des SFE sont réalisées avec du dioxyde de carbone (CO₂). Cette méthode est appréciée pour sa non-toxicité, son faible coût, sa disponibilité et sa facilité à éliminer le solvant de l'extrait. La SFE peut être considérée comme une approche "verte" car elle utilise peu ou pas de solvant organique et d'eau. L'approche prétendument "verte" appelée EFS, qui utilise peu ou pas de solvant organique et d'eau, est plus rapide que les techniques conventionnelles d'extraction. Les compositions chimiques des huiles essentielles obtenues par SFE peuvent être différentes de celles obtenues par hydrodistillation, tant en termes de qualité que de quantité [30].

5.2.2. Extraction assistée par micro-ondes

Cette méthode permet d'extraire rapidement des huiles essentielles à partir de graines sèches, d'herbes parfumées et d'épices. La capacité d'obtenir des huiles essentielles avec un rendement et une sélectivité élevée, des temps d'extraction plus rapides et une procédure respectueuse de l'environnement ne sont que quelques-uns des avantages de l'extraction assistée par micro-ondes. Dans cette méthode, les échantillons de plantes sont chauffés à l'aide de la technologie des micro-ondes, puis séchés à l'aide d'un processus appelé distillation sèche qui fonctionne à la pression atmosphérique sans utiliser de solvant. Cette méthode présente un certain nombre d'avantages, notamment des temps d'extraction plus courts et une utilisation moindre de solvants[29].

6. Conservation des huiles essentielles

La plupart des huiles essentielles ont une durée de conservation longue et peuvent même s'améliorer avec le temps. Toutefois, il est essentiel de les conserver correctement et fermées. Seules quelques huiles essentielles obtenues à partir de fruits tels que les agrumes ont une durée

de conservation plus courte, généralement de 1 à 2 ans après leur pressage. Pour prolonger la durée de vie de ces huiles essentielles d'agrumes (orange, citron, mandarine, bergamote et pamplemousse), il est recommandé de les conserver dans un endroit frais si elles ne sont pas utilisées régulièrement[31].

7. Activités biologiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Le thym est largement utilisé dans l'alimentation et l'industrie des parfums en raison de ses propriétés aromatiques, de son pouvoir d'amélioration des saveurs et de ses qualités de conservateur alimentaire grâce à ses effets antibactériens et antioxydants. En plus de ces effets, le thym présente une gamme d'activités biologiques[32].

Voici un résumé des principales activités biologiques et thérapeutiques du thym (**Figure04**) et de ses principaux composants, en mettant l'accent sur ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antibactériennes et antimicrobiennes. La figure 6 illustre également ces propriétés[6].

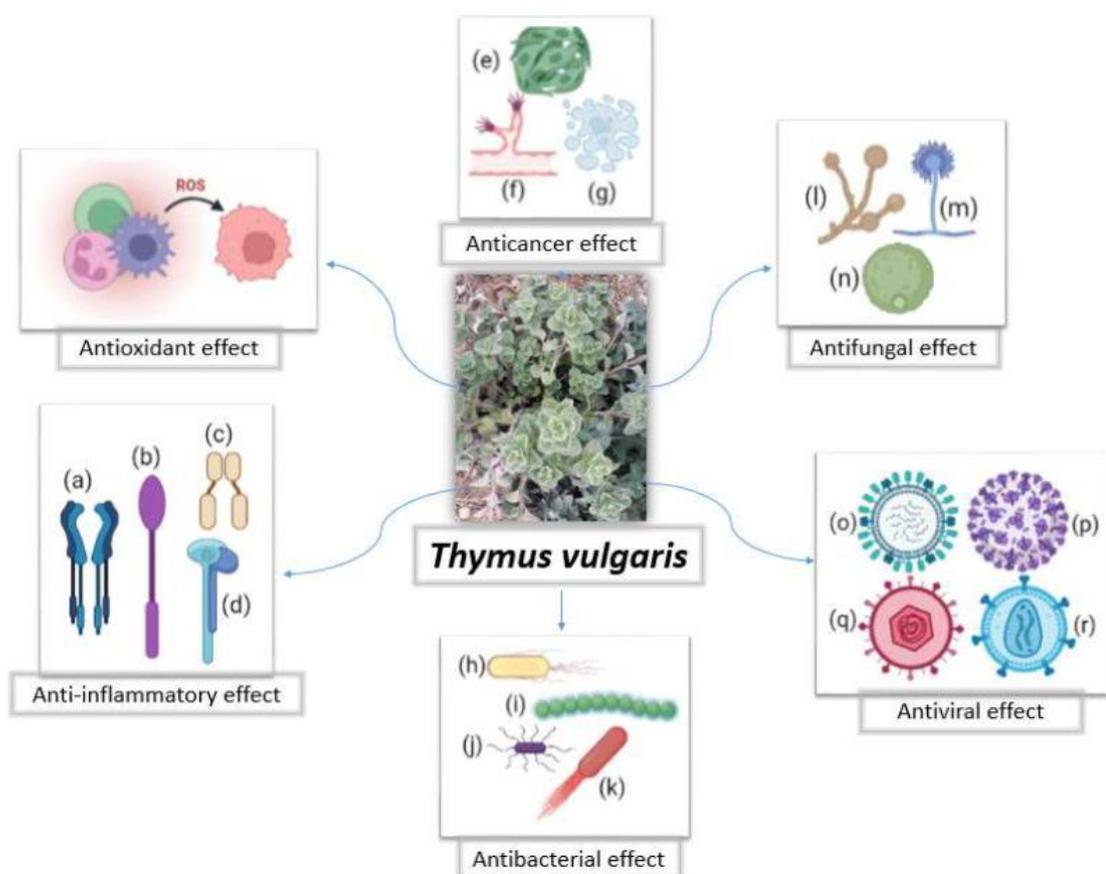


Figure 4 : certains effets biologiques de *Thymus vulgaris* [6].

- **Activités antioxydants de *Thymus vulgaris***

Les extraits de thym présentent des effets antioxydants, principalement attribués à leur teneur élevée en composés phénoliques. Ces composés agissent en tant que chélateurs d'ions métalliques, piègeurs de radicaux libres et inhibiteurs d'enzymes oxydatives [33]. Les activités antioxydantes du thym ont été démontrées par de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, des recherches ont montré que *Thymus vulgaris* possède des propriétés antioxydantes et réductrices, principalement en raison de sa teneur élevée en phénols totaux et en flavonoïdes. Les composés phénoliques du thym jouent un rôle essentiel dans l'adsorption et la neutralisation des radicaux libres, ainsi que la décomposition des peroxydes. Ces propriétés redox confèrent aux composés phénoliques du thym leurs effets antioxydants[34]. L'huile essentielle de thym présente des propriétés antioxydants grâce à la présence de composés tels que le thymol et le carvacrol. Ces composés aident à neutraliser les radicaux libres et à protéger les cellules contre les dommages oxydatifs.

- **Activité antimicrobienne de *Thymus vulgaris***

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles est influencée par leur composition chimique. Les composés phénoliques tels que le thymol et les hydrocarbures terpéniques tels que le β -terpinène présents dans l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sont tous deux associés à son activité antimicrobienne. De plus, le p-cymène, qui est le troisième composant le plus important en pourcentage, peut agir en synergie avec le thymol et le β -terpinène, renforçant ainsi l'activité antimicrobienne de l'huile. Cependant, le p-cymène utilisé seul est inefficace contre les bactéries. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que les huiles essentielles présentent une activité antimicrobienne plus forte que leurs principaux composants ou leurs mélanges respectifs, ce qui suggère des effets synergiques des composants mineurs et souligne l'importance de tous les composants dans l'activité biologique des huiles essentielles [35].

- **Activité antibactérienne de *Thymus vulgaris***

Le thym, notamment l'espèce *Thymus vulgaris*, est une source renouvelable de divers produits chimiques antibactériens en raison de la diversité biologique et structurelle de ses constituants [36]. De nombreuses études ont démontré l'activité antibactérienne importante de l'huile essentielle de thym, principalement attribuée aux composés phénoliques carvacrol et thymol[6]. Par exemple, une étude a évalué les propriétés antibactériennes de l'huile essentielle

de *Thymus vulgaris* sur différentes souches bactériennes, notamment *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Enterococcus faecalis*. Les résultats ont montré que l'huile essentielle de thym était particulièrement efficace contre *S.aureus* et *K. pneumoniae*, tandis que son efficacité contre les autres souches bactériennes dépendait de la concentration. Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle de thym peut constituer une nouvelle source d'antiseptiques naturels avec des applications potentielles dans les industries alimentaires et pharmaceutiques [37].

- **Activité antifongique**

Le thym présente des propriétés antifongiques principalement attribuées aux composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol. Ces composés ont démontré des effets fongitoxiques importants dans des tests sur différents champignons [38]. L'huile essentielle de thym a également montré une action antifongique contre *Aspergillus flavus*, induisant l'apoptose, la condensation nucléaire et la perturbation de la membrane plasmique [37]. L'huile de thym peut également réduire la formation d'aflatoxines et l'expression des gènes impliqués dans la virulence des champignons [39]. Des combinaisons synergiques d'huiles essentielles, telles que l'huile de thym et l'huile de citronnelle, ont également été étudiées pour leur activité antifongique contre certaines espèces d'*Aspergillus* vivant dans les habitations[40].

- **Activité antivirale de *Thymus vulgaris***

Des extraits de *Thymus vulgaris* ont été testés in vitro pour leur efficacité antivirale contre le virus de l'herpès simplex (HSV). Les extraits aqueux de thym ont montré une inhibition du HSV-1, du HSV-2 et d'une souche résistante à l'acyclovir du HSV-1 lorsqu'ils ont été testés sur des cellules RC-37 dans une étude de réduction de plaque. Ces résultats suggèrent que le thym peut présenter une activité antivirale contre le HSV[19].

- **Activité anti-inflammatoire**

Des études in vivo ont examiné l'efficacité anti-inflammatoire de l'huile de thym. Dans une étude sur des souris présentant un œdème de la patte induit par la carragénine, l'huile de thym a réduit l'épaisseur de la patte de manière dose-dépendante. Les résultats étaient comparables à ceux obtenus avec des médicaments anti-inflammatoires courants. L'huile de thym a également réduit les exsudats inflammatoires et les leucocytes migrants dans un modèle de pleurésie induite par la carragénine. Les principaux composés responsables de l'activité anti-inflammatoire étaient le carvacrol et le thymol [15].

8. Les méthodes d'administration les plus courantes des huiles essentielles

Les trois méthodes les plus populaires d'administration des huiles essentielles sont présentées ci-dessous : cutanée/muqueuse, par inhalation (y compris le système olfactif) et par voie orale (via l'appareil digestif) [41].

8.1.Administration par inhalation

L'inhalation est une méthode populaire pour utiliser les huiles essentielles. Elle peut être réalisée de différentes manières, notamment :

- **Inhalation directe** : Les huiles essentielles sont inhalées directement à partir d'un flacon ouvert ou en les déposants sur un mouchoir ou un tissu.
- **Inhalation de vapeur** : Quelques gouttes d'huile essentielle sont ajoutées à de l'eau chaude dans un bol. En se penchant au-dessus du bol et en couvrant la tête d'une serviette, on inhale la vapeur dégagée.
- **Utilisation de diffuseurs** : Les diffuseurs dispersent les molécules d'huiles essentielles dans l'air, permettant ainsi une inhalation continue et prolongée.

L'inhalation d'huiles essentielles peut avoir des effets bénéfiques sur le système respiratoire et le système nerveux, en plus de fournir une expérience olfactive agréable.

8.2.Administration cutanée/muqueuse (topique)

L'application topique des huiles essentielles sur la peau est une méthode couramment utilisée. Voici quelques points importants à retenir :

- **Dilution** : Il est essentiel de diluer les huiles essentielles dans une huile porteuse avant de les appliquer sur la peau. Les huiles de support couramment utilisées incluent l'huile d'amande douce, l'huile de jojoba, l'huile de noix de coco, etc.
- **Massage** : Les huiles essentielles diluées peuvent être utilisées lors de massages pour relaxer les muscles, soulager les tensions et favoriser la détente.
- **Applications locales** : Les huiles essentielles diluées peuvent être appliquées localement sur des zones spécifiques pour traiter des affections cutanées, réduire l'inflammation ou favoriser la guérison des plaies.

8.3.Administration par voie orale

L'administration orale d'huiles essentielles est moins courante et doit être effectuée avec précaution. Il est recommandé de consulter un professionnel de la santé qualifié avant d'ingérer

des huiles essentielles, car elles peuvent être toxiques à des doses élevées et peuvent interagir avec certains médicaments. Lorsqu'elle est utilisée par voie orale, les huiles essentielles sont généralement diluées et mélangées avec des aliments ou des boissons, ou prises avec une cuillère à café de miel comme excipient [42].

9. Précautions d'emploi des huiles essentielles

Les huiles essentielles utilisées en aromathérapie sont des liquides concentrés et doivent être utilisées avec précaution en respectant les dosages afin d'éviter les effets secondaires néfastes. Voici quelques directives à suivre pour une utilisation sécurisée [23].

- Les huiles essentielles ne doivent jamais être administrées par injection intramusculaire ou veineuse.
- Les personnes allergiques doivent systématiquement effectuer un test de tolérance à l'allergie, par exemple en mettant deux gouttes d'huile essentielle dans le pli de leur coude et en observant une éventuelle réaction cutanée.
- l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, sont dermocaustiques (agressives pour la peau). Il est donc nécessaire de les diluer dans une huile végétale (amande douce, olive...).
- Après toute application cutanée, l'avez-vous les mains.
- Il ne faut jamais appliquer d'huile essentielle pure sur les yeux ou le nez.
- Utilisez les huiles essentielles avec prudence, car elles sont inflammables. Éloignez-les des flammes nues et des sources de chaleur [23].

1. Le microbiote buccal

Le microbiote buccal humain est composé d'environ 700 types de microbes différents présents dans la bouche. Il s'agit d'une des populations microbiennes les plus complexes de notre organisme [43].

La bouche abrite une variété de micro-organismes, tels que des bactéries, des champignons et des virus [44]. Les principales bactéries présentes dans la bouche sont les *Firmicutes*, *Bacillus*, *Proteobacteria* et *Actinomycetes*) [45].

Contrairement au microbiote intestinal, la composition des bactéries buccales ne change pas de manière significative en fonction de l'alimentation ou de l'environnement [46]. Le microbiote buccal des individus en bonne santé provenant de différents pays présente une composition similaire.

Il existe environ 85 types de champignons différents dans la bouche humaine, dont le *Candida* est le plus courant [47]. Lorsque le microbiote buccal est équilibré, le *Candida* reste inactif, mais en cas de déséquilibre, il peut attaquer les tissus buccaux. Les *streptocoques* et le *Candida* peuvent collaborer pour former un biofilm nocif [48]

Le microbiome buccal comprend également des virus, principalement des phages [49]. Le type de phage présent dans la bouche reste généralement le même tout au long de la vie [50]. Cependant, lorsque certaines conditions sont présentes dans le corps humain, d'autres virus non originaires de la bouche peuvent potentiellement se manifester. Par exemple, le virus des oreillons est fréquemment présent [51].

La majorité du microbiote buccal est constituée de bactéries buccales, parmi lesquelles on trouve *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Staphylococcus* et *Lactobacillus* [52]. *S. mutans* est l'élément principal du microbiote buccal et l'un des principaux contributeurs de la plaque dentaire [53].

P. gingivalis est une bactérie anaérobie à Gram négatif et un pathogène parodontal. Si elle n'est pas traitée, elle peut entraîner un détachement des gencives par rapport aux dents. Une autre bactérie connue sous le nom de *Lactobacillus* est capable de fermenter les sucres pour produire de l'acide lactique. Certains *lactobacilles* sont bénéfiques pour la santé de l'hôte, et on les retrouve notamment dans le yaourt. Cependant, lorsque le sucre est fermenté par le *Lactobacillus*, cela produit également beaucoup d'acide lactique, ce qui peut favoriser les caries dentaires [54].

2. Les maladies bucco-dentaires

Différentes affections bucco-dentaires peuvent se développer en fonction des métabolites produits par les microbes présents dans la bouche [55].

Les principales maladies bucco-dentaires comprennent :

- **Caries dentaires** : Les caries sont des lésions qui se forment dans l'émail des dents en raison de l'activité bactérienne. Les bactéries, en particulier *Streptococcus mutans*, fermentent les sucres présents dans les aliments et produisent de l'acide, ce qui entraîne la déminéralisation de l'émail dentaire.
- **Maladies parodontales** : Les maladies parodontales affectent les tissus de soutien des dents, y compris les gencives, les ligaments et l'os alvéolaire. Une infection bactérienne, principalement causée par *Porphyromonas gingivalis*, entraîne une inflammation des gencives (gingivite) qui peut progresser vers une inflammation plus sévère (parodontite) et entraîner une perte osseuse et la détérioration des tissus parodontaux.
- **Gingivite** : La gingivite est une inflammation des gencives causée par une accumulation de plaque dentaire. La plaque, qui est composée de bactéries et de débris alimentaires, provoque une irritation des tissus gingivaux, entraînant des gencives rouges, gonflées et susceptibles de saigner.
- **Maladie péri-implantaire** : Cette maladie affecte les tissus entourant les implants dentaires. Elle est causée par une infection bactérienne et peut conduire à une inflammation et à une perte osseuse autour de l'implant.
- **Candidose buccale** : La candidose buccale est une infection fongique causée principalement par le *Candida albicans*. Elle se manifeste par la présence de plaques blanchâtres sur la langue, les joues ou le palais, pouvant provoquer des sensations de brûlure et d'inconfort.

3. Mécanismes d'action des huiles essentielles sur les microorganismes

3.1. Sur la cellule bactérienne

De nombreux mécanismes ont été avancés pour expliquer l'activité antibactérienne des huiles essentielles. Les huiles essentielles perturbent largement l'architecture cellulaire, affaiblissant ainsi l'intégrité de la membrane et augmentant sa perméabilité. Ces altérations de la membrane cellulaire entraînent la perturbation de plusieurs processus cellulaires, tels que la production d'énergie, le transport membranaire et d'autres fonctions métaboliques et de régulation métabolique. En conséquence, cela entraîne la perte d'ions et la fuite de composants cellulaires. Les huiles essentielles interfèrent avec des procédures cruciales, telles que la conversion de l'énergie, la transformation des macromolécules impliquées dans le métabolisme des nutriments et la libération des agents régulateurs de croissance. De plus, des recherches récentes ont démontré que certains composés chimiques présents dans les huiles essentielles peuvent inhiber avec succès les pompes d'efflux, qui sont impliquées dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques[35].

Ces mécanismes d'action combinés contribuent à l'effet antibactérien des huiles essentielles en perturbant les fonctions vitales des cellules bactériennes et en induisant leur mort ou leur incapacité à se multiplier.

La Figure 05 illustre le mécanisme d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne selon [35].

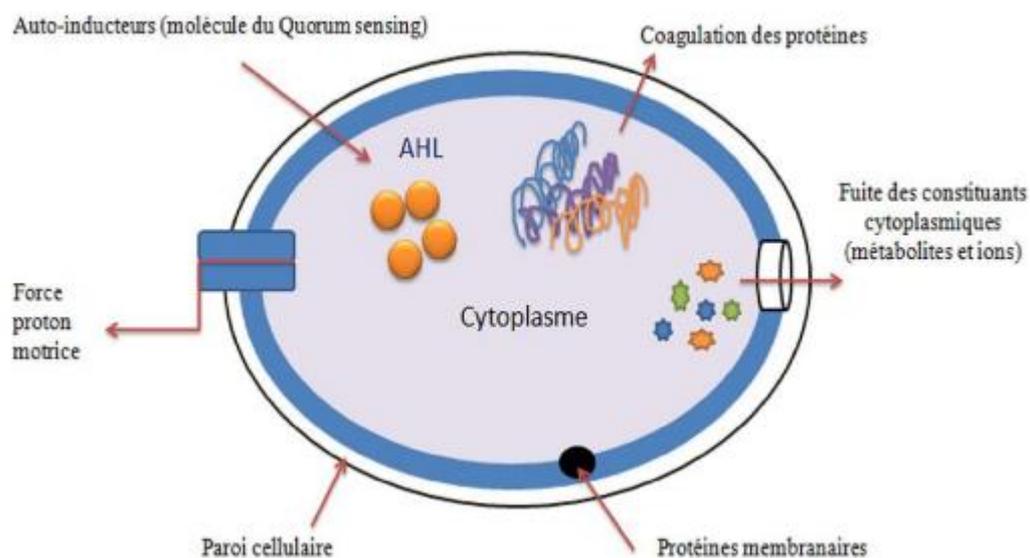


Figure 5 : mécanisme d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne) [35].

3.2.Sur la cellule fongique

De nombreuses études ont examiné les propriétés fongicides et fongistatiques des huiles essentielles vis-à-vis des champignons pathogènes, et l'effet antifongique des huiles essentielles est attribué à plusieurs facteurs [54].

➤ **Augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique**

Les composants terpéniques des huiles essentielles, notamment les phénols et les aldéhydes, interagissent avec les enzymes membranaires et dégradent les membranes plasmiques des cellules fongiques. Cette perturbation de la membrane entraîne une augmentation de la perméabilité et une fuite du contenu cytoplasmique, ce qui conduit finalement à la mort cellulaire. Certains composés, tels que l'acide caprylique et le thymol ou le carvacrol, ont des effets antifongiques synergiques. Par exemple, l'acide caprylique augmente la fluidité de la membrane cellulaire fongique, perturbe sa structure et provoque des changements de conformation des protéines membranaires, la libération de composants intracellulaires et la désintégration de la cellule [56].

➤ **Modification du métabolisme des acides gras**

Les huiles essentielles peuvent également modifier le métabolisme des acides gras dans les cellules fongiques. L'ergostérol, un stérol présent uniquement dans la membrane cellulaire des champignons, joue un rôle essentiel dans leur développement et leur fonctionnement. Certains composés des huiles essentielles, tels que le thymol, peuvent induire une diminution de l'ergostérol dans les membranes cellulaires de champignons tels que *Candida* et *Cryptococcus*. Cette diminution de l'ergostérol perturbe l'intégrité de la membrane, affecte l'activité des enzymes associées à la membrane, provoque des dommages importants et entraîne finalement la mort de la cellule fongique. De plus, cette modification du métabolisme des acides gras peut également entraîner une diminution de la matrice polymère extracellulaire (EPS) et du polysaccharide capsulaire, ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif au sein de la cellule fongique[20].

(La Figure 06) illustre l'influence du thymol sur le métabolisme des acides gras, en particulier l'ergostérol, dans la cellule fongique, qui est à la base de son action antifongique probable.

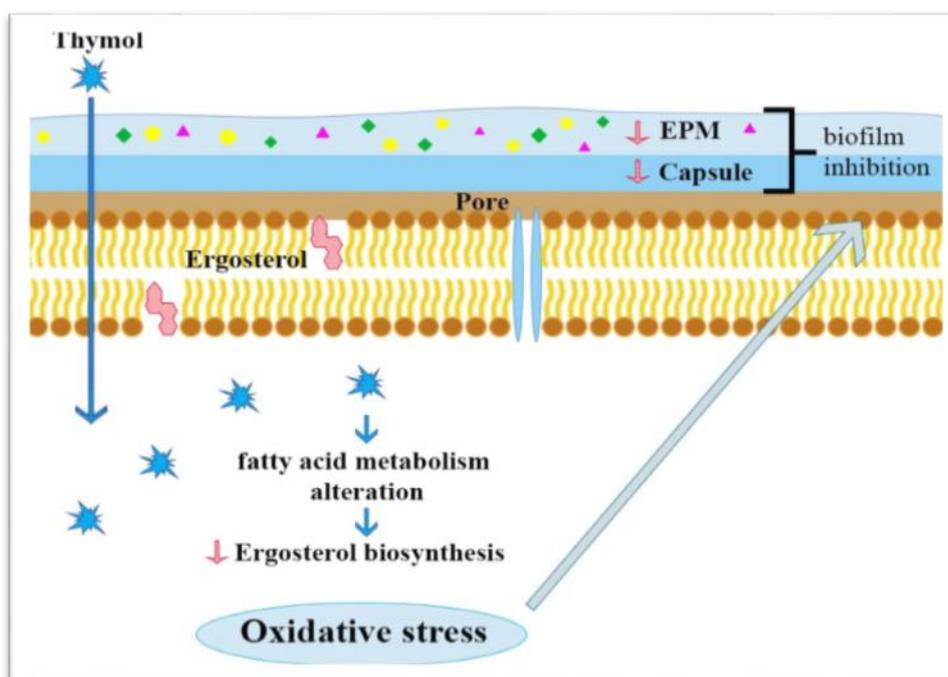


Figure 6 : mécanisme d'action antifongique du thymol [20].

➤ **Effet sur la paroi cellulaire fongique**

L'un des mécanismes d'activité antifongique des huiles essentielles est lié à une attaque de la paroi cellulaire fongique, ce qui provoque la rétraction du cytoplasme du mycélium et, finalement, la mort des hyphes. Des études ont montré que les huiles essentielles perturbent la membrane des cellules fongiques, entraînant leur mort. Des composés spécifiques présents dans les huiles essentielles, tels que le carvacrol, ont montré des effets antifongiques plus prononcés à des concentrations élevées, tandis que la teneur en β -terpinène est corrélée à une inhibition plus forte de la filamentation des champignons [57].

3.3. Sur la cellule virale

Les maladies virales continuent de représenter un grave problème de santé à l'échelle mondiale, et la résistance des virus aux médicaments antiviraux existants est un défi majeur. Les huiles essentielles, en raison de leur composition complexe et de la synergie de leurs composants bioactifs, offrent plusieurs modes d'action contre les virus. Contrairement aux médicaments antiviraux spécifiques à un type de virus donné, tels que l'acyclovir, les huiles essentielles peuvent agir de différentes manières. Elles peuvent agir au niveau extracellulaire en perturbant la formation de l'enveloppe virale ou en bloquant les protéines virales nécessaires à l'entrée du virus dans les cellules hôtes. La composition complexe des huiles essentielles leur permet de cibler différents aspects de la réplication virale [20].

(La Figure 07) illustre les mécanismes possibles de l'activité antivirale du thymol, l'un des composés présents dans les huiles essentielles.

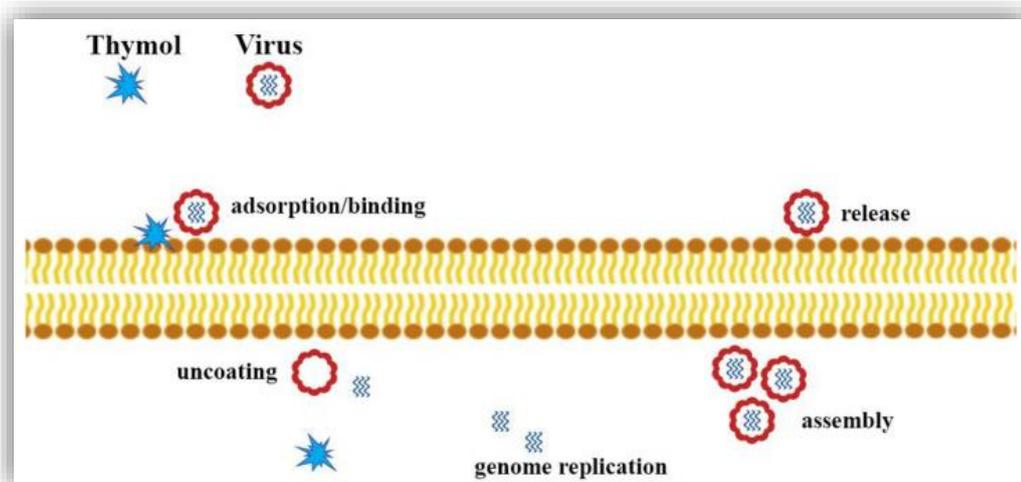


Figure 7 : les mécanismes possibles de l'activité antivirale du thymol [20].

Partie expérimentale

L'étude a été menée dans le but d'explorer les propriétés des huiles essentielles de *Thymus vulgaris*. Les travaux expérimentaux ont été réalisés sur une période de quatre mois, en utilisant différents laboratoires de recherche et laboratoires pédagogiques.

Les étapes de cette étude sont :

1. Extraction des huiles essentielles de la plante *Thymus vulgaris* par hydrodistillation.
2. Identification des sites de sécrétion des huiles essentielles au niveau des feuilles du *Thymus vulgaris*.
3. Détermination du rendement en huile essentielle.
4. Caractérisation des propriétés de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.
5. L'étude de l'activité antimicrobienne, à la fois bactérienne et fongique, des échantillons d'huiles essentielles étudiées.
6. Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS).
7. Évaluation de la toxicité aiguë en déterminant la dose létale (DL50) de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.
8. Développement d'une solution de bain de bouche à base des huiles essentielles étudiées.

1. Matériel végétale

Le matériel végétal utilisé dans cette étude expérimentale est une espèce de *Thymus vulgaris* appartenant à la famille des Lamiaceae, dont la taxonomie et les données pertinentes ont été précédemment détaillées. Les feuilles de la plante ont été choisies pour les expériences de cette étude car elles contiennent la majorité des composés actifs, notamment les huiles essentielles.

Cette plante a été sélectionnée pour les raisons suivantes :

1. Son utilisation répandue dans la médecine conventionnelle pour le traitement des maladies et des infections d'origine bactérienne et fongique.
2. Sa large répartition en tant que ressource botanique naturelle dans plusieurs régions du pays, en particulier dans l'est de l'Algérie.

Le manque de recherches sur les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles de l'espèce *Thymus vulgaris*, ainsi que le manque de produits pharmaceutiques à base d'essences naturelles, notamment les bains de bouche, dans notre pays [58].

1.1. Site de prélèvement

Les feuilles de la plante *Thymus vulgaris* ont été récoltées dans la région d'**Ain Djarlab**, située à **Mechta Kebira**, dans la wilaya de **Mila (Planche 01)**. Cette région a été choisie comme site de prélèvement en raison des caractéristiques favorables à la croissance de l'espèce *Thymus vulgaris*. Cette région est connue pour son climat méditerranéen, avec des étés chauds et secs et des hivers doux et humides, ce qui crée un environnement propice à la croissance de la plante. De plus, la région présente une diversité d'habitats naturels, tels que les collines et les pentes ensoleillées, qui sont des conditions idéales pour le développement de *Thymus vulgaris*.

La récolte a été réalisée durant la fin de mois du Mars 2023 de manière respectueuse de l'environnement, en veillant à préserver l'intégrité de la plante et de son écosystème. Les feuilles ont été prélevées à la main, en évitant les parties endommagées ou malades de la plante. Les échantillons ont été soigneusement emballés et transportés au laboratoire pour les étapes ultérieures de l'étude.

Les coordonnées géographiques du site de prélèvement sont approximativement 36°19'27.7" de latitude nord et 6°40'84.8" de longitude est.

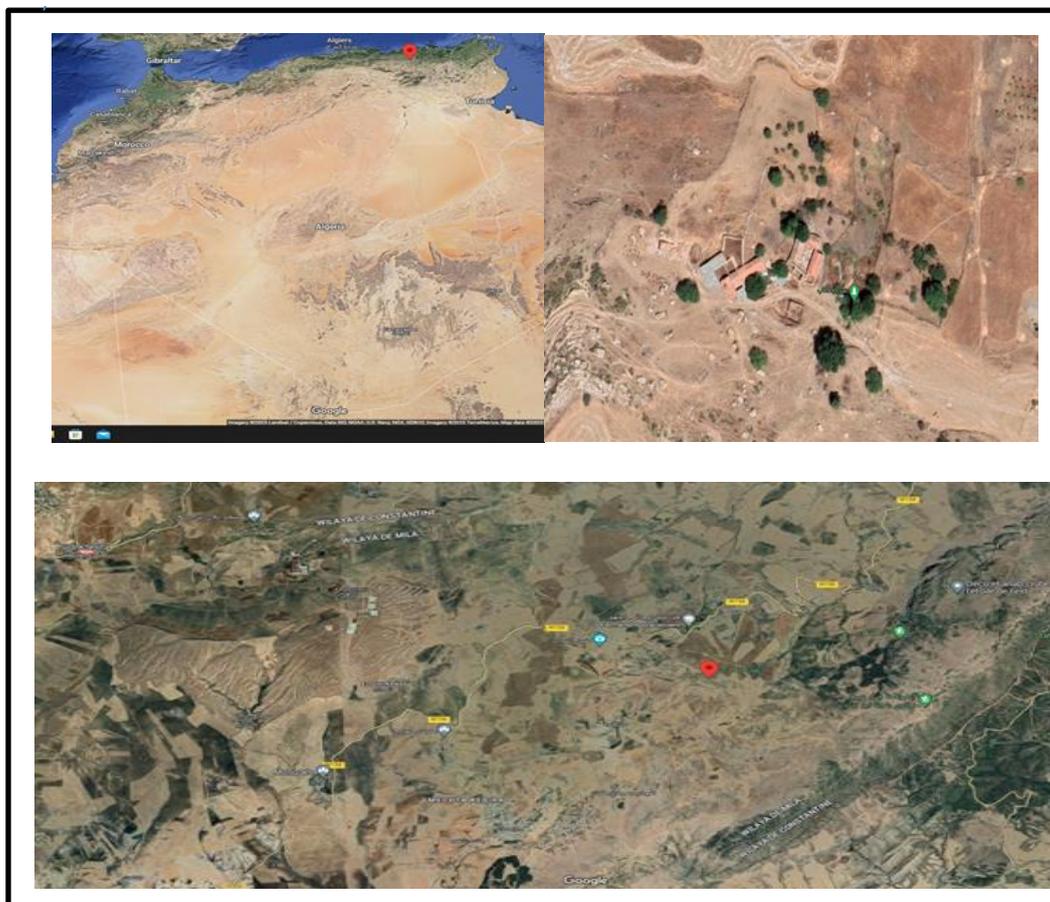


Planche 1 : localisation géographique du site de prélèvement (www.maplandia.com)

1.2. Les traitements préliminaires des échantillons

Les échantillons de la plante récoltée (voir photo 01 à droite) ont été traités préalablement de la manière suivante : les feuilles ont été séparées de la tige, puis étalées sur du papier journal et laissées sécher à l'air ambiant pendant une semaine. Ce processus de séchage a permis d'obtenir un poids final sec des échantillons (voir photo 01 à gauche).



Photo 1 : les feuilles fraîches (à droite) les feuilles sèches (à gauche) du *Thymus vulgaris* utilisées pour l'extraction des huiles essentielles.

1.3. Étude de la localisation des sites de sécrétion des huiles essentielles dans les feuilles du *Thymus vulgaris*

Cette étude a été réalisée en suivant les étapes décrites ci-dessous[59]

- Pour que les feuilles restent à l'état frais et pour éviter leur dessèchement, elles sont placées dans l'eau distillée comme cela est illustré dans la (photo 02).



Photo 2 : feuilles du *Thymus vulgaris* immergées dans le mélange d'eau distillée.

1.4. La réalisation des coupes de la feuille à étudiée

A l'aide d'une lame, la feuille a été coupée parallèlement à son axe. Pour obtenir des coupes précises et perpendiculaires à l'axe de l'organe (**Photo 03**).

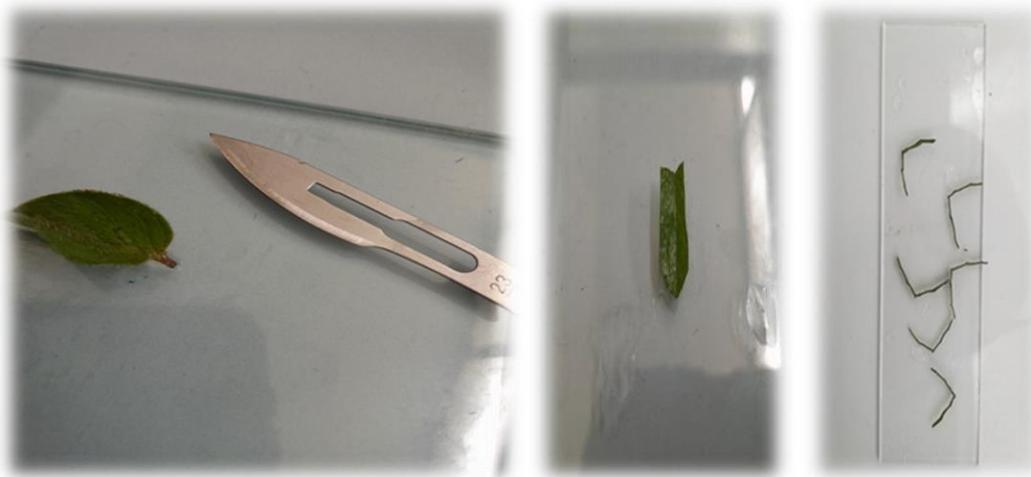


Photo 3 : procédé de réalisation des coupes de la feuille du *Thymus vulgaris*.

1.5. Coloration des parois

Les coupes ont été immergées successivement dans huit bains successifs.

1. Un trempage de 30 minutes dans d'hypochlorite de sodium diluée dans le but de vider les cellules de leur contenu cytoplasmique, il ne reste que les parois squelettiques.
2. Un bain d'eau distillée pour rincer l'excès d'hypochlorite de sodium.
3. Un bain d'acide acétique (fixateur) pendant 05 minutes dans le but d'augmenter l'affinité des différentes membranes cellulaires et du parenchyme pour les deux colorants.
4. Un bain d'eau distillée est utilisé pour éliminer l'excès d'acide acétique.
5. Un bain de bleu de méthyle Pendant une minute, colore en bleu les structures lignifiées et sclérifiées.
6. Un bain d'eau pour éliminer l'excès de colorant.
7. Un bain de rouge Congo pendant cinq minutes, colore en rose les parois pecto-cellulosiques.
8. Un bain dans l'eau distillée pour un dernier rinçage pour éliminer l'excès de colorant.

Les coupes sont mises entre lame et lamelle pour l'observation au microscope optique.

La planche 02 illustre les étapes de la technique de double coloration pour les feuilles du *Thymus vulgaris*.

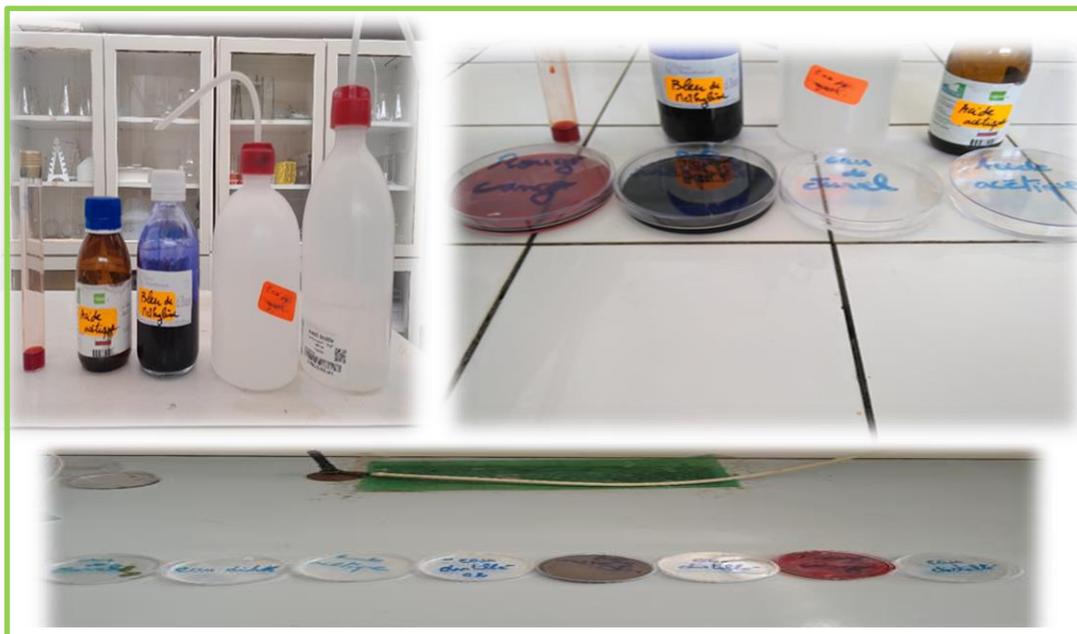


Planche 2 : les étapes réalisées pour la technique de double coloration.

1.6.Extraction de l'HE du *Thymus vulgaris*

1.6.1. Protocole d'Extraction de l'HE par hydrodistillation

L'huile essentielle a été extraite par hydrodistillation pendant 3 heures en utilisant un appareil de type "Clevenger" au Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques (LOST), situé au Département de Chimie de la Faculté des Sciences Exactes de l'Université Frères Mentouri Constantine 01.

Le protocole d'extraction était le suivant :

- ❖ 136 g de feuilles sèches de *Thymus vulgaris* ont été directement placés dans un ballon rempli d'eau.
- ❖ Le ballon a été porté à ébullition à l'aide d'un chauffe-ballon pendant 3 à 4 heures.
- ❖ Pendant la distillation, les composés volatils des feuilles ont été entraînés par la vapeur d'eau.
- ❖ La vapeur d'eau chargée en huile essentielle a été collectée dans un réfrigérant où elle s'est condensée.
- ❖ L'huile essentielle, insoluble dans l'eau, a été séparée de l'eau distillée.

- ❖ L'huile essentielle extraite a été conservée dans des tubes en verre stériles hermétiquement fermés, recouverts d'un papier d'aluminium pour la protéger de la lumière.

Les tubes ont été ensuite placés dans un réfrigérateur réglé à 4°C pour assurer leur conservation [60].

La photo 04 représente le dispositif d'extraction utilisé pendant le processus d'hydrodistillation.

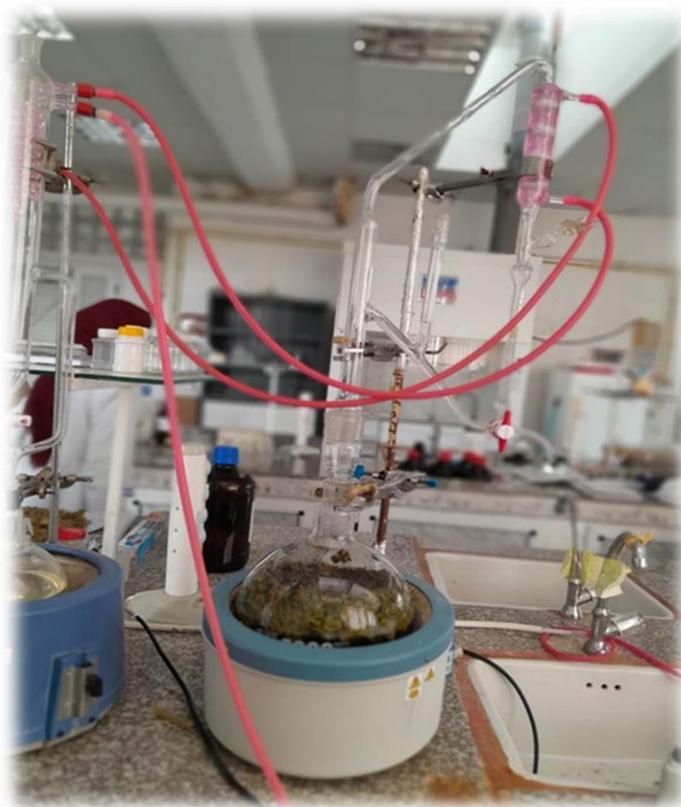


Photo 4 : montage d'extraction de type clevenger.

1.7.Détermination du rendement en huiles essentielles

Selon les normes de l'AFNOR, le rendement en huiles essentielles est calculé en pourcentage et correspond à la différence entre la masse de l'huile essentielle récupérée et la masse du matériel végétal utilisé [62]. La formule suivante est utilisée pour calculer le rendement :

Rendement en huiles essentielles (%) = (Masse de l'huile essentielle récupérée / Masse du matériel végétal utilisé) x 100.

Sachant que :

RHE%=Rendement en huile essentielle exprimé en%.

mh =Masse d'huiles essentielles récupérées en gramme (g).

mv = Masse d'essai du matériel végétal en gramme (g) [61].

2. Les contrôles de qualité de l'huile essentielle

2.1.Méthodes de caractérisation de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

2.1.1. Evaluation des caractéristiques organoleptiques

Pour évaluer les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*, nous avons utilisé nos sens olfactifs et la vue. Ces évaluations sont conformes aux directives de la pharmacopée européenne (2001).

Les caractéristiques organoleptiques évaluées sont les suivantes :

Aspect : Nous avons observé que l'aspect de l'huile essentielle peut varier d'un échantillon à l'autre, pouvant être liquide, solide ou sous forme d'une phase solide-liquide.

Odeur : Nous avons noté que l'odeur de l'huile essentielle dépend de la nature volatile des composés présents. Chaque échantillon peut présenter une odeur distincte.

Couleur : Nous avons observé que la couleur de l'huile essentielle peut varier en fonction des constituants présents dans chaque échantillon.

Ces évaluations organoleptiques nous permettent de caractériser les propriétés sensorielles de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

2.1.2. Détermination des caractéristiques physico-chimiques

2.1.2.1.La densité relative à 20°C

La densité relative de l'huile essentielle à 20°C est définie comme le rapport entre la masse de l'huile essentielle et la masse d'un volume égal d'eau à la même température.

- **Mode de détermination**

Le mode de détermination utilisé était le suivant : Nous avons prélevé avec précision un volume de 1 ml de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* à l'aide d'une micropipette. Ensuite, nous avons utilisé une balance analytique pour peser la masse de cet échantillon.

La densité relative à 20°C est calculée en divisant la masse de l'huile essentielle prélevée par la masse d'un volume égal d'eau à 20°C. Ce calcul nous permet d'obtenir une valeur numérique représentant la densité relative de l'huile essentielle (**Photos 05**).

Cette mesure de densité relative est une caractéristique physico-chimique importante qui peut fournir des informations sur la composition et la densité de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.



Photo 5 : procédé de détermination de la densité relative de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

2.1.2.2. Indice de réfraction (IR)

En raison de la richesse en constituants de l'huile essentielle, la lumière se polymérise, ce qui explique pourquoi l'indice de réfraction des huiles essentielles est généralement plus élevé que celui de l'eau [62].

- **Mode de détermination**

Pour mesurer l'indice de réfraction, nous avons ajusté le réfractomètre en utilisant de l'eau distillée, dont l'indice de réfraction doit être de 1,333 à une température de 20°C. Ensuite, nous avons ouvert le prisme secondaire et appliqué deux gouttes d'huile essentielle sur la partie centrale du prisme primaire. Enfin, nous avons soigneusement refermé le prisme. La mesure de l'indice de réfraction a été effectuée à une température constante (**Photo 06**)[23].

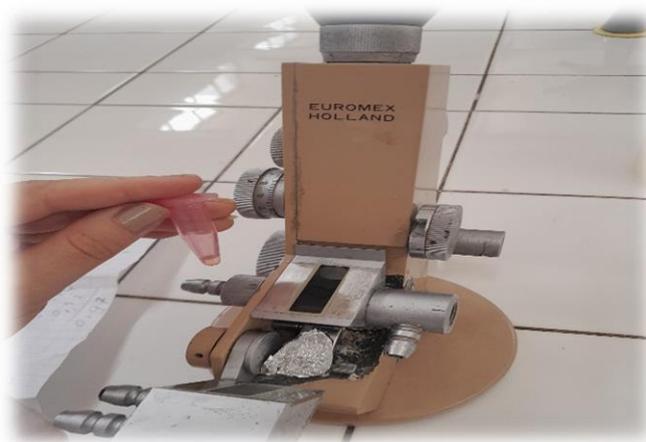


Photo 6 : procédé de détermination de l'indice de réfraction de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

2.1.2.3. Le Potentiel d'Hydrogène (pH)

L'échelle de pH mesure l'activité chimique des ions hydrogène (H^+) en solution, ce qui permet de déterminer le niveau d'acidité du produit.

- **Mode de détermination**

Pour mesurer le pH, nous avons inséré l'électrode du pH-mètre (**Photo 07**) dans un tube conique contenant l'échantillon d'huile essentielle[63].



Photo 7 : procédé de détermination de pH d'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

3. Évaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles du *Thymus vulgaris*.

3.1. Les souches microbiennes testées

Les souches testées proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) et sont présentées dans le (Tableau 04). Elles sont disponibles au laboratoire de microbiologie de l'unité pharmaceutique de Constantine "SAIDAL". Nous avons sélectionné un total de 6 souches, dont 4 souches bactériennes et 2 souches fongiques. Ces souches microbiennes ont été choisies en raison de leur implication fréquente dans les maladies, de leur capacité à causer des lésions dans le corps humain, ainsi que de leur utilisation courante dans l'industrie pharmaceutique pour tester l'efficacité de molécules antimicrobiennes.

Tableau 4 : les souches microbiennes testées.

Les souches microbiennes testées	Nom de souche	Origine	Propriété
Souches bactériennes	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Gram +
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	
	<i>Bacillus subtilus</i>	ATCC 6633	Gram -
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	
Souches fongiques	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10333	Levure
	<i>Aspergillus Braziliensis</i>	ATCC16404	Champignons Mycéliens

Une brève description des souches testées présentée dans l'Annexe 2.

3.2. Culture et conservation des souches

Les différentes espèces microbiennes (bactériennes et fongiques) testées ont été cultivées et conservées comme indiqué dans la (Photo 08). Les souches de référence ont été placées sur des tubes de gélose inclinés et des boîtes de Petri, puis conservées à une température

de +4°C jusqu'à leur utilisation. Avant utilisation, la pureté de ces souches a été vérifiée en les repiquant sur leur milieu sélectif approprié.



Photo 8 : les souches microbiennes testées.

3.3.Préparation des suspensions microbiennes (inoculum)

À partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures pour les bactéries et de 48 à 72 heures pour *Candida albicans*, les colonies ont été diluées dans de l'eau physiologique stérile préalablement préparée (**Annexe 03**). Ensuite, nous avons agité vigoureusement les suspensions au vortex pendant 15 secondes afin d'obtenir une homogénéisation complète [64].

Après agitation, l'inoculum a été ajusté à une densité optique (DO) de 0,1 à 0,2 à une longueur d'onde de 600 nm pour les bactéries et de 620 nm pour la levure (**Planche 03**). Cela correspond à une turbidité standard de 0,5 sur l'échelle de Mac Farland [65]. Nous avons vérifié la densité optique à chaque étape d'ajustement jusqu'à obtenir les valeurs souhaitées[66].

- La concentration finale des bactéries doit être approximativement entre 10^7 - 10^8 UFC/ml [65].
- La concentration de *Candida albicans* dans l'inoculum doit être comprise entre 1 à 5×10^6 UFC/ml [67]

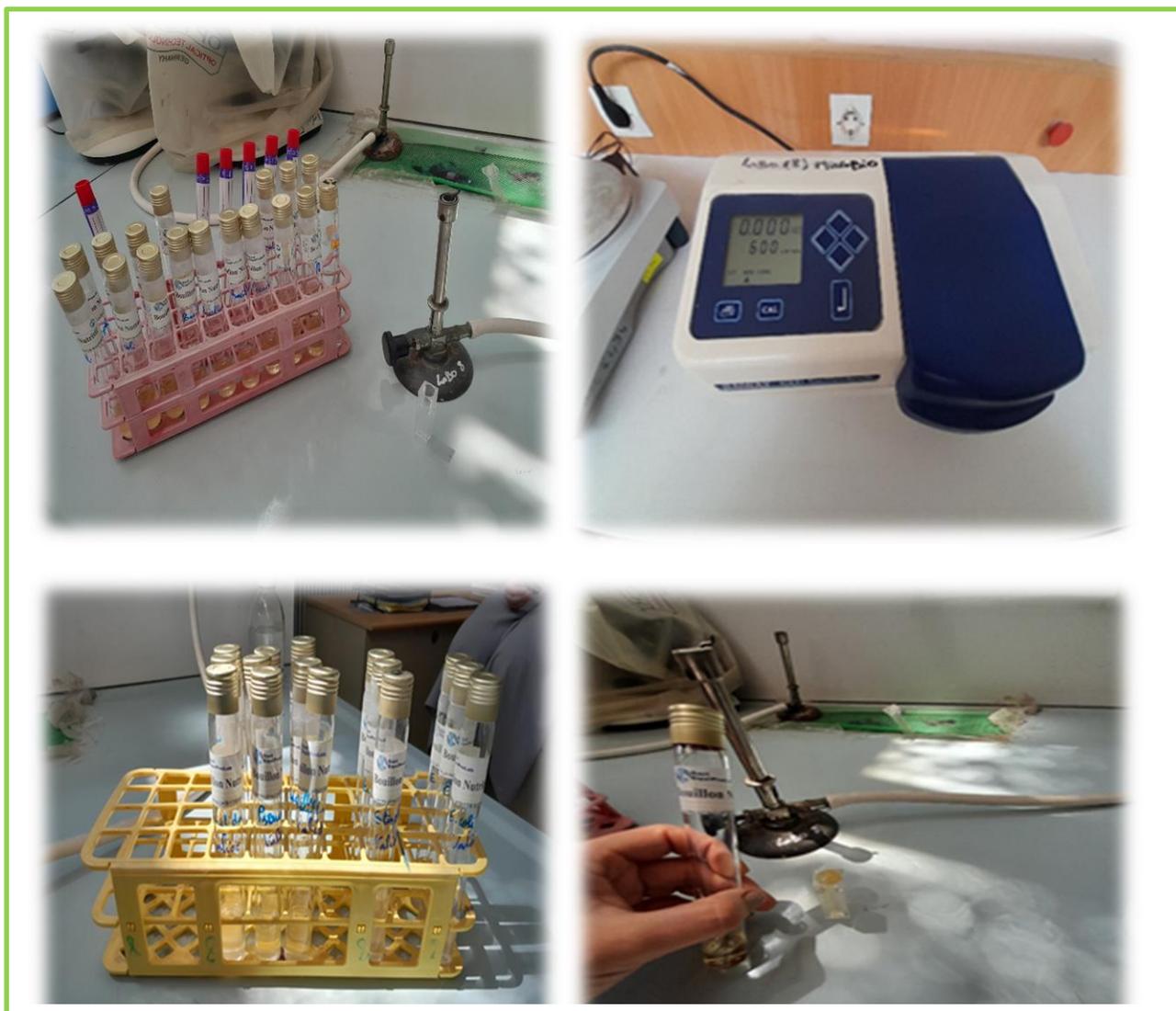


Planche 3 : protocole expérimentale d'ajustement de la densité optique des suspensions microbiennes préparées.

Sur la base d'une culture sporulée d'*Aspergillus brasiliensis* cultivée dans la gélose de Sabouraud, nous avons réalisé une série des dilutions par le tween 80 pour la préparation de la solution mère après, nous avons continué par l'eau physiologie stérile pour les autres dilutions, une agitation vigoureuse de la solution mère pendant 10 à 15 s à l'aide d'un vortex ensuite, nous avons prélevé 1 ml de la SM d'*Aspergillus brasiliensis* auquel on ajoute 9 ml d'eau physiologie stérile afin d'obtenir la dilution 10^{-1} et ainsi de suite jusqu'à la dilution de 10^{-3} . Nous avons choisi trois cellules de Malassez pour assurer le dénombrement des suspensions préparées et de déterminer la dilution qui sera utilisée pour la détermination de la CMI après un dénombrement de chaque suspension fongique préparées selon le protocole suivant :

- **Mode Opérateur**

Nous avons commencé par humidification des plates-formes latéraux avec l'eau distillée en faisant adhérer la lamelle, à l'aide d'une pipette pasteur nous avons rempli les chambres de comptages par les suspensions préparées après agitation par le vortex, la capillarité permettra l'entrée de liquide entre la cellule et la lamelle.

- **Comptage des cellules**

Après la sédimentation des cellules qui prend environ 10 min, nous avons fait tout d'abord une observation microscopique (x10) afin de visualiser le quadrillage de la cellule Malassez suivie par une observation microscopique (X40) pour visualiser les cellules dans chaque rectangle quadrillé, nous avons pris deuz rectangles pour chaque dilution afin de calculer les moyennes. Si la suspension correspond au 10^{-1} est très chargée on passe à dénombrer la deuxième suspension jusqu'à la concentration validé (**Photo 09**).

Selon la norme *NCCLS* (ancien nom pour *Clinical and Laboratory Institutes*):

- L'inoculum d'*Aspergillus brasiliensis* doit avoir une concentration de 0,4 à 5×10^4 UFC/ml [67].

L'inoculum doit être utilisé dans les 15 min suivant sa préparation.



Photo 9 : procédé de dénombrement des suspensions d'*Aspergillus brasiliensis*

3.4. Préparation des concentrations des huiles essentielles testées

Nous avons préparé une gamme de dilutions de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* en utilisant du tween 80.

Les concentrations suivantes ont été testées : 100%, 75%, 50%, 25%, 1%, 1/4, 1/8, 1/12.

Le premier est à 100%, correspond à l'huile essentielle pure.

La première dilution, à 75%, a été préparée en ajoutant aseptiquement 750 d'huile essentielle à 250 de tween 80.

La troisième concentration, à 50%, a été obtenue en prélevant 500 de la dilution précédente et en le mélangeant avec 500 de tween 80, pour atteindre une dilution de 1/12. **Le tableau 05** ci-dessous illustre en détail les opérations effectuées.

Tableau 5 : les concentrations des huiles essentielles préparées.

Quantité initiale d'HE testée	n° de dilutions	Concentrations de chaque dilution	Quantités
1000 µl	Extrait pure	100%	1000 µl
	d1	75%	750 HE +250 Tween 80
	d2	50%	500 HE + 500 Tween 80
	d3	25%	250 HE + 750 Tween 80
	d4	1%	10 HE + 990 Tween 80
	d5	¼	2,5 HE + 997,5 Tween 80
	d6	1/8	1,25 HE + 998,5 Tween 80
	d7	1/12	0,83 HE + 999,17 Tween 80

d : dilution

Cette opération se fait à l'asepsie et à l'aide des micropipettes de différentes capacités la **(Photo10)** représente le protocole de préparation des diluions des huiles essentielles.



Photo 10 : procédé de préparation des dilutions de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

3.5.L'antibiogramme (Aromatogramme)

3.5.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Pour chaque bactérie test, un inoculum est réalisé à partir d'une culture de 24 heures, mis en suspension dans de l'eau physiologique stérile de manière à obtenir une densité optique comprise entre 0,1 et 0,2 pour une longueur d'onde de 620 nm, ce qui correspond approximativement à une concentration de 10^6 CFU/mL.

Nous avons utilisé l'huile essentielle pure (100%) avec des volumes différents : 5µl, 10µl, 15 µl, 20µl, ainsi qu'une solution à 20% préparé comme suite : 18 ml de tween 80 mélangé avec 2 ml d'HE. Le tween 80 pure est utilisé comme témoin.

Des disques de papier filtre stériles de 6 mm de diamètre (Whatman N°3, Royaume-Uni) sont imprégnés avec 20 µL de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à différentes concentrations (0,843, 0,562, 0,281, 0,011, 0,002, 0,001et 0,0008 mg/ml) respectivement, tandis que les disques témoins reçoivent 20 µL de tween 80. Après séchage à l'air chaud, les disques sont déposés sur les boîtes de Petri contenant du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé avec les souches tests à l'aide d'un écouvillon. Avant l'incubation à la température optimale de croissance de chaque souche test, les boîtes sont laissées 2 heures à 4°C. Les résultats sont lus après 24 heures d'incubation. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme un résultat positif.

3.5.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Nous avons prélevé 3 à 5 ml de la suspension fongique d'*Aspergillus brasiliensis* préparée et validée, puis nous l'avons étalée sur toute la surface de la boîte de Pétri contenant le milieu gélosé. Pour obtenir une répartition uniforme, nous avons fait pivoter la boîte sur elle-même. Ensuite, nous avons laissé les boîtes imprégnées pendant quelques minutes (sans dépasser 15 minutes) pour permettre une bonne absorption du liquide [67].

3.6.Détermination de concentration minimale inhibitrice CMI

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* a été déterminée en évaluant l'inhibition de la croissance des micro-organismes en contact avec l'huile essentielle.

La méthode utilisée consiste à diffuser l'huile essentielle dans la gélose, ce qui permet d'inhiber la croissance des germes dans une zone claire appelée "zone d'inhibition". Le diamètre de cette zone d'inhibition autour de chaque disque contenant l'huile essentielle a été mesuré en millimètres à l'aide d'une règle et enregistré. Chaque mesure a été effectuée deux fois lors d'expériences séparées pour assurer la précision des résultats [68].

Les résultats obtenus peuvent être représentés par des signes indiquant la sensibilité des souches microbiennes à l'huile essentielle [69].

- Non sensible (-) ou résistante : 8 mm de diamètre.
- Sensible (+) : Diamètre compris entre 9 et 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 et 19 mm.
- Exceptionnellement sensible (+++) : diamètre supérieur à 20 mm

La CMI (concentration minimale inhibitrice) est déterminé comme étant la plus faible concentration d'huile essentielle (HE) qui entraîne une inhibition complète de la croissance visible dans le bouillon [70].

4. Analyse statistique

Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* ont été soumis à une analyse de variance à trois facteurs (ANOVA 3), à savoir la "Concentration", les "Souches" et leur interaction "Concentration : Souches", afin de déterminer leur significativité. Cette analyse a été effectuée en utilisant le logiciel statistique Microsoft Excel (version 2007).

5. Elaboration des profile chromatographiques

5.1. Analyse des constituants chimiques de l'huile essentielle par la GC/MS

Dans le cadre de l'analyse des constituants chimiques de l'huile essentielle, un échantillon a été envoyé au centre de recherche et d'analyse physiques et chimiques (CRAPC) de Bou-Ismaïl. L'analyse de l'échantillon a été réalisée au laboratoire d'analyse GC/MS (**voir planche 05**).

L'échantillon a été injecté dans un chromatographe Hewlett Packard Agilent 6890 Plus, couplé à un spectromètre de masse de type Hewlett Packard Agilent 5973 avec une ionisation

électronique à une énergie de 70 eV. Les conditions opératoires suivantes ont été utilisées : une colonne apolaire (HP-5MS, 30 m * 0,25 mm * 0,25 μ m, 5% de phényle, 95% de diméthylpolysiloxane). L'injecteur automatique était réglé à une température de 250°C et un volume d'injection de 0,2 μ l a été utilisé en mode Split 1:80. La programmation de température consistait en une étape à 60°C pendant 8 minutes, suivie d'une augmentation de la température de la colonne à 250°C à un taux de 2°C/minute, maintenue constante pendant 10 minutes. L'hélium (pureté 6.0) a été utilisé comme gaz vecteur à un débit de 0,6 ml/min.

L'analyseur de masse utilisé était de type quadripôle, avec une température d'interface fixée à 270°C et une température de la source à 230°C. L'identification des constituants a été réalisée en comparant les indices de rétention et les spectres de masse obtenus avec ceux référencés dans la littérature, notamment la référence ADAMS. La durée totale de l'analyse était de 113 minutes.



Planche 4 : dispositif de l'analyse GC/MS au niveau de laboratoire.

6. Évaluation de la toxicité de l'huile essentielle du Thym par la détermination de sa dose létale (DL50).

La dose létale 50 (DL50) est la dose d'une substance qui provoque la mort de 50% de la population d'organismes étudiée dans un laps de temps donné. La DL50 est calculée à l'aide de méthodes statistiques.

- **Protocole expérimental**

6.1.Préparation des animaux (souris)

L'étude a été réalisée au niveau de l'animalerie de l'Université Frères Mentouri Constantine 01. Des souris albinos ont été utilisées, présentant les caractéristiques décrites dans le **tableau 06**. Les animaux ont été choisis au hasard et ont été maintenus dans leurs cages pendant au moins sept jours avant l'administration de la substance afin de s'acclimater aux conditions de laboratoire.

Tableau 6 : les caractéristiques des souris de l'expérimentation.

Caractéristiques	Sexe	Poids	Nombre	Nourriture et Boisson	Température	Humidité
Souris albinos	Femelle	20-30g	12	Eau de robinet	23 C°	60



6.2.Préparations de matériels non biologiques

Les équipements utilisés pour la détermination de la DL50 sont décrits dans le **tableau 07(Annexe 05)**.

6.3.Préparation des doses

Cinq concentrations différentes d'huile essentielle ont été préparées pour déterminer la DL50, comme indiqué dans le (tableau 07).

Tableau 7 : les concentrations d'huile essentielle utilisées pour le test de toxicité pour chaque lot.

Numéro de lot	Nombre d'animaux de chaque lot	Concentration préparées (mg/ml).	Doses utilisées (mg/kg)
1	3	1,124	400
2	3	1,124	500
3	3	1,124	1000
4	3	1,124	2000
5	3	1,124	4000
6	3	-	-

6.4.Administration des doses

Les souris doivent être à jeun avant l'administration de la dose, en supprimant la nourriture mais en leur laissant l'accès à l'eau, pendant 3 à 4 heures avant l'administration.

Les animaux ont été pesés, puis la dose a été administrée. La quantité administrée ne doit pas dépasser le volume maximal qui peut être consommé en une seule fois, en fonction de la taille des souris d'expérience. Généralement, le volume ne dépasse pas 1 ml pour chaque 100 g de poids corporel des souris

Chaque lot de souris a reçu une dose d'huile essentielle à tester par gavage à l'aide d'une sonde de gavage, avec des doses variables en fonction de la concentration de la préparation, comme indiqué dans le **tableau 08 (Annexe 06)**.

- **Durée d'observation**

Après l'administration, les souris ont été observées toutes les 60 minutes pendant les huit premières heures le premier jour, puis une fois par jour à la même heure pendant une

période de 14 jours. L'heure de la mort et les symptômes observés ont été enregistrés pour chaque lot afin de recueillir des informations sur le nombre de décès et les signes cliniques observés[71].

7. La préparation d'une lotion pharmaceutique

7.1. Proposition d'une solution antiseptique pour la cavité buccale (Bain de bouche)

L'objectif de notre étude repose principalement sur la recherche et la confirmation d'un protocole d'élaboration d'un bain de bouche validé et répond aux normes de la santé mondiale pour que ce solution antiseptique (**Bain de bouche**) peut protéger ou prévenir à traiter les infections bucco-dentaires, pour cela nous avons met le point sur des substances d'origine végétale pharmacologiquement active (les huiles essentielles).

Ces principes actifs doivent être mélangés avec des excipients appropriés comme : aromatisants, diluants, conservateurs, colorants, surfactants etc., avec des proportions bien déterminées afin d'obtenir un produit fini efficace et de bonne qualité conformes aux spécifications des formes pharmaceutiques.

Nous avons pu un produit de référence « » répond à des normes de la qualité à l'échelle national et mondiale.

▪ Etape de pré-formulation

Nous avons choisi une formule quantitative d'un bain de bouche selon notre principe actif et les excipients en respectant le produit de référence.

▪ Caractérisation du produit de référence

Il est nécessaire de connaître les principales propriétés du produit de référence dont la mise en forme pharmaceutique est considérée la base du nouveau produit désiré donc il faut faire la préparation de la lotion pharmaceutique en basant sur le produit de référence.

1. Identification macroscopique et microscopique du matériel végétal utilisé

1.1.Aspect macroscopique des feuilles du *Thymus vulgaris*



Photo 11 : aspect macroscopique des feuilles du *Thymus vulgaris*.

Selon la **photo 11**, on peut observer que les feuilles du *Thymus vulgaris* ont une couleur vert brillant. Elles sont recouvertes de poils non glandulaires qui sont répartis de manière uniforme sur toute la surface de la feuille.

1.2.Aspect microscopique des feuilles du *Thymus vulgaris*

L'observation microscopique de coupes transversales des feuilles du *Thymus vulgaris* a révélé la présence de deux types de structures distinctes :

- Des poils non glandulaires (poils tecteurs) : Ces poils sont visibles à l'échelle microscopique et sont plus grands que les poils glandulaires. **Voir la photo 12.**
- Des poils glandulaires (poils sécréteurs) : Ces poils glandulaires sont plus petits que les poils non glandulaires et sont également présents à l'échelle microscopique. **Voir la photo 13.**



Photo 12 : aspect microscopique des poils tecteurs de la feuille du *Thymus vulgaris* (GrX10).

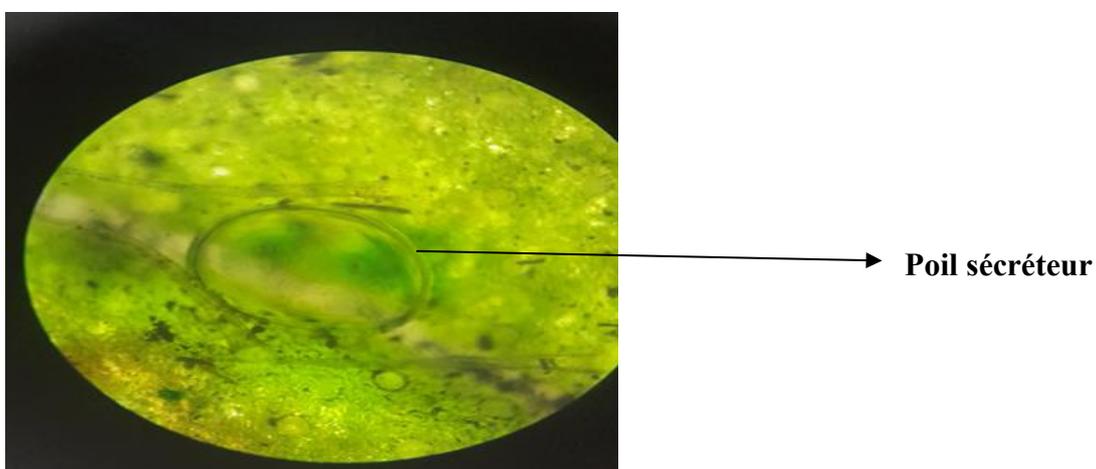


Photo 13 : aspect microscopique des poils sécréteurs au niveau de la feuille de *Thymus vulgaris* (GrX40).

D'après **CAILLAUD** en **2013**, chez l'espèce *Thymus vulgaris*, on observe la présence de poils glandulaires peltés. Ces poils sont courts, denses et composés d'une grande cellule basale, d'une cellule apicale plus petite, et d'une tête multicellulaire typiquement composée de douze à dix cellules [69]. **Voir la photo 14.**

Kintzios en **2002**, a également décrit la présence de poils glandulaires capités (**photo 15**). Ces poils sont courts et se composent de trois cellules : une basale, une pour la tige, et une arrondie ou en forme de poire pour la tête [70].

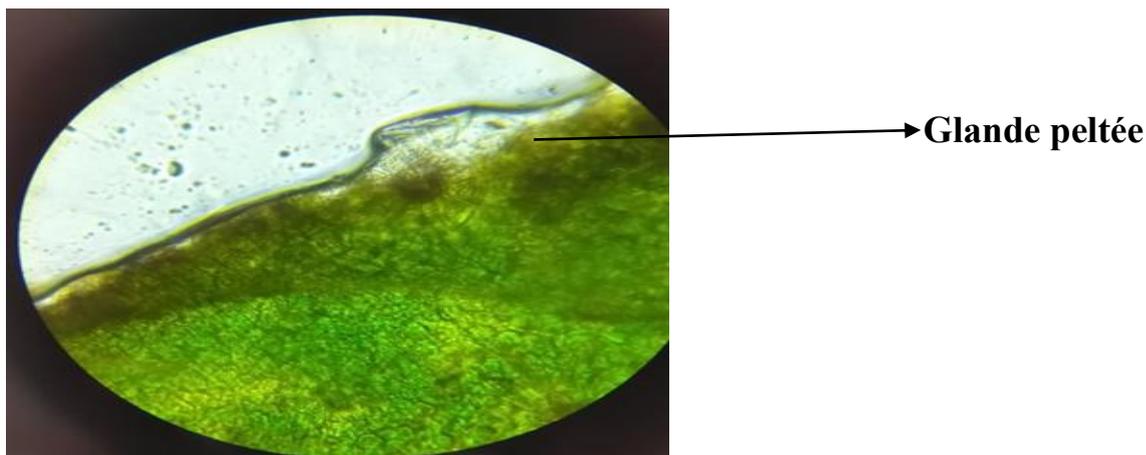


Photo 14 : aspect microscopique d'une glande peltée au niveau de la feuille du *Thymus vulgaris* (GrX40).

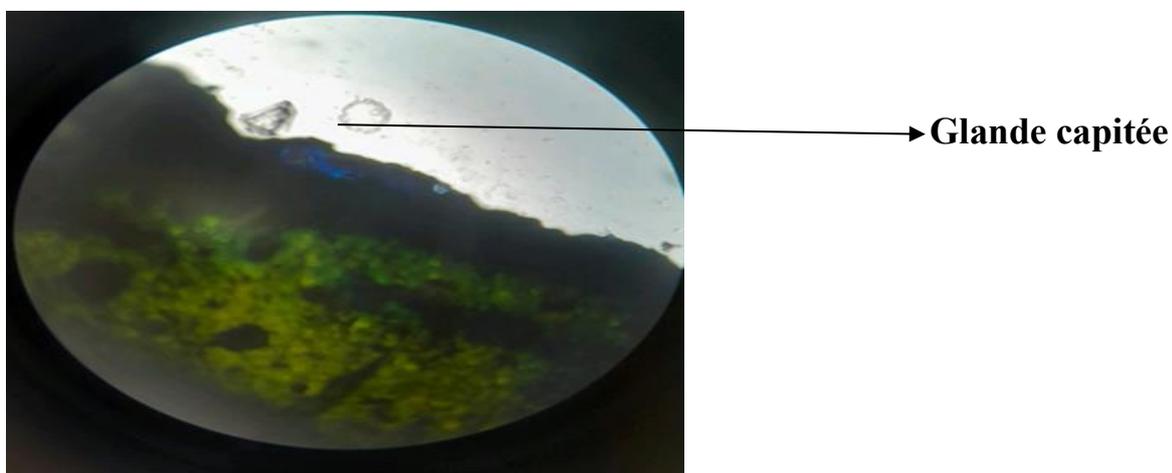


Photo 15 : aspect microscopique d'une glande capitée de la feuille du *Thymus vulgaris* (GRX40).

Les poils non glandulaires jouent un rôle important dans les fonctions écologiques de la pubescence des plantes. Ils contribuent notamment à limiter la libre circulation de la vapeur d'eau qui quitte les stomates (transpiration), ainsi qu'à réduire l'échauffement des feuilles. En revanche, les poils glandulaires semblent avoir une fonction différente. Ils ont un effet répulsif sur les insectes nuisibles[72], et empêchent l'éclosion des œufs d'insectes [73].

Selon A. Perrin et M. Colson, il existe deux types de glandes sécrétrices chez les *Lamiacées* aromatiques : les glandes peltées et les glandes capitées [74].

Les résultats de notre étude anatomique de *Thymus vulgaris* confirment la présence de poils sécréteurs à tête pluricellulaire et à huit cellules sécrétrices d'huiles essentielles, qui sont

stockées dans ces poils sécréteurs (*Lamiaceae*). Ces poils présentent des membranes spéciales caractérisées par leur lipophilie et leur imperméabilité extrême aux gaz, ce qui limite leur évaporation et leur oxydation.

2. Extraction de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

2.1. Evaluation du rendement en huile essentielle

Le rendement en huile essentielle a été calculé en fonction de la quantité de matière végétale sèche des feuilles de *Thymus vulgaris*. Le rendement obtenu par hydrodistillation de la plante de *Thymus vulgaris* est d'environ 2,09%, comme le montre le tableau 10. Il est important de noter que la plus grande quantité d'huile essentielle extraite est obtenue au cours de la première heure.

Tableau 10 : rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris*

Les feuilles du <i>Thymus vulgaris</i>		
Poids de la plante sèche	Masse d'HE récupérée en (g)	Rendement en HE %
136 g	8,87 g	2,09%

D'après le Tableau 11, notre huile a présenté un rendement d'environ 2,09%, ce qui est légèrement supérieur à celui du *Thymus sp* donné par **Bouras et Hachemi (2019)**, qui est de 1,26%, ainsi qu'à celui du *Thymus vulgaris* donné par N. **Bouguerra et al.(1986)**, qui est de 1,58%.[76] ; [56].

Nous constatons également que notre rendement est inférieur à celui trouvé par **Abdelli et al., (2017)**, qui est estimé à 4,2%. Nos résultats sont conformes à ceux donnés par l'AFNOR (2,09% > 1%) [75].

Tableau 11 : étude comparative des rendements en huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

	[75] (Telmcen)	[76] (Blida)	[56] (Mostaganem)	Notre huile testée (Mila)	
Huile essentielle du <i>T. vulgaris</i>	Les parties utilisées : feuilles à l'état sec L'espèce : <i>Thymus vulgaris</i>	Les parties utilisées : feuilles, fleurs, tiges à l'état frais L'espèce : <i>Thymus vulgaris</i>	Les parties utilisées : feuilles, fleurs, tiges à l'état sec. L'espèce : <i>Thymus sp</i>	La partie utilisée : les feuilles à l'état sec L'espèce : <i>Thymus vulgaris</i>	AFNOR (Les feuilles)
Rendement (%)	4,2 %	1,58 %	1.26 %	2,09%	1\geq

Selon nos résultats et ceux trouvés dans la littérature, on observe une différence entre les rendements en huile essentielle du *Thymus vulgaris*, qui peut être due à plusieurs facteurs :

- L'origine géographique de la plante.
- Le mode de culture (sauvage, biologique, etc.).
- Les facteurs écologiques, notamment le climat.
- L'espèce botanique elle-même.
- L'organe végétal utilisé, car les plantes aromatiques peuvent produire des huiles essentielles différentes selon les parties utilisées (feuilles, tiges, fleurs) en raison de leurs compositions chimiques distinctes.
- Le stade de croissance de la plante (reproductif, floraison, etc.).

- La période de récolte et le moment de la journée, puisque nous avons récolté la plante à un stade reproductif spécifique, en milieu d'après-midi (période privilégiée pour le thym).
- La conservation du matériel végétal.
- La méthode d'extraction de l'huile essentielle, qui était l'hydrodistillation de type Clevenger par entraînement à la vapeur.

3. Contrôles de qualités de l'HE du *Thymus vulgaris*.

3.1. Caractéristiques organoleptiques

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation présente une couleur jaune claire sous forme liquide (**voir photo 16**). Elle a un goût piquant et une forte odeur thymolée, témoignant de la présence de thymol caractéristique des plantes aromatiques. Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sont présentées dans le **Tableau 12**.

Nos résultats sont conformes aux normes de l'AFNOR.

Tableau 12 : caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

	Couleur	Aspect	Saveur	Odeur
HE du <i>Thymus vulgaris</i>	Jaune claire	Liquide	Piquant Epicée	Thymolée Très forte
HE du <i>Thymus vulgaris</i> [62].	Brun au brun- rouge	Liquide Mobile	Un fond légèrement épicé	Caractéristique, Phénolique (Thymol).



Photo 16 : aspect de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

3.2. Caractéristiques physico-chimiques du l'HE du *Thymus vulgaris*

D'après le **Tableau 13**, Nos résultats indiquent que cette huile essentielle a un indice de réfraction de 1,404, une densité relative de 0,84 et un pH neutre de 6,99. Il est courant d'observer des variations dans les propriétés physico-chimiques des huiles essentielles, où l'indice de réfraction varie en fonction de la concentration en monoterpènes et de leurs dérivés oxygénés. La densité relative est un facteur crucial pour déterminer la qualité de notre huile, notamment dans les secteurs de la pharmacie et de la cosmétique, où elle peut influencer la neutralité du produit.

Le pH, quant à lui, a un effet sur les propriétés antimicrobiennes de l'huile essentielle et joue un rôle de stabilisateur contre les microorganismes [77].

À des fins de validation, nous avons comparé nos résultats expérimentaux avec ceux des normes de l'AFNOR. Les valeurs obtenues avec notre huile sont légèrement inférieures à la norme française de l'AFNOR, mais ces résultats restent dans les limites acceptables, notamment une densité relative inférieure à celle de l'eau et un indice de réfraction compris entre 1 et 2.

Il est important de noter que de tels changements sont fréquents et sont causés par des différences dans les chimiotypes, les différentes phases du cycle de vie de la plante, les différentes parties de la plante et les facteurs environnementaux tels que la saison et les conditions de culture.

Tableau 13 : caractéristiques physico-chimiques de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

Huile essentielle du <i>Thymus vulgaris</i> (Les feuilles)	Les paramètres physico-chimiques		
	PH	Densité relative	Indice de réfraction
	6,99	0,84	1,404
AFNOR (2000)	-	0,910 -0,935	1,495- 1,505

La détermination de ces paramètres physico-chimiques est une étape indispensable pour caractériser la qualité de l'huile essentielle, cependant, elle ne peut être considérée comme une étape suffisante. Il est nécessaire d'utiliser d'autres techniques complémentaires pour une évaluation plus complète.

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'Huile essentielle du *Thymus vulgaris*

4.1. Lecture de la concentration de suspensions microbiennes préparées

Les résultats obtenus après la lecture de la densité optique des suspensions microbiennes testées par spectrophotométrie sont illustrés dans le **Tableau 14**. Les charges microbiennes de toutes les suspensions sont conformes aux normes du *NCCLS* (anciennement *Clinical and Laboratory Institutes*) pour les souches bactériennes et la levure *Candida albicans*.

La charge microbienne d'*Aspergillus brasiliensis*, estimée après le dénombrement de l'inoculum à l'aide de la cellule de Malassez et le calcul de la moyenne, est de $3,9 \times 10^6$ UFC/ml. Cette estimation correspond à la suspension diluée 10^{-1} , ce qui est relativement supérieur à la norme du *NCCLS* qui est estimée entre 4 et 5×10^4 UFC/ml.

Tableau 14 : résultats de la densité Optique (Charge microbienne) pour chaque souche testée

Lecture de la densité optique (DO) ; méthode utilisée : spectrophotométrie			
Longueur d'onde utilisée : 600 nm (Bactéries) ; 620 nm (champignons)			
Lessouches microbiennes	Longueur d'onde utilisée (nm)	Densité optique	Concentration des suspensions microbiennes
<i>Escherichia coli</i>	600	0,10	$10^7 - 10^8$UFC/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>		0,16	
<i>Bacillus cereus</i>		0,17	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		0,16	
<i>Candida albicans</i>	620	0,11	1 à 5×10^6UFC/ml

4.2. L'aromatogramme

4.2.1. Evaluation qualitative

4.2.1.1. L'étude de la sensibilité des souches microbiennes testées vis-à-vis les différentes concentrations de l'HE testée

L'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes et fongiques par la méthode de diffusion sur disques permet d'obtenir les résultats illustrés dans le **Tableau 15 (Annexe 07)**.

Tableau 16 : résultats de l'activité antimicrobienne aux différentes concentrations de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Souches	Concentrations de l'huile essentielle testée (%)			
	100 %	75 %	50 %	25 %
<i>E. coli</i> ATCC8739	43±0,00	14±0,00	11,5±0,70	7±0,00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	46±5,65	15,5±0,00	12±0,70	8,5±0,00
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	46,5±0,70	16±0,00	13±1,41	7±0,00
<i>S. aureus</i> ATCC6538	36±1,41	18,5±0,70	12,5±0,70	8±0,00
<i>C. albicans</i> ATCC10333	44,5±3,53	23±1,41	16±0,00	7±1,41
<i>A. brasiliensis</i> ATCC 1640	31±1,41	18±1,41	12,5±3,53	8±1,41

Toutes les valeurs (zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyenne de deux essais ± écart type.

D'après nos résultats présentés dans le (Tableau 16) et les (Figures 08 et 09), nous constatons que les souches bactériennes et fongiques testées ont présenté différents degrés de sensibilité à la plupart des concentrations de l'HE testée, et les diamètres des zones d'inhibition enregistrées varient entre 7 mm et 46 mm.

Selon Ponce et al. (2003), la taille du halo d'inhibition a été utilisée pour classer la sensibilité des bactéries comme suit :

- Non sensible (-) pour les diamètres de halo inférieurs à 8 mm.
- Sensible (+) pour les diamètres de halo compris entre 9 et 14 mm.
- Très sensible (++) pour les diamètres de halo compris entre 15 et 19 mm.
- Extrêmement sensible (+++) pour les diamètres de halo supérieurs à 20 mm.

D'après nos résultats, on peut classer l'HE du *Thymus vulgaris* parmi les huiles essentielles à forte activité inhibitrice. Les concentrations qui ont donné les plus grandes zones d'inhibition sont les suivantes : 100 % (huile pure) contre *P. aeruginosa* (46 mm), *B. subtilis*

(46,5 mm), *E. coli* (43 mm) et *S. aureus* (36 mm) pour les souches bactériennes, ainsi que *C. albicans* (45 mm) et *A. brasiliensis* (31 mm) pour les souches fongiques.

L'huile essentielle pure de *Thymus vulgaris* est donc très active (très fortement inhibitrice) contre toutes les souches microbiennes utilisées ($D > 20$ mm).

Pour les concentrations de 50 % et 75 %, les zones d'inhibition varient entre 11,5 et 18,5 mm pour les souches bactériennes et entre 12,5 et 23 mm pour les souches fongiques.

Par ailleurs, toutes les souches microbiennes ont montré des zones d'inhibition entre 7 et 8,5 mm vis-à-vis de la concentration de 25 %. Voir la **planche 07 (Annexe 08)**.

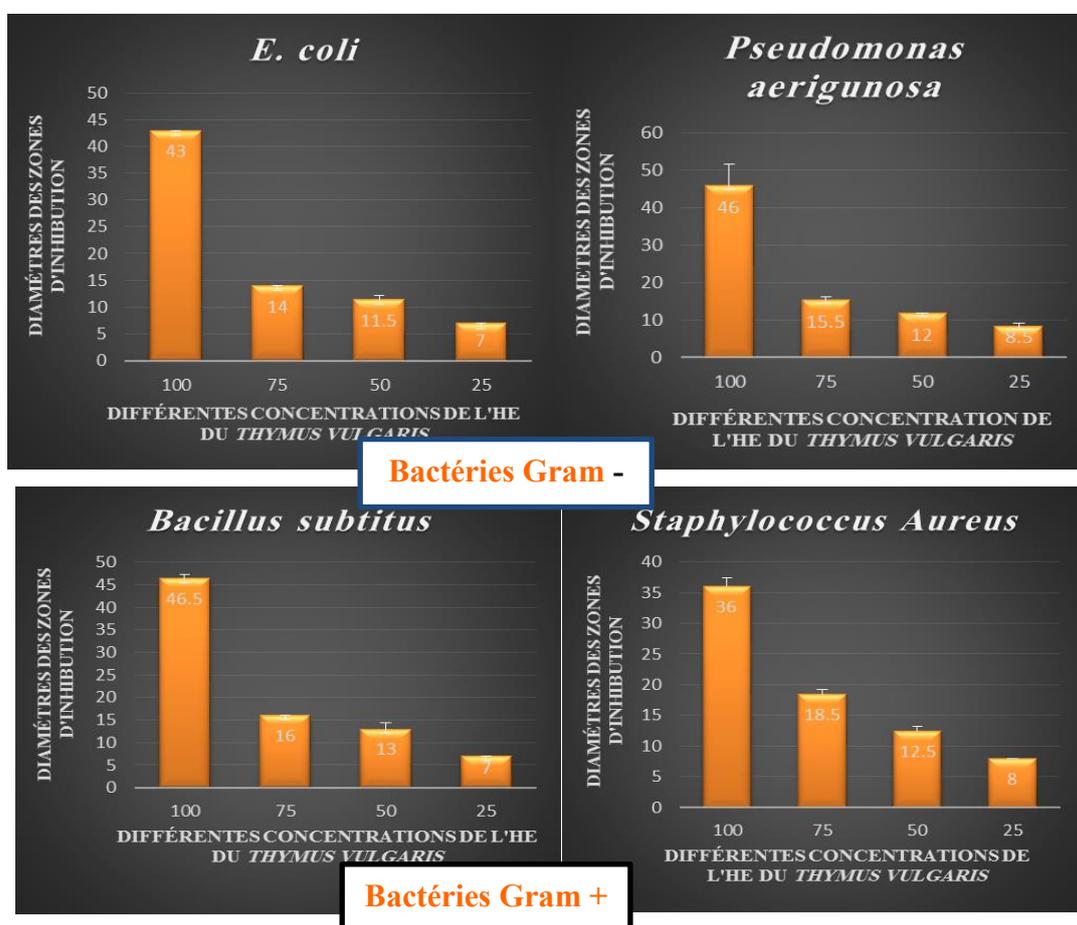


Figure 8 : moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches bactériennes sous l'effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* testée.

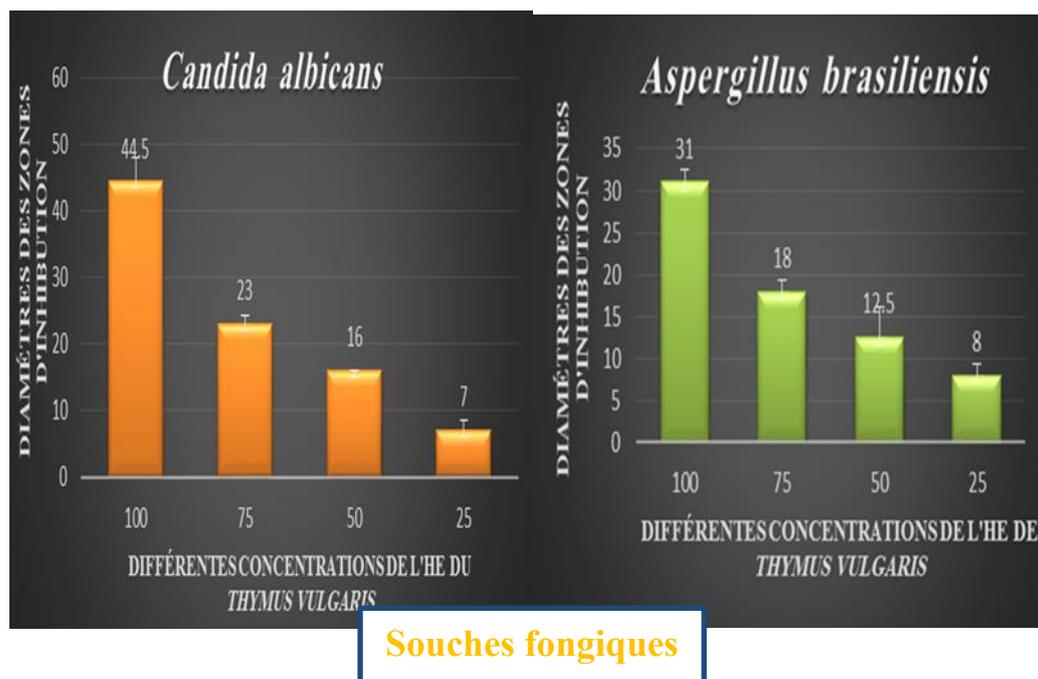


Figure 9 : moyennes des diamètres des zones d'inhibition des souches fongiques sous l'effet de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* testée.

Il est communément reconnu que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles. Cependant, notre étude montre que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* constitue une exception à cette observation. Nos résultats démontrent que l'HE de *Thymus vulgaris* a un large spectre d'activité antibactérienne, à la fois contre les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *S. aureus*) et contre les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli*). De plus, une forte sensibilité a été observée chez *Pseudomonas aeruginosa*, une souche connue pour sa résistance aux huiles essentielles. Il est intéressant de noter que le Gram positif *Bacillus subtilis* a présenté une sensibilité à l'HE de *Thymus vulgaris* supérieure à celle du Gram négatif *E. coli*.

Cette différence de sensibilité s'explique, selon **Boukhatem et al.,(2014)**, par les caractéristiques des membranes des bactéries Gram positif et Gram négatif. Le peptidoglycane des bactéries Gram positif est assez épais et associé à des protéines atypiques, tandis que chez les bactéries Gram négatif, le peptidoglycane est plus fin et relié à un complexe externe qui définit l'espace périplasmique. Cette membrane externe, constituée de lipopolysaccharides (LPS), de phospholipides et de protéines, est une bicouche lipidique asymétrique hydrophobe. Le périplasme contient des enzymes qui peuvent dégrader les composants chimiques complexes présents dans l'huile essentielle, les rendant ainsi inactifs [78].

En ce qui concerne les souches fongiques, nous avons observé une activité antifongique légèrement supérieure contre *Candida albicans*, avec des diamètres de zones d'inhibition de 44,5 mm, 23 mm, 16 mm et 7 mm, par rapport à *Aspergillus brasiliensis*, avec des diamètres de zones d'inhibition de 31 mm, 18 mm, 12,5 mm et 8 mm. Veuillez-vous référer à la **Figure 10** et à la **planche 08 (Annexe 09)** pour plus de détails.

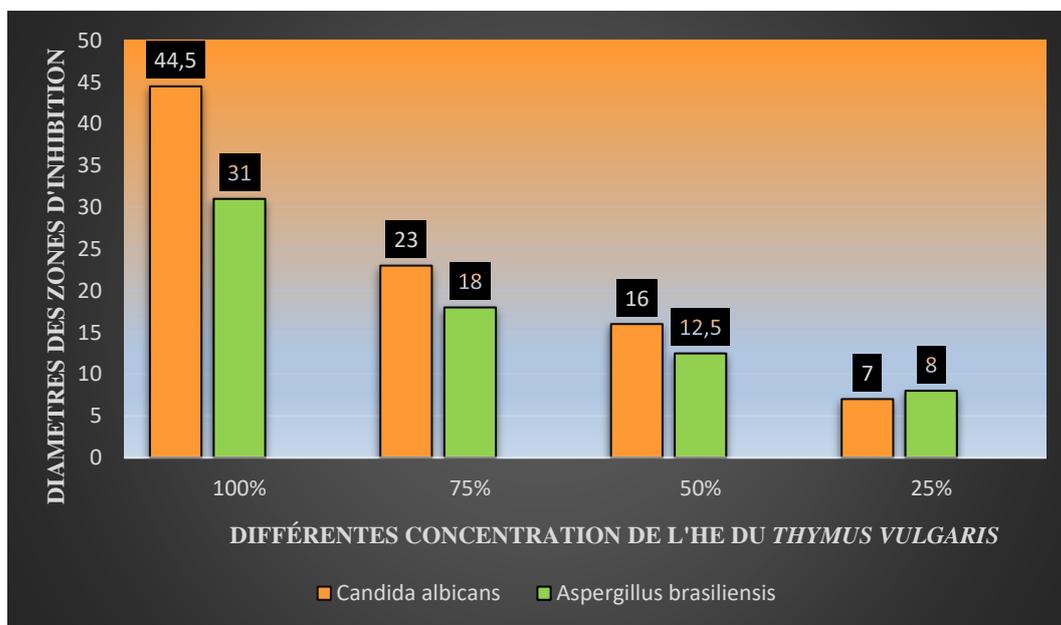


Figure 10 : diamètres des zones d'inhibition de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

4.2.1.2. Etude comparative de l'activité antimicrobienne

D'après le **tableau 17**, nous constatons qu'il existe une nette différence entre nos résultats et ceux trouvés dans la littérature, malgré l'utilisation de la même espèce végétale.

▪ Chez les bactéries

Le diamètre d'inhibition mesuré pour *Bacillus subtilis* est plus petit que celui déterminé par Abedli en 2017 [75].

Le diamètre d'inhibition de la souche *Escherichia coli* testée est supérieur à celui découvert par Abedli en 2017 [75].

Le diamètre d'inhibition de la souche *Pseudomonas aeruginosa* dans l'étude d'Abdelli en 2017 présente une grande différence par rapport à nos résultats, ce qui indique que cette souche est très sensible à notre huile essentielle, ce qui peut s'expliquer par sa richesse en Thymol [75].

▪ **Chez les moisissures**

Le diamètre d'inhibition de la souche *Candida albicans* est presque similaire à celui trouvé dans l'étude d'Abedlli en 2017, tandis qu'il existe une différence entre le diamètre d'inhibition de la souche *Aspergillus brasiliensis* de notre huile essentielle et celui trouvé par Abedlli en 2017.

Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par les volumes d'huile essentielle utilisés dans les disques et les variations de la teneur en Thymol. Même au sein des différentes espèces de thym, il peut y avoir des variations en raison des différents composants principaux présents dans chaque espèce. Cependant, ces résultats soutiennent l'application médicale de ces huiles essentielles pour la prévention et/ou le traitement de certaines infections et maladies.

Tableau 17 : comparaison des résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec d'autres études.

Les souches / Les diamètres	Notre HE Testée (20µL)	de Telmcen (15µL) [75]	<i>Thymus vulgaris</i> de Mostaganem (15µL) [75]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	46	13	11,33
<i>Escherichia coli</i>	43	33,33	31
<i>Bacillus subtilis</i>	46,5	59,67	50,33
<i>Candida albicans</i>	44,5	42	46,67
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	31	13,3	18

4.2.2. Evaluation quantitative

4.2.2.1. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice CMI

Pour les bactéries, selon les résultats obtenus (**Tableau 18**), la concentration minimale inhibitrice a été observée avec une dilution de 25% pour toutes les souches bactériennes.

Tableau 18 : évaluation de la CMI de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Les souches	0,08 %	0,125 %	0,25 %	1%	25%	50%	75%	100%	CMI
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	= 25 %
<i>Pseudomonas aeriginosa</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	= 25 %
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	= 25 %
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	= 25 %

+ : présence des colonies

- : absence des colonies

Chez les moisissures, selon les résultats obtenus (**Tableau 19**), la concentration minimale inhibitrice a été observée avec une dilution de 25% pour toutes les souches fongiques.

Tableau 19 : évaluation de la CMI de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Les souches	0,08 %	0,125 %	0,25 %	1%	25%	50%	75%	100%	CMI
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	= 25 %
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	= 25 %

+ : présence des colonies

- : absence des colonies

D'après les **tableaux 18 et 19**, il est observé l'absence de croissance des colonies pour toutes les souches testées dans les concentrations allant de 100% (huile essentielle pure) à la dilution de 25%. Cela indique que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est très active contre l'ensemble des souches bactériennes et fongiques testées.

La CMI obtenu dans notre étude expérimentale est comparé avec celui trouvé dans la littérature, comme présenté dans **le tableau 20**.

Tableau 20 : comparaison des CMI et CMF de l'huile essentielle testée avec celles de quelques études.

Les souches	CMI ; CMF de notre HE (mg/ml)	[79] <i>T. vulgaris</i> (Mostaganem)	[80] <i>Thymus sp</i> (Tizi Ouzou)	[81] <i>Thymus ciliatus</i> (Telemcen)	[82] <i>Thymus coloratus</i> (Telmcen)
<i>E. c</i>	0,281	0,04	0,289	0,960-0,980	-
<i>P.a</i>		0,04			-
<i>S.a</i>		0,04	0,289	0,920	1,625
<i>B.s</i>					-
<i>C.a</i>		0,04	0,579	1	>2

E.c: *Escherichiacoli* *P.a*: *Pseudomonas aeruginosa* *S.a*: *Staphylococcus aureus* *B.s*: *Bacillus subtilis* *C.a* : *Candida albicans* *Asp.b* : *Aspergillus brasiliensis* / - : aucune

Alianni et ses collègues (2001) ont proposé la classification suivante des extraits de matériel végétal en fonction de la CMI : une forte inhibition est définie par une CMI inférieure à 500 g/ml, une inhibition modérée se situe dans la plage de 600 g/ml à 1500 g/ml, et une faible inhibition correspond à une CMI supérieure à 1600 g/ml. Selon cette classification, notre huile essentielle de *Thymus vulgaris* présente une inhibition très forte sur toutes les souches, avec une CMI de 0,281 mg/ml (281 g/ml, soit dans la plage de 500 g/ml) [83].

Faci et Mennad (2022) ont également observé un effet similaire de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur les souches bactériennes *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, ainsi que sur la levure *Candida albicans*, avec une CMI de 0,04 mg/ml. Ces résultats concordent avec les nôtres, montrant un effet similaire sur les souches, bien que la différence quantitative soit notable (0,04 < 0,281 mg/ml) [79].

Dans l'étude de **SELLAH (2018)** sur l'espèce *Thymus sp*, la CMI pour *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* est de 0,289 mg/ml, ce qui est presque en accord avec nos résultats.

Cependant, pour la levure *Candida albicans*, la CMI est plus élevée que celle trouvée dans notre étude (0,579 mg/ml > 0,281 mg/ml) [80].

Dans l'étude de **Bousmaha et al. (2007)** sur l'espèce *Thymus ciliatus*, la CMI est supérieure à celle obtenue dans notre étude, ce qui peut s'expliquer par la faible teneur en thymol dans l'huile essentielle de *Thymus ciliatus*. En effet, selon **Dorman et al. (2000)**[84], le thymol, en plus du carvacrol, est l'un des composés ayant le spectre d'activité antibactérienne le plus large, et la présence des deux phénols permet un effet synergique [81].

Selon **Daoudi (2016)**, aucune activité n'a été observée avec l'huile essentielle de l'espèce *Thymus coloratus* lorsqu'elle a été testée contre *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, contrairement à *Staphylococcus aureus* qui a montré une CMI égale à 1,625 mg/ml. De plus, pour *Candida albicans*, la CMI est supérieure à 2 mg/ml. Ces résultats donnent un aperçu de l'activité de l'huile essentielle de *Thymus coloratus* contre les microorganismes, montrant qu'elle présente également une faible activité, ce qui peut s'expliquer par sa faible teneur en composés phénoliques tels que le carvacrol, dont le composé majoritaire dans cette espèce est le camphre [82].

En dehors des souches que nous avons testées, **Fani et Kohanteb (2017)** ont rapporté dans une étude actuelle une activité inhibitrice *in vitro* de l'huile de *Thymus vulgaris* contre certains isolats cliniques de pathogènes buccaux, y compris *Streptococcus pyogenes* (streptocoques hémolytiques du groupe A) et *Streptococcus mutans* des dents cariées. Tous les isolats microbiens (100 %) se sont révélés sensibles à des doses allant de 0,0032 à 0,256 mg/mL, et ils ont tous produit des zones d'inhibition dont la taille variait de 11,7 à 42 mm. Étant donné que les isolats cliniques ont produit les plus grandes zones d'inhibition pour toutes les concentrations d'huile de *Thymus vulgaris* (0,004-0,256 mg/mL), *S. pyogenes* était l'isolat le plus sensible [85].

Il peut être difficile de comparer les résultats des études sur les effets antimicrobiens de ces essences naturelles, car les procédures de préparation de l'inoculum, la taille de l'inoculum et les facteurs environnementaux utilisés peuvent différer. Les résultats sont ensuite comparés en fonction de l'analyse de la croissance, des conditions d'incubation et de la détermination des points finaux. Il est donc important de faire preuve de discernement, même lorsque plusieurs études vont dans le même sens.

Cependant, on peut conclure que les huiles essentielles dérivées des plantes du genre *Thymus* peuvent être bénéfiques dans la lutte contre certaines maladies bactériennes. Ainsi, l'utilisation des huiles essentielles dans le traitement des infections humaines, conformément à l'approche médicale traditionnelle, peut-être une option intéressante compte tenu des nombreux inconvénients des médicaments de synthèse[35].

4.2.3. Etude statistique

Selon les résultats obtenus dans le tableau ci-dessous, nous avons effectué une analyse de variance (ANOVA) en utilisant un modèle linéaire général (lm) pour évaluer l'effet de trois facteurs sur la variable réponse "zones". Les facteurs sont les suivants : "concentrations", "souches" et leur interaction "concentrations : souches".

L'ANOVA (tests de Type II) fournit un résumé des sources de variation, des sommes des carrés (SumSq), des degrés de liberté (Df), des valeurs F (F value) et des valeurs p (Pr(>F)) associées à chaque facteur. Les résultats de l'ANOVA sont les suivants :

- **"Concentrations"** : Ce facteur présente une somme des carrés de 8050,166667 avec 3 degrés de liberté. L'analyse de variance indique une valeur F de 836,380952 et une valeur p extrêmement faible (inférieure à $2,09876E-24$), suggérant un effet significatif du facteur "concentrations" sur la variable réponse "zones".
- **"Souches"** : Ce facteur présente une somme des carrés de 157,4166667 avec 5 degrés de liberté. L'analyse de variance indique une valeur F de 9,81298701 et une valeur p extrêmement faible (inférieure à $3,32934E-05$), suggérant un effet significatif du facteur "souches" sur la variable réponse "zones".
- **"Concentrations : souches" (interaction)** : Cette interaction entre les facteurs "concentrations" et "souches" présente une somme des carrés de 372,0833333 avec 15 degrés de liberté. L'analyse de variance indique une valeur F de 7,73160173 et une valeur p extrêmement faible (inférieure à $6,54132E-06$), suggérant un effet significatif de l'interaction entre les facteurs sur la variable réponse "zones".

Ces résultats suggèrent que les facteurs "concentrations", "souches" et leur interaction ont tous un effet significatif sur la variable réponse "zones".

Tableau 21 : analyse de variance de la zone d'inhibition en fonction de la souche, concentration et leur interaction.

Source de variations	Sommes des carrées (SumSq)	Degré de liberté (Df)	Moyenne des carrés	F (F value)	Probabilité (Pr)	Valeur critiqué pour F
Echantillon	157,4166667	5	31,48333333	9,81298701	3,32934 ^{E-05}	2,620654147
Colonnes	8050,166667	3	2683,388889	836,380952	2,09876 ^{E-24}	3,008786572
Interactions	372,0833333	15	24,80555556	7,73160173	6,54132 ^{E-06}	2,107673404
L'intérieur du groupe	77	24	3,208333333			

5. Analyse de la composition chimique

5.1. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse de la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été réalisée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS). Le chromatogramme obtenu (**voir Figure 11**) a révélé la présence de 39 composés volatils identifiés dans cette huile essentielle, représentant 92,22 % de sa composition totale.

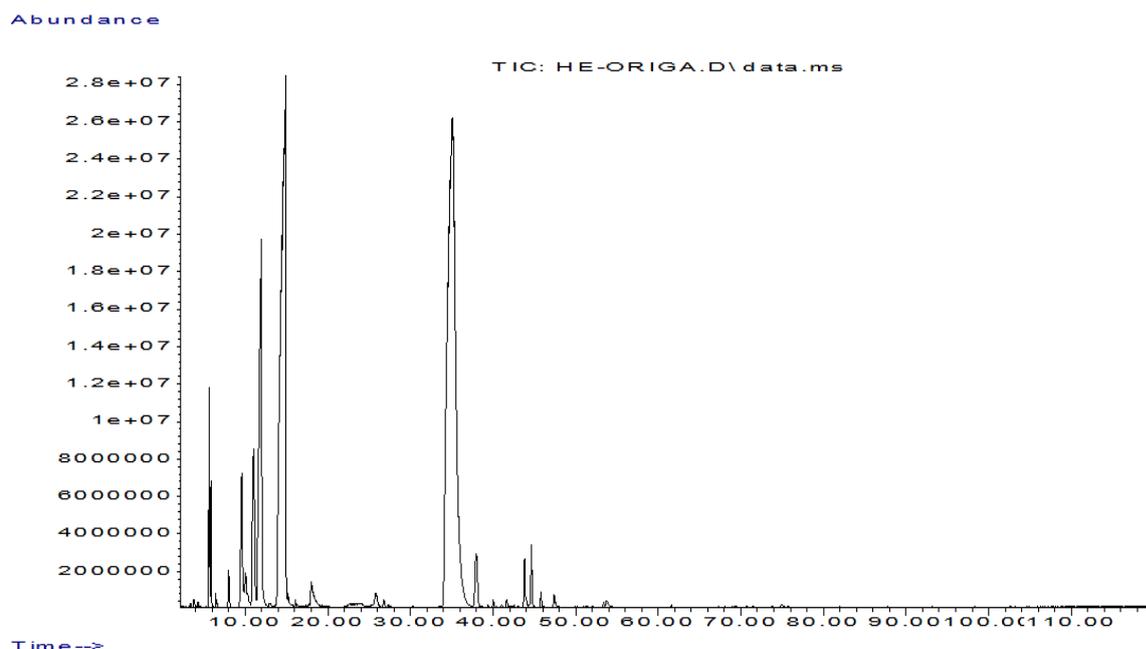


Figure 11 : chromatogramme des composés de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*
 chromatogramme des composés de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

Les principaux constituants de l'huile, avec les pourcentages les plus élevés, sont les suivants :

- T-caryophyllène : 1,44%
- Alpha-phéllandrène : 1,77%
- L-phellandrène : 2,52%
- α -Terpine : 3,77%
- Ortho-cymène : 10,10%
- γ -Terpine : 28,18%
- Thymol : 44,44%

Le thymol est le composé majoritaire dans cette huile essentielle, représentant 44,44% de sa composition. Par conséquent, le thym utilisé est un thym à forte teneur en thymol. Les détails de la composition chimique sont présentés dans le **tableau 22 et la figure 12**.

Veuillez-vous référer à l'Annexe 11, le Tableau 21 et la Figure 12 pour plus d'informations sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Tableau 22 : composition et pourcentages des composés chimiques majeurs de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Pic	Composé	Classe chimique	TR (min)	Surface
24	Thymol	Monoterpène	35,058	44,44 %
14	γ -Terpinene	Monoterpène	14,910	28.18%
12	Ortho-cymène	Monoterpène	11,002	10.10%
11	α -Terpinene	Monoterpène	11,002	3.77%
9	Béta-myrcène	Monoterpène	9,571	2,52%
4	Alpha phyllandrene	Monoterpène	5,640	1,77%
25	T-caryophylene	Sesquiterpène	37,984	1,41%

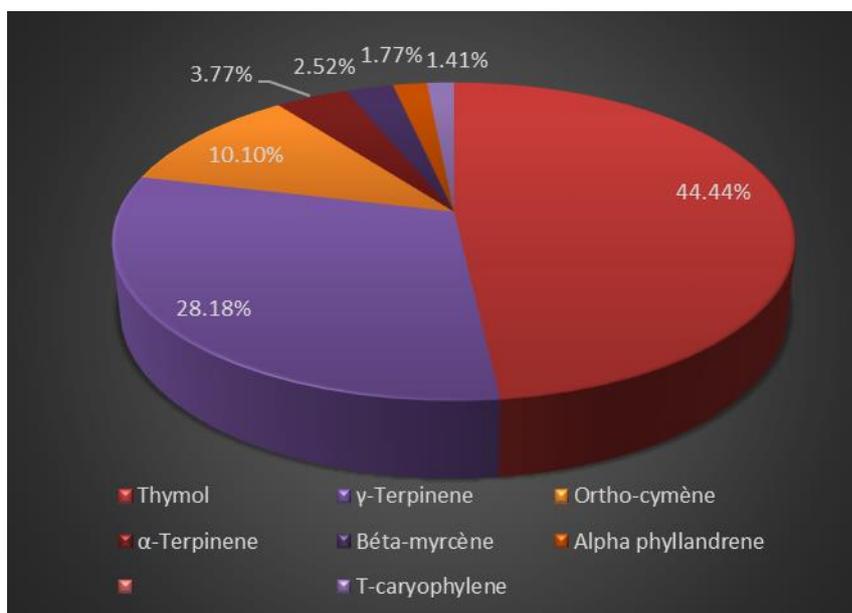


Figure 12 : composition en pourcentage des principaux composés de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Selon **Asllani et Toska (2003)**, l'abondance des composés de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est la suivante : le p-cymène (7,76% - 43,75% du contenu total), le γ -terpinène (4,20% - 27,62% du contenu total), le thymol (21,38% - 60,15% du contenu total), le carvacrol

(1,15% - 3,04% du contenu total) et le β -caryophyllène (1,30% - 3,07% du contenu total). Les principaux hydrocarbures à groupements alcooliques présents dans l'huile de thym sont le linalol (1,48% - 3,00% de la teneur totale), le bornéol (0,50% - 1,84% de la teneur totale), le terpinène-4-ol (0,48% - 1,22% de la teneur totale) et le α -terpinéol (0,17% - 0,70% de la teneur totale) [86].

Il est important de noter que la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* peut varier considérablement d'une étude à l'autre, ce qui est attribué aux chémotypes. Ces variations de composition ont été découvertes dans les années **1970** par le professeur **Passer de Montpellier**.

Dans notre étude, nous avons observé que la teneur en thymol était de 44,44% et celle en carvacrol était de 0,101%. Cependant, d'autres études ont rapporté des concentrations différentes de thymol et de carvacrol. Par exemple, **Negahban et Saeedfar**[87] ont trouvé des concentrations plus élevées de thymol (49%), d'ortho-cymène (19,99%), de carvacrol (7,63%) et de trans-caryophyllène (6,79%).

De même, **Miladi et al.** ont constaté des concentrations plus élevées de thymol (52,19%) que de carvacrol (6,72%). Il est courant d'observer une corrélation inverse entre les concentrations de thymol et de carvacrol, c'est-à-dire que lorsque la concentration de thymol est élevée, la concentration de carvacrol est faible, et vice versa [88].

Plusieurs facteurs peuvent influencer la composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, notamment l'ensoleillement, le climat, la composition du sol, l'altitude, la partie de la plante utilisée, l'origine géographique, la saison de récolte, le moment de la culture et de la récolte, le type de matériel végétal utilisé et la méthode d'extraction. Il est donc important de prendre en compte ces facteurs lors de l'évaluation de la composition chimique de l'huile essentielle.

Les études ont montré que les composés phénoliques tels que le thymol, le carvacrol et les hydrocarbures terpéniques comme le γ -terpinène sont responsables de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Les huiles essentielles riches en thymol et en terpinène ont une action inhibitrice efficace contre les souches fongiques, inhibant la production de spores et la sécrétion de mycotoxines[89].

En ce qui concerne les normes de la Pharmacopée Européenne, les pourcentages des composants majoritaires doivent se situer dans les plages suivantes :

- β -Myrcène : 1,0% - 3,0%
- α -Terpinène : 0,9% - 2,6%
- p-Cymène : 14,0% - 28,0%
- γ -Terpinène : 4,0% - 12,0%
- Linalol : 1,5% - 6,5%
- Terpinène-4-ol : 0,1% - 2,5%
- Thymol : 37,0% - 55,0%
- Carvacrol : 0,5% - 5,5%

En comparant nos résultats aux normes de la Pharmacopée Européenne, nous constatons que les composants majeurs de l'huile de *Thymus vulgaris* se situent presque dans ces plages.

6. Evaluation de la toxicité aigüe de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*

L'évaluation de la toxicité aiguë de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a été réalisée en suivant une approche progressive. La dose la plus élevée administrée était de 4000 mg/kg, puis les doses ont été réduites à 2000, 1000, 500 et 400 mg/kg en fonction de la mortalité et/ou de la morbidité des animaux. Cela nous a permis d'évaluer la toxicité aiguë de l'huile essentielle.

Nous avons observé les signes toxicologiques et enregistré l'heure de décès tout au long de l'expérience après l'administration des doses par voie orale aux différents groupes de souris. Les animaux ont été observés individuellement pendant les 30 premières minutes, avec une attention particulière, puis surveillés pendant huit heures supplémentaires. Les résultats sont récapitulés dans le **tableau 23**.

Tableau 23 : signes de toxicité et nombre de souris décédées après l'administration orale de doses croissantes d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Numéro du Lot	Nombre des souris de chaque lot	Doses (mg/kg)	Signes cliniques	Nombre des souris morts
			<ol style="list-style-type: none"> 1. Une souris a présenté une mobilité accélérée pendant les 15 premières minutes, suivie d'un état de paralysie. 2. Les deux autres souris ont montré une mobilité pendant la 	

1	03	400	<p>première heure, puis sont devenues immobiles.</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. Les souris ont refusé de boire et de s'alimenter. 4. Une sensation de brûlure au niveau du nez a été observée. 5. Après 48 heures, les souris ont repris leurs activités normales. 	00
2	03	500	<ol style="list-style-type: none"> 1. Une souris a montré une mobilité accélérée pendant les 15 premières minutes, suivie d'un état d'immobilisme. 2. Les deux autres souris sont devenues immobiles après une heure. 3. Les souris ont refusé de boire et de s'alimenter. 4. Une sensation de brûlure au niveau du nez a été observée. <p>Après 48 heures, les souris ont repris leurs activités normales</p>	00
3	03	1000	<ol style="list-style-type: none"> 1. Une mobilité accélérée pendant 15 minutes, suivie d'une paralysie. 2. Sensation de brûlure au niveau du nez. 3. Après 24 heures, deux souris sont décédées et une souris a présenté des tremblements. 4. Après 5 jours, les souris ont repris leurs activités normales, mais avec une diminution de leur poids. 	02
			<ol style="list-style-type: none"> 1. Une mobilité accrue et une respiration accélérée. 2. Immobilité complète après 30 minutes. 3. Sensation de brûlure au niveau du nez chez toutes les souris. 4. Mort d'une souris après 2 heures. 	

4	03	2000	5. Paralyse de deux souris. 6. Mort de deux souris après 24 heures.	03
3	03	4000	1. Immobilité marquée chez les trois souris. 2. Sensation de brûlure au niveau du nez marquée chez toutes les souris. 3. Mort d'une souris après 5 minutes. 4. Refus de boire et de s'alimenter. 5. Paralyse de deux souris. 6. Mort d'une souris après 24 heures. 7. Diminution de poids chez une souris après une semaine, suivie d'une perte de poids sévère à 12 g après 15 jours.	02
4	03	/	-Les souris à l'état normal -Aucuns signes enregistrés	00

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Juan Rojas et al. (2019)**, qui ont montré que les trois rats du groupe ont présenté des signes immédiats de toxicité après avoir reçu une dose unique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* de 2000 mg/kg de poids corporel. Ces signes comprenaient une hyperactivité et une sensation de brûlure au niveau du nez. Après 10 minutes, on a observé de l'ataxie, une hypersalivation et une détresse respiratoire. Un des rats s'est rétabli au bout de quatre heures, tandis que les deux autres ont vu leur état se détériorer et sont tombés en léthargie avec une hypothermie, puis dans le coma. La mort est survenue dans les 24 heures [90].

Dans l'étude menée par **Wafae et ses collaborateurs (2017)**, trois souris ont reçu une dose orale unique de 4500 mg/kg de poids corporel d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*. Deux des trois souris sont mortes 24 heures après avoir reçu l'huile essentielle à cette concentration. Au cours de la procédure, une sédation et une dyspnée ont également été observées. La sédation et la dyspnée sont survenues dans les premières heures suivant l'administration de cette dose. Selon les lignes directrices de 2002, on peut conclure que la dose de 4500 mg/kg est dangereuse pour les souris [75].

À travers cette évaluation de la toxicité aiguë, nous constatons que la dose létale (DL50) de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est d'environ 1000 mg/kg par voie orale chez les souris. Lorsque nous comparons cette valeur avec les normes de l'échelle de **Hodge et Sterner**, cette estimation de la DL50 classe l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* comme une substance légèrement toxique, où $500 < 1000 < 5000$ [91].

Il est important de noter que ces résultats se rapportent spécifiquement à l'administration chez les souris et ne peuvent pas être directement extrapolés à d'autres espèces, y compris les humains. Des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer la toxicité de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* chez d'autres organismes et pour mieux comprendre ses effets potentiels sur la santé.

7. Réalisation d'une formulation parapharmaceutique

- Nous avons préparé quatre essais pour plusieurs dosages d'une solution de bain de bouche à base de l'HE de *T.vulgaris* à des concentrations différentes de l'huile essentielle en respectant la CMI.
- En contrôlant les paramètres pharmaco- techniques dont les caractéristiques organoleptiques (Aspect, couleur, Odeur) ainsi que les caractéristiques physico-chimiques : Densité, pH. Afin de valider la neutralité du produit dans les normes.

7.1. Teste et contrôle du produit effectué pour chaque dosage

7.1.1. Caractéristiques organoleptiques de différents essais réalisés.

Tableau 24 : les caractéristiques organoleptiques des deux essais réalisés.

Caractéristiques	Aspect	Couleur	Odeur
Essai 01	Liquide	Transparent	-
Essai 02	Liquide	Vert	fait pensée à l'arôme utilisé
Essai 03	Liquide	Transparent	-
Essai 04	Liquide	Vert	fait pensée à l'arôme utilisé

7.1.2. Caractéristiques physicochimiques de différents essais réalisés

- **Densité relative**

Nous ne constatons que les quatre essais présents des valeurs de densité différentes et proches (**Tableau 25**). La densité relative est un facteur indispensable pour déterminer la qualité de l'huile essentielle en particulier dans les domaines de la pharmacie et de la cosmétique, où elle peut influencer la neutralité du produit.

Tableau 25 : résultats de la densité des quatre essais réalisés.

	Essai 01	Essai 02	Essai 03	Essai 04
Densité relative	0,93	0.96	1,12	1,03

- **Potentiel Hydrogène pH**

Nous trouvons que les quatre essais présents des valeurs différentes de pH dont l'acidité varie d'un essai à l'autre en fonction de variation de concentrations de l'huile essentielle qui est le principe actif ainsi que la variation des arômes utilisés et les autres excipients incorporés dans la lotion.

Le pH est un facteur primordial qui fait l'objet de stabiliser le produit contre les différents microorganismes.

Conclusion

En conclusion, notre étude sur l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a permis de mettre en valeur cette plante médicinale endémique de la flore algérienne. Les résultats obtenus ont démontré que cette huile essentielle présente une activité antimicrobienne à large spectre contre diverses souches bactériennes et fongiques. Sa composition chimique, principalement composée de thymol et de γ -terpinène, lui confère des propriétés antimicrobiennes remarquables. Cependant, il convient de noter que l'activité antimicrobienne peut varier en fonction de la souche microbienne ciblée et de la concentration utilisée.

De plus, l'huile essentielle extraite du *Thymus vulgaris* a été obtenue avec un rendement satisfaisant et répond aux normes de qualité établies par l'AFNOR. Cependant, des précautions doivent être prises en ce qui concerne sa toxicité, car des tests ont révélé une toxicité légère chez les souris à des doses élevées.

Dans l'optique de valoriser cette huile essentielle, nous envisageons son utilisation potentielle dans le développement d'un produit pharmaceutique, tel qu'un bain de bouche, pour les soins bucco-dentaires. Des études supplémentaires, notamment sur la composition chimique précise et l'activité antimicrobienne spécifique, sont nécessaires pour approfondir notre compréhension de cette plante et exploiter pleinement son potentiel thérapeutique.

En outre, il est recommandé d'établir une réglementation spécifique aux huiles essentielles en Algérie et de sensibiliser davantage les personnes sur les utilisations appropriées des plantes et de leurs huiles essentielles. Cette démarche contribuerait à maximiser les bénéfices de ces ressources naturelles et à promouvoir leur utilisation responsable dans le domaine de la santé.

En conclusion, nos résultats encourageants ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* en tant qu'agent antimicrobien naturel et nous espérons qu'ils contribueront à la recherche continue et à l'innovation dans le domaine des plantes médicinales.

Références bibliographiques

- [1] L. Galovičová *et al.*, « Thymus vulgaris Essential Oil and Its Biological Activity », *Plants*, vol. 10, n° 9, p. 1959, sept. 2021, doi: 10.3390/plants10091959.
- [2] A. Gedikoğlu, M. Sökmen, et A. Çivit, « Evaluation of Thymus vulgaris and Thymbra spicata essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties », *Food Sci. Nutr.*, vol. 7, n° 5, p. 1704-1714, mai 2019, doi: 10.1002/fsn3.1007.
- [3] N. Naseri *et al.*, « The Effect of Thymus Vulgaris Essential Oil and Chlorhexidine on Candida Albicans Accumulated on Removable Orthodontic Appliance: A Clinical Trial », *J. Dent. Shiraz Iran*, vol. 23, n° 1 Suppl, p. 190-197, juin 2022, doi: 10.30476/DENTJODS.2021.89317.1404.
- [4] M. Fani et J. Kohanteb, « In Vitro Antimicrobial Activity of Thymus vulgaris Essential Oil Against Major Oral Pathogens », *J. Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 22, n° 4, p. 660-666, oct. 2017, doi: 10.1177/2156587217700772.
- [5] M. Posgay, B. Greff, V. Kapcsándi, et E. Lakatos, « Effect of Thymus vulgaris L. essential oil and thymol on the microbiological properties of meat and meat products: A review », *Heliyon*, vol. 8, n° 10, p. e10812, sept. 2022, doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e10812.
- [6] D. H. Halat, M. Krayem, S. Khaled, et S. Younes, « A Focused Insight into Thyme: Biological, Chemical, and Therapeutic Properties of an Indigenous Mediterranean Herb », *Nutrients*, vol. 14, n° 10, mai 2022, doi: 10.3390/nu14102104.
- [7] « P-Thymus_vulgaris-200515.pdf ». Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: https://www.myrtea-formations.com/modules/aromatheque/Fichiers_pdf/Monographies_longues/P-Thymus_vulgaris-200515.pdf
- [8] G. YAKHLEF, « ETUDE DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES EXTRAITS DE FEUILLES DE Thymus vulgaris L. ET Laurus nobilis L. », magister, Université de Batna 2, 2010. Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://eprints.univ-batna2.dz/551/>
- [9] « These-Touhami-Aicha.pdf ». Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://biblio.univ-annaba.dz/wp-content/uploads/2018/01/These-Touhami-Aicha.pdf>
- [10] S. Shabnum et M. G. Wagay, « Essential Oil Composition of Thymus Vulgaris L. and their Uses », 2011. Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.semanticscholar.org/paper/Essential-Oil-Composition-of-Thymus-Vulgaris-L.-and-Shabnum-Wagay/e16ae3b6c875b39db2a5460df2df8a5e42c0d6f7>

- [11] E. Stahl-Biskup et F. Saez, *Thyme: The Genus Thymus*. CRC Press, 2002.
- [12] F. N. Ghomari, B. Kouache, A. Arous, et S. Cherchali, « Effet de traitement par fumigation du thym (*Thymus vulgaris*) sur le *Varroa destructor* agent de la varroase des abeilles », . *B*, 2014.
- [13] « Evaluation des activités biologiques des extraits d'une plante algérienne appartenant au genre *Thymus*..pdf ». Consulté le: 16 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mmf/2018/Evaluation%20des%20activit%C3%A9s%20biologiques%20des%20extraits%20d%E2%80%99une%20plante%20alg%C3%A9rienne%20appartenant%20au%20genre%20Thymus..pdf>
- [14] E. M. A. Dauqan et A. Abdullah, « Medicinal and Functional Values of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Herb », *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, 2017, doi: 10.7324/JABB.2017.50203.
- [15] S. M. Patil, R. Ramu, P. S. Shirahatti, C. Shivamallu, et R. G. Amachawadi, « A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacological aspects of *Thymus vulgaris* Linn. », *Heliyon*, vol. 7, n° 5, p. e07054, mai 2021, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07054.
- [16] H. Javed, S. Erum, S. Tabassum, et F. Ameen, « An Overview on Medicinal Importance of *Thymus Vulgaris* », *J. Asian Sci. Res.*, vol. 3, n° 10, Art. n° 10, oct. 2013.
- [17] S. M, G. J, M. Pd, B. D, et van G. Lj, « Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an in vitro model », *Mol. Basel Switz.*, vol. 15, n° 11, oct. 2010, doi: 10.3390/molecules15117532.
- [18] P. Reddy, R. V. Kandisa, V. PV, et S. Satyam, « Review on *Thymus vulgaris* Traditional Uses and Pharmacological Properties », août 2014.
- [19] S. Hosseinzadeh, A. Jafarikukhdan, A. Hosseini, et R. Armand, « The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris* », *Int. J. Clin. Med.*, vol. 06, n° 09, Art. n° 09, sept. 2015, doi: 10.4236/ijcm.2015.69084.
- [20] A. Kowalczyk, M. Przychodna, S. Sopata, A. Bodalska, et I. Fecka, « Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications », *Mol. Basel Switz.*, vol. 25, n° 18, p. 4125, sept. 2020, doi: 10.3390/molecules25184125.
- [21] A. K. Al-Asmari, M. T. Athar, A. A. Al-Faraidy, et M. S. Almuhaiza, « Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market », *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 7, n° 2, p. 147-150, févr. 2017, doi: 10.1016/j.apjtb.2016.11.023.

- [22] I. H. N. Bassolé et H. R. Juliani, « Essential oils in combination and their antimicrobial properties », *Mol. Basel Switz.*, vol. 17, n° 4, p. 3989-4006, avr. 2012, doi: 10.3390/molecules17043989.
- [23] Y. BOUMAHDJ, « Elaboration de lotions à base d'huiles essentielles d'une plante algérienne pour lutter contre les microorganismes et parasites externes chez l'homme et l'animal. », 10 2014.
- [24] W. Dhifi, S. Bellili, S. Jazi, N. Bahloul, et W. Mnif, « Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review », *Med. Basel Switz.*, vol. 3, n° 4, p. 25, sept. 2016, doi: 10.3390/medicines3040025.
- [25] M. Rahmouni, « Contribution à l'étude de l'activité biologique et la composition chimique des huiles essentielles de deux apiacées (*Ferula vesceritensis*Coss et DR et *Balansea glaberrima*Desf.) Lange », Thesis, 2018. Consulté le: 5 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://dspace.univ-setif.dz:8888/jspui/handle/123456789/1907>
- [26] A. Bencharif et M. (Encadreur) Benabdelkader, « Analyse chimique et activité antifongique de l'huile essentielle de l'espèce *Origanum vulgare* », Thesis, Université de Jijel, 2018. Consulté le: 25 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://dspace.univ-jijel.dz:8080/xmlui/handle/123456789/839>
- [27] C. S. Sell, *The Chemistry of Fragrances: From Perfumer to Consumer*. Royal Society of Chemistry, 2006.
- [28] A. Modzelewska, S. Sur, S. K. Kumar, et S. R. Khan, « Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth », *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents*, vol. 5, n° 5, p. 477-499, sept. 2005, doi: 10.2174/1568011054866973.
- [29] Z. A. A. Aziz *et al.*, « Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review », *Curr. Drug Metab.*, vol. 19, n° 13, p. 1100-1110, 2018, doi: 10.2174/1389200219666180723144850.
- [30] B. M. Nadjib, F. Amine, et K. Abdelkrim, « MÉTHODES D'EXTRACTION ET DE DISTILLATION DES HUILES ESSENTIELLES : REVUE DE LITTÉRATURE », 2019.
- [31] C. Valnet, *Essential Oils and Aromatherapy*. Edizioni R.E.I., 2015.
- [32] V. Kuete, « Medicinal Spices and Vegetables from Africa - 1st Edition », 14 janvier 2017. <https://shop.elsevier.com/books/medicinal-spices-and-vegetables-from-africa/kuete/978-0-12-809286-6> (consulté le 25 juin 2023).

- [33] N. V. Yanishlieva, E. M. Marinova, M. H. Gordon, et V. G. Raneva, « Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems », *Food Chem.*, vol. 64, n° 1, p. 59-66, janv. 1999, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00086-7.
- [34] S. U. Wisam, T. K. Nahla, et N. M. Tariq, « Antioxidant Activities of Thyme Extracts », *Pak. J. Nutr.*, vol. 17, n° 1, p. 46-50, déc. 2017, doi: 10.3923/pjn.2018.46.50.
- [35] A. Martins, « Les huiles essentielles antibactériennes: exemple du thym (thymus) », 2020.
- [36] B. Salehi *et al.*, « Thymus spp. plants - Food applications and phytopharmacy properties », *Trends Food Sci. Amp Technol.*, vol. 85, p. 287, 2019.
- [37] O. Borugă, C. Jianu, C. Mișcă, I. Goleț, A. Gruia, et F. Horhat, « Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity », *J. Med. Life*, vol. 7, n° Spec Iss 3, p. 56-60, 2014.
- [38] G. Arras et M. Usai, « Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of Thymus capitatus oil and its effect in subatmospheric pressure conditions », *J. Food Prot.*, vol. 64, n° 7, p. 1025-1029, 2001.
- [39] R. C. Oliveira, M. Carvajal-Moreno, B. Correa, et F. Rojo-Callejas, « Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus* », *Food Chem.*, vol. 315, p. 126096, 2020.
- [40] M. Hlebová *et al.*, « Antifungal and synergistic activities of some selected essential oils on the growth of significant indoor fungi of the genus *Aspergillus* », *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, vol. 56, n° 12, p. 1335-1346, 2021, doi: 10.1080/10934529.2021.1994801.
- [41] M. Bunse *et al.*, « Essential Oils as Multicomponent Mixtures and Their Potential for Human Health and Well-Being », *Front. Pharmacol.*, vol. 13, 2022, Consulté le: 5 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2022.956541>
- [42] K. H. C. B. Buchbauer Gerhard, Éd., *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. Boca Raton: CRC Press, 2009. doi: 10.1201/9781420063165.
- [43] R. J. Lamont, H. Koo, et G. Hajishengallis, « The oral microbiota: dynamic communities and host interactions », *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 16, n° 12, p. 745-759, déc. 2018, doi: 10.1038/s41579-018-0089-x.

- [44] N. Segata, L. Waldron, A. Ballarini, V. Narasimhan, O. Jousson, et C. Huttenhower, « Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes », *Nat. Methods*, vol. 9, n° 8, Art. n° 8, août 2012, doi: 10.1038/nmeth.2066.
- [45] J. L. Mark Welch, B. J. Rossetti, C. W. Rieken, F. E. Dewhirst, et G. G. Borisy, « Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 113, n° 6, p. E791-E800, févr. 2016, doi: 10.1073/pnas.1522149113.
- [46] B. O. Schroeder et F. Bäckhed, « Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease », *Nat. Med.*, vol. 22, n° 10, p. 1079-1089, oct. 2016, doi: 10.1038/nm.4185.
- [47] J. M. Baker, L. Al-Nakkash, et M. M. Herbst-Kralovetz, « Estrogen-gut microbiome axis: Physiological and clinical implications », *Maturitas*, vol. 103, p. 45-53, sept. 2017, doi: 10.1016/j.maturitas.2017.06.025.
- [48] X. Wang, L. Du, J. You, J. B. King, et R. H. Cichewicz, « Fungal biofilm inhibitors from a human oral microbiome-derived bacterium », *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, n° 10, p. 2044-2050, févr. 2012, doi: 10.1039/C2OB06856G.
- [49] J. Wang *et al.*, « Genome-wide association analysis identifies variation in vitamin D receptor and other host factors influencing the gut microbiota », *Nat. Genet.*, vol. 48, n° 11, p. 1396-1406, nov. 2016, doi: 10.1038/ng.3695.
- [50] N. K. Dudek *et al.*, « Novel Microbial Diversity and Functional Potential in the Marine Mammal Oral Microbiome », *Curr. Biol.*, vol. 27, n° 24, p. 3752-3762.e6, déc. 2017, doi: 10.1016/j.cub.2017.10.040.
- [51] M. Sällberg, « Oral viral infections of children », *Periodontol. 2000*, vol. 49, p. 87-95, févr. 2009, doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00277.x.
- [52] M. Dzidic *et al.*, « Oral microbiome development during childhood: an ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay », *ISME J.*, vol. 12, n° 9, p. 2292-2306, sept. 2018, doi: 10.1038/s41396-018-0204-z.
- [53] A. Gomez *et al.*, « Host Genetic control of the oral microbiome in Health and Disease », *Cell Host Microbe*, vol. 22, n° 3, p. 269-278.e3, sept. 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.08.013.
- [54] A. C. R. Tanner, C. A. Kressirer, et L. L. Faller, « Understanding Caries From the Oral Microbiome Perspective », *J. Calif. Dent. Assoc.*, vol. 44, n° 7, p. 437-446, juill. 2016.
- [55] M. Lu, S. Xuan, et Z. Wang, « Oral microbiota: A new view of body health », *Food Sci. Hum. Wellness*, vol. 8, n° 1, p. 8-15, mars 2019, doi: 10.1016/j.fshw.2018.12.001.

- [56] N. Bouras et A. Hachemi, « Etude préliminaire des activités biologiques (insecticide et antifongique) des huiles essentielles de deux plantes aromatiques *Thymus* sp. et *Origanum* sp. », juill. 2019, Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/13358>
- [57] S. Soltani, A. Shakeri, M. Iranshahi, et M. Boozari, « A Review of the Phytochemistry and Antimicrobial Properties of *Origanum vulgare* L. and Subspecies », *Iran. J. Pharm. Res. IJPR*, vol. 20, n° 2, p. 268-285, 2021, doi: 10.22037/ijpr.2020.113874.14539.
- [58] « Evaluation de l'activité antifongique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis de *Fusarium* spp. d'intérêt médical Etude prospective..pdf ». Consulté le: 27 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://fac.umc.edu.dz/snv/bibliotheque/biblio/mmf/2020/Evaluation%20de%20l%E2%80%99activit%C3%A9%20antifongique%20de%20l%E2%80%99huile%20essentielle%20d%E2%80%99Eucalyptus%20globulus%20vis-%C3%A0-vis%20de%20Fusarium%20spp.%20d%E2%80%99int%C3%A9r%C3%AAt%20m%C3%A9dical%20%20Etude%20prospective..pdf>
- [59] « senouci brix.pdf ». Consulté le: 27 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://dSPACE.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/19038/1/senouci%20brix.pdf>
- [60] F. Ayoughi, M. Marzegar, M. A. Sahari, et H. Naghdibadi, « Chemical Compositions of Essential Oils of *Artemisia dracunculoides* L. and Endemic *Matricaria chamomilla* L. and an Evaluation of their Antioxidative Effects », *J. Agric. Sci. Technol.*, vol. 13, n° 1, p. 79-88, janv. 2011.
- [61] P. Selvakumar, B. E. Naveena, et S. D. Prakash, « Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *eucalyptus globulus* », *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, vol. 2, p. S715-S719, janv. 2012, doi: 10.1016/S2222-1808(12)60250-3.
- [62] AFNOR, *Huiles essentielles. Tome 1 : Echantillonnage et méthodes d'analyse. 6e éd.* in Recueil de normes françaises. PARIS LA DEFENSE: AFNOR, 2000.
- [63] N. Mahboub, N. Slimani, M. Kadri, et K. Aminata, « EXTRACTION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHEMIQUE ET BIOLOGIQUE DES HUILES ESSENTIELLES A PARTIR DE *Cymbopogon schoenanthus* DANS LA REGION DE GHARDAÏA EXTRACTION AND PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OILS FROM *Cymbopogon schoenanthus* IN THE REGION OF GHARDAÏA », p. 21-34, déc. 2019.
- [64] M. C. Arendrup, M. Cuenca-Estrella, C. Lass-Flörl, W. Hope, et EUCAST-AFST, « EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for

- the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST) », *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 18, n° 7, p. E246-247, juill. 2012, doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x.
- [65] J. Khribch, S. Nassik, M. E. Houadfi, S. Zrira, et M. Oukessou, « Activité antibactérienne de l'huile essentielle d'origan et du carvacrol sur des souches d'*Escherichia coli* d'origine aviaire », *Rev. Marocaine Sci. Agron. Vét.*, vol. 6, n° 3, p. 300-307, 2018.
- [66] sabrine F. AIT CHAUCHE, « Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide des huiles essentielles et des extraits de deux Lamiaceae », Ecole nationale supérieure agronomique-KHALEF Abdellah alias, 2018. Consulté le: 28 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ccdz.cerist.dz/admin/notice.php?id=0000000000000904410000911>
- [67] E. L. Berkow, S. R. Lockhart, et L. Ostrosky-Zeichner, « Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 33, n° 3, p. e00069-19, avr. 2020, doi: 10.1128/CMR.00069-19.
- [68] P. Aureli, A. Costantini, et S. Zolea, « Antimicrobial Activity of Some Plant Essential Oils Against *Listeria monocytogenes* 1 », *J. Food Prot.*, vol. 55, n° 5, p. 344-348, mai 1992, doi: 10.4315/0362-028X-55.5.344.
- [69] A. G. Ponce, R. Fritz, C. del Valle, et S. I. Roura, « Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard », *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 36, n° 7, p. 679-684, nov. 2003, doi: 10.1016/S0023-6438(03)00088-4.
- [70] M. Sari, « Étude biologique et phytochimique de l'origan *origanum vulgare* L. ssp *glandulosum* Desf. Letswaart) espèce endémique d'Algerie - Tunisie - Sécheresse info », 3 février 2011. <http://www.secheresse.info/spip.php?article79684> (consulté le 28 juin 2023).
- [71] G. DJYH, M. ADEOTI, A. DJAMAN, F. GUEDE GUINA, et E. SESS, « EVALUATION DE LA TOXICITE AIGUË DE L'EXTRAIT TOTAL ... », 2010. <https://www.yumpu.com/fr/document/read/16777738/evaluation-de-la-toxicite-aigue-de-lextrait-total-> (consulté le 28 juin 2023).
- [72] D. A. Levin, « The Role of Trichomes in Plant Defense », *Q. Rev. Biol.*, vol. 48, n° 1, p. 3-15, 1973.
- [73] I. Konstantopoulou, L. Vassilopoulou, P. Mavragani-Tsipidou, et Z. G. Scouras, « Insecticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted

- from eleven Greek aromatic plants on *Drosophila auraria* », *Experientia*, vol. 48, n° 6, p. 616-619, juin 1992, doi: 10.1007/BF01920251.
- [74] A. PERRIN et M. COLSON, « L'appareil sécréteur des lavandes et des lavandins », *Appar. Sécréteur Lavandes Lavandins*, n° 69, p. 61-63, 1986.
- [75] W. Abdelli *et al.*, « Chemical Composition and Anti-inflammatory Activity of Algerian *Thymus vulgaris* Essential Oil », *Nat. Prod. Commun.*, vol. 12, n° 4, p. 1934578X1701200435, avr. 2017, doi: 10.1177/1934578X1701200435.
- [76] N. Bouguerra, F. T. Djebbar, et N. Soltani, « Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens* », vol. 4, n° 1, p. 37-42, 2017.
- [77] « BAZIZI-Marwa.pdf ». Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://biblio.univ-annaba.dz/ingeniorat/wp-content/uploads/2017/11/BAZIZI-Marwa.pdf>
- [78] M. N. Boukhatem, M. A. Ferhat, A. Kameli, F. Saidi, H. Taibi, et D. Teffahi, « Valorisation de l'essence aromatique du Thym », *studylibfr.com*, 4 octobre 2014. <https://studylibfr.com/doc/1121821/valorisation-de-l-essence-aromatique-du-thym> (consulté le 4 juillet 2023).
- [79] E. Faci et R. Mennad, « L'activité antimicrobienne et antioxydant de la plante *Thymus vulgaris* de la région de Sidi Ali sur les microorganismes pathogènes », 2022, Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://e-biblio.univ-mosta.dz/handle/123456789/21783>
- [80] T. Hesses et S. Simoud, « Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus sp* », juill. 2018, Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ummtto.dz/dspace/handle/ummtto/7854>
- [81] L. Bousmaha-Marroki, F. Atik-Bekkara, F. Tomi, et J. Casanova, « Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. ssp. eu-ciliatus Maire from Algeria », *J. Essent. Oil Res.*, vol. 19, n° 5, p. 490-493, sept. 2007, doi: 10.1080/10412905.2007.9699960.
- [82] F. Daoudi, « Analyse chimique et propriétés biologiques des huiles essentielles de *Chiliadenus rupestris* et *Thymus coloratus* (Zaater) de la région de Tlemcen. », Thesis, 2016. Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/8857>

- [83] N. Aligiannis, E. Kalpoutzakis, S. Mitaku, et I. B. Chinou, « Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, n° 9, p. 4168-4170, sept. 2001, doi: 10.1021/jf001494m.
- [84] H. J. D. Dorman, M. Koşar, K. Kahlos, Y. Holm, et R. Hiltunen, « Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, n° 16, p. 4563-4569, juill. 2003, doi: 10.1021/jf034108k.
- [85] M. Fani et J. Kohanteb, « In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens », *J. Evid.-Based Complement. Altern. Med.*, vol. 22, n° 4, p. 660-666, oct. 2017, doi: 10.1177/2156587217700772.
- [86] U. Asllani et V. Toska, « Chemical Composition of Albanian Thyme Oil (*Thymus Vulgaris* L.) », *J. Essent. Oil Res. - J ESSENT OIL RES*, vol. 15, p. 165-167, mai 2003, doi: 10.1080/10412905.2003.9712103.
- [87] M. Negahban et S. Saeedfar, « Essential Oil Composition of *Thymus vulgaris* L. », *Russ. J. Biol. Res.*, vol. 3, p. 35-38, mars 2015, doi: 10.13187/ejbr.2015.3.35.
- [88] H. Miladi *et al.*, « Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria », *Microb. Pathog.*, vol. 112, p. 156-163, nov. 2017, doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.057.
- [89] L. Jing *et al.*, « Antifungal Activity of Citrus Essential Oils », *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, n° 14, p. 3011-3033, avr. 2014, doi: 10.1021/jf5006148.
- [90] J. Rojas-Armas *et al.*, « Acute and Repeated 28-Day Oral Dose Toxicity Studies of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil in Rats », *Toxicol. Res.*, vol. 35, n° 3, p. 225-232, juill. 2019, doi: 10.5487/TR.2019.35.3.225.
- [91] A. Mongreville, « Aromathérapie: législation et toxicologie en France et en Europe, appliquées à la pédiatrie », 2017.

Annexes

Annexe 1

Matériel de laboratoire

Tableau 03 : appareillage, verreries, réactifs et solutions.

Multi usage	Usage unique	
	Matériels	Produits
<ul style="list-style-type: none"> - Bain-marie - Vortex - Autoclave - Bec bunsen - L'étuve d'incubation - L'étuve de stérilisation - Micropipette de 1ml - Micropipette de 20 µl - Micropipette de 2 µl - Balance -Anse de platine - PH mètre - Agitateur magnétique - Barreau magnétique - Pincés - Spectrophotomètre - Microscope optique - Frigo (2-8°C) - Parafilm - Papier film - Papier Aluminium - Hotte - Réfractomètre - Balance analytique 	<ul style="list-style-type: none"> - Spatule - Perforatrice - Bécher - Appareil type Clevenger - Ballon (5000 ml) - Réfrigérant - Chauffe Ballon - Boites de pétri de 90 mm - Embouts bleu stériles - Embouts jaune stériles - Embouts blanc stériles - Tubes coniques de 15 ml - Tubes à essai - Flacons de 250 ml - Papier Wattman n° 4 - Plaques en verres stériles - Ecouillons - Cuves - Seringues - Cellules Malassez - Pipettes pasteur - Lames et Lamelles - Gants - Tubes eppendorfs stériles 	<ul style="list-style-type: none"> - Acide acétique - Bleu de méthyle - Rouge Congo - Eau de javel - Eau distillée - Eau physiologie stérile - Tween 80 - Na Cl - Bouillon nutritive - Milieu Muller-Hinton - Milieu Sabouraud

Annexe 2

Les souches microbiennes

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Bactéries Gram positif, immobiles, facultatif aérobies et disposées en amas, elles sont pathogènes chez l'homme et capable de provoquer des infections graves : des infections de la peau et du sang, des abcès, infections urinaires, des pneumonies etc.

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Bactéries pathogènes à gram-négatif, mobiles, non capsulés et strictement aérobies, Elles se répandent dans le sol et les eaux salées. Elles provoquent des infections dans les voies urinaires, infectent les individus affaiblis et envahissent les tissus souillés.

Escherichia coli ATCC 8739

Bactérie bacille à gram négative, aérobie facultatifs (80 % de microflore bactérienne aérobie) appartiennent à la famille des entérobactéries, elle se trouve spontanément dans les tractus intestinale de l'homme, ses souches peuvent provoquer des infections urinaires, des colites hémorragiques.

Bacillus subtilis ATCC 6633

Bactérie à gram positif, aérobie parfois facultatifs, catalase positive, dont les cellules en forme des bâtonnets droits avec une extrémité carrée ou arrondie, mesurent 0,5-2,5* 1,2-10, la température idéale pour sa croissance se situe entre 30 et 35°C ce qui permet un doublement en 20 minutes

Aspergillus Brasiliensis ATCC16404 (précédemment *Aspergillus niger* ATCC 16404 est la désignation officielle)

Champignons microscopique filamenteuse dont les colonies de couleur noir, elle est omniprésente dans l'environnement (l'air, le sol etc.) ce champignon peut être impliqué dans des infections opportunistes de l'homme.

***Candida albicans* ATCC 10333**

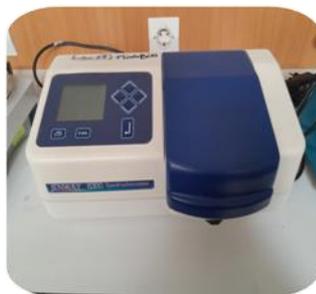
Levures avec des colonies ovales en culture, capable de produire des pseudo mycéliums, elles se localisent à l'état normal dans la bouche, la peau le tube digestif, elles sont dangereuses s'il y a un changement dans l'environnement, elles peuvent entraîner des infections superficielles : le muguet, et leur dissémination par le sang provoque des infections profondes au niveau des organes : les reins, les poumons et le foie.

Annexe 03

Préparation de la solution saline physiologique stérile

- D'abord, nous avons dissous 9 g de Na Cl dans 500 ml d'eau distillée sous agitation par un agitateur magnétique, à l'aide d'un pH mètre on détermine le pH qui est égale à 5,40.
- Ensuite, nous avons ajouté l'eau distillée jusqu' à le volume de 1000 ml.
- Enfin, la solution repartie dans des tubes à raison de 9 ml et dans des flacons de 250 ml qui sont agitées et stérilisées pendant 20 minutes à 120 °C dans l'autoclave.

Annexe 04



Spectrophotomètre



Bain marie



Étuve de d'incubation



Étuve de stérilisation



Bec benzène



vortex

Planche 5 : activité antimicrobienne

Annexe 05

La dose létale (La DL50)

Tableau 07 : matériels non biologique pour la détermination de la (DL50).

Produits	Matériels	Appariels
Huile essentielle de Thym Eau physiologie	Les sondes de gavage (gastriques)	Balance
	Seringues	
	Tubes éppendorfs	
	Micropipette	
	Les embouts jaunes	
	Cages	
	Sonde de gavage	
	Gants de contention	

Annexe 06

Tableau 09 : le volume et les doses testées pour l'administration

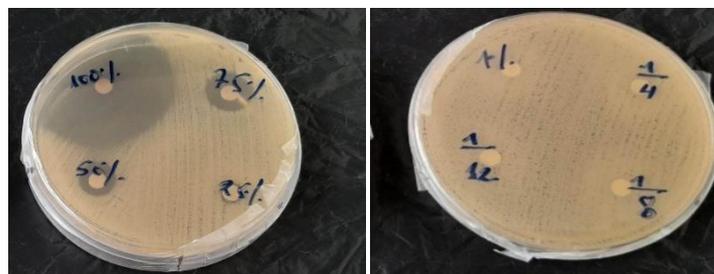
Numéro de lot	Le volume et les doses d'HE pour l'administration
1	15 µl d'HE à la dose de 400 mg/kg
2	17µld'HE à la dose de 500 mg/kg
3	25 µl d'HE à la dose de 1000 mg/kg.
4	57 µl d'HE à la dose de 2000 mg/kg
5	123 µl d'HE à la dose de 4000 mg/kg
6	Eau physiologie (Témoin)

Annexe 07

Tableau 15 : activité antimicrobienne des HE de *Thymus vulgaris* exprimée en ZI (mm) et en CMI (mg/ml).

L'espèce végétale étudiée	<i>Thymus vulgaris</i>				CMI 0,281 (mg/ml)
Méthode utilisée					
Aromatogramme (DZI, mm) / Quantité d'HE (20 µ L/disque)					
Les dilutions d'HE testé	100 %	75 %	50 %	25 %	
Les concentrations d'HE pour chaque dilution	1,124 mg/ml	0,843 mg/ml	0,562 mg/ml	0,281 mg/ml	
Les souches bactériennes	Zone d'inhibition (mm)				0,281 mg/ml
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	43	14	11,5	7	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	36	18,5	12,5	8	
<i>Bacillus subtilus</i> ATCC 6633	46,5	16	13	7	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	46	15,5	12	8,5	
Les souches fongiques	Zone d'inhibition ZI (mm)				0,281 mg/ml
<i>Candida albicans</i> ATCC	44,5	23	16	7	
<i>Aspergillus Brasiliensis</i> ATCC 16404	31	18	12,5	8	

Annexe 08



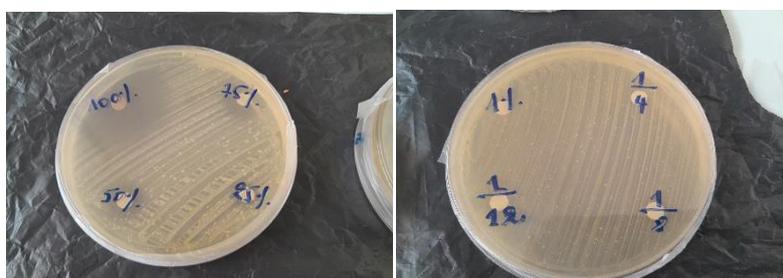
Pseudomonas aeruginosa



Bacillus subtilis



Echerichia coli



Staphylococcus aureus

Planche 6 : activité antibactérienne de différentes concentrations de l'HE du *Thymus vulgaris* vis-à-vis les souches bactériennes

Annexe 09

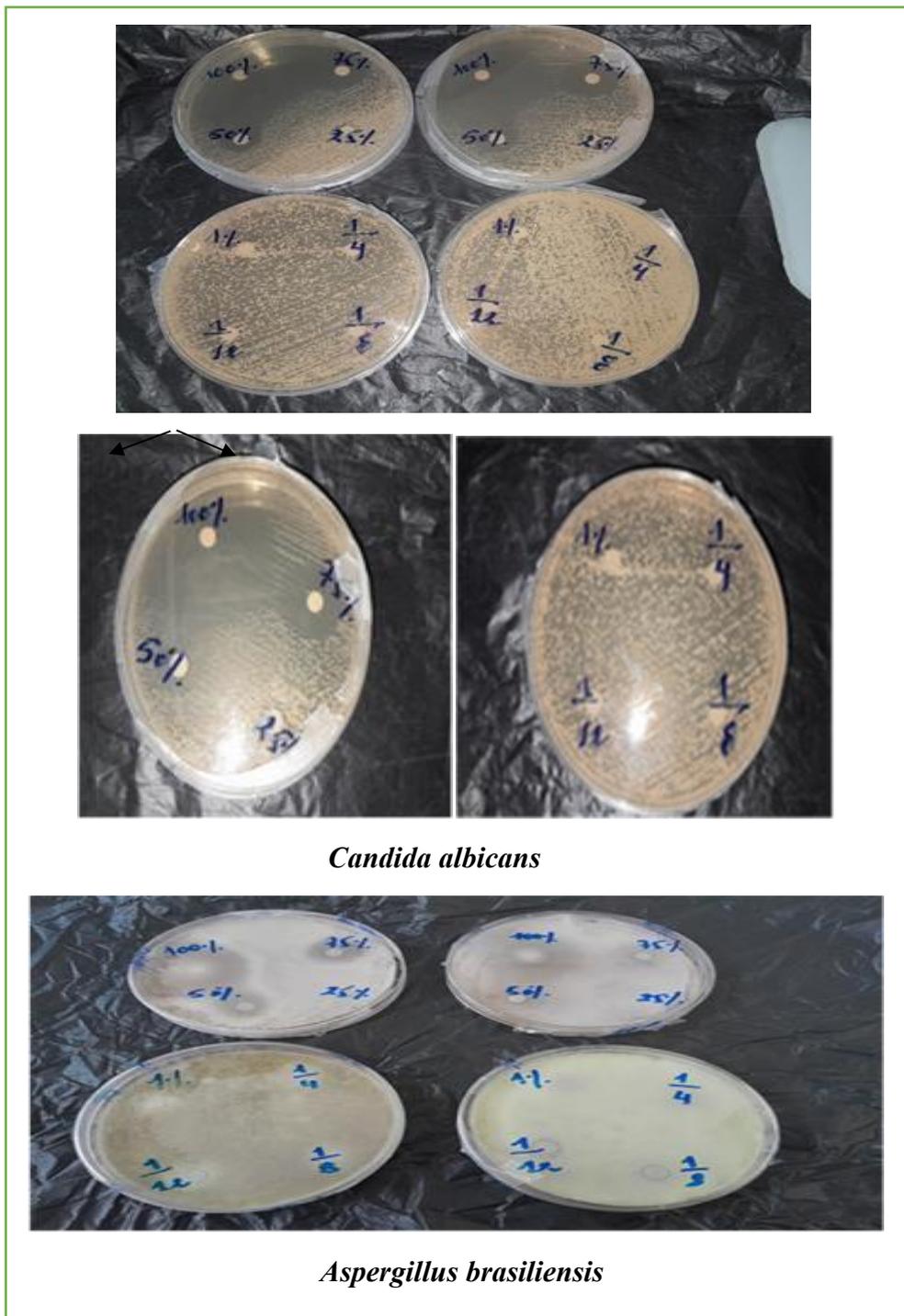


Planche 7 : activité antifongique de différentes concentrations de l'HE pure du *Thymus vulgaris* vis-à-vis les souches fongiques.

Premier axe

Présentation du projet

1.1 L'idée de projet

L'idée de ce projet est de développer et commercialiser une lotion parapharmaceutique pour le bain de bouche offrant une solution naturelle et efficace pour une bonne santé bucco-dentaire. Nous sommes motivés par la nécessité de proposer une alternative sûre et pratique aux produits conventionnels du marché, en utilisant les bienfaits de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris*.

Notre approche consiste à formuler une lotion parapharmaceutique contenant une concentration optimale d'huile essentielle du *Thymus vulgaris*, extraite par distillation à la vapeur. Cette huile essentielle est reconnue pour ses propriétés antimicrobiennes, antifongiques et anti-inflammatoires, qui contribuent à maintenir une cavité buccale saine.

Le processus de fabrication de notre lotion comprendra des étapes telles que l'extraction de l'huile essentielle, la mesure de ses propriétés physiques, l'évaluation de son activité antimicrobienne, la formulation de la lotion avec des excipients appropriés, et enfin, son conditionnement dans des récipients adaptés pour une utilisation pratique.

Nous investirons dans les équipements nécessaires pour garantir la qualité et la sécurité de notre produit, en respectant les normes pharmaceutiques et réglementaires les plus strictes. Notre objectif est de fournir aux consommateurs une lotion de bain de bouche efficace, sûre et facile à utiliser, tout en offrant des avantages tels que l'effet antifongique et anti-inflammatoire.

En développant cette lotion parapharmaceutique, nous souhaitons également promouvoir l'utilisation d'ingrédients naturels et respectueux de l'environnement, en contribuant à une meilleure santé bucco-dentaire sans compromettre la sécurité des utilisateurs ni l'écosystème.

L'objectif final de notre projet est de proposer une solution complémentaire au brossage des dents, offrant une alternative naturelle et efficace pour une hygiène buccale optimale. Nous croyons fermement que notre innovation contribuera à améliorer la santé bucco-dentaire des individus tout en favorisant la sensibilisation à l'importance des soins buccaux quotidiens.

1.2. Les valeurs proposées

Notre lotion de bain de bouche se distingue par plusieurs valeurs essentielles :

Efficacité : Notre produit est spécialement formulé pour offrir une activité antimicrobienne, antifongique et anti-inflammatoire. En incorporant une concentration optimale d'huile essentielle du *Thymus vulgaris*, notre lotion vise à promouvoir une cavité buccale saine en

réduisant la présence de bactéries et de champignons indésirables. Nous nous engageons à fournir une solution efficace pour une bonne santé bucco-dentaire.

Naturalité : Nous accordons une grande importance à l'utilisation d'ingrédients naturels et respectueux de l'environnement dans notre lotion de bain de bouche. En choisissant l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* extraite par distillation à la vapeur, nous privilégions une approche naturelle et durable pour les soins bucco-dentaires. Notre produit est exempt de substances chimiques agressives, offrant ainsi une alternative naturelle aux consommateurs.

Sécurité : Nous nous engageons à garantir la sécurité de nos utilisateurs en respectant les normes pharmaceutiques et réglementaires les plus strictes lors de la fabrication de notre lotion de bain de bouche. Les excipients pharmaceutiquement acceptables que nous utilisons sont choisis pour assurer la stabilité et la biodisponibilité de la lotion, tout en garantissant une compatibilité optimale avec la cavité buccale.

Qualité : Nous investissons dans des équipements de pointe et des procédures de contrôle de qualité rigoureuses pour assurer la qualité constante de notre lotion de bain de bouche. Nous nous engageons à fournir un produit de haute qualité qui répond aux attentes des consommateurs en matière d'efficacité et de sécurité.

Respect de l'environnement : En utilisant des ingrédients naturels et en favorisant des pratiques durables, nous contribuons à la préservation de l'environnement. Notre approche respectueuse de l'écosystème garantit que notre lotion de bain de bouche ne compromet pas la santé de la planète.

1.3 Equipe de travail

L'équipe du projet est composée de :

- **BOULAHROUF Khaled :** Enseignant-chercheur au département de microbiologie de l'université de Constantine 1, le porteur d'idée apporte son expertise dans le domaine de la microbiologie et joue un rôle clé dans la direction et la supervision du projet, veillant à son bon déroulement global.
- **ADOUI Assala :** étudiante en Mycologie et Biotechnologie Fongique.
- **ZAIBET Fatima Zohra :** étudiantes en Mycologie et Biotechnologie Fongique

1.4 Objectifs du projet

Les objectifs de notre projet de lotion de bain de bouche sont les suivants :

- Développer une lotion de bain de bouche efficace : Notre premier objectif est de formuler une lotion qui présente une activité antimicrobienne, antifongique et anti-inflammatoire, contribuant ainsi à maintenir une cavité buccale saine. Nous nous efforçons de fournir un produit qui aide à réduire la présence de bactéries et de champignons indésirables, favorisant ainsi une bonne santé bucco-dentaire.
- Assurer la sécurité et la qualité du produit : Nous mettons l'accent sur la sécurité et la qualité de notre lotion de bain de bouche. Nous nous engageons à respecter les normes pharmaceutiques et réglementaires les plus strictes lors de sa fabrication. Notre objectif est de garantir l'utilisation d'ingrédients sûrs et de maintenir des procédures de contrôle de qualité rigoureuses pour assurer la fiabilité et la constance du produit.
- Sensibiliser à l'importance de l'hygiène bucco-dentaire : Nous souhaitons sensibiliser les consommateurs à l'importance de l'hygiène bucco-dentaire et de l'utilisation d'une lotion de bain de bouche efficace. Nous visons à éduquer sur les avantages de notre produit et à encourager de bonnes pratiques d'hygiène bucco-dentaire pour prévenir les problèmes buccaux et promouvoir une bonne santé globale.
- Répondre aux besoins des consommateurs : Notre objectif est de proposer une solution adaptée aux besoins des consommateurs en matière de soins bucco-dentaires. Nous nous efforçons de formuler une lotion de bain de bouche qui répond aux attentes en termes d'efficacité, de naturalité, de sécurité et de qualité. Nous cherchons à offrir un produit qui soit pratique à utiliser et qui apporte une sensation de fraîcheur et de propreté.
- Contribuer au développement durable : Nous nous engageons à adopter des pratiques respectueuses de l'environnement tout au long du processus de fabrication et de distribution de notre lotion de bain de bouche. Nous visons à minimiser notre empreinte écologique en favorisant l'utilisation d'ingrédients naturels et durables, ainsi que des emballages respectueux de l'environnement.

1.5 Calendrier de réalisation du projet

Phase 1 : Recherche et développement (durée estimée : 6 mois) (déjà réalisé).

- **Mois 1** : Recherche sur les propriétés de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* et l'identification des excipients pharmaceutiquement acceptables.

- **Mois 2** : Extraction de l'huile essentielle du *Thymus vulgaris* et évaluation de son rendement d'extraction.

- **Mois 3** : Mesure de la densité, de l'indice de réfraction et du pH de l'huile essentielle.

- **Mois 4** : Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle contre les bactéries, les levures et les champignons.

- **Mois 5** : utilisation de la CGMS pour analyser la composition chimique et garantir sa conformité aux spécifications et Réalisation d'études toxicologiques pour déterminer la DL50 (Dose Létale 50) de la lotion. Cela implique des tests sur des modèles animaux pour évaluer la toxicité potentielle du produit.

- **Mois 6** : Formulation de la lotion en mélangeant l'huile essentielle avec les excipients appropriés et Tests de stabilité et d'efficacité de la lotion formulée.

Phase 2 : Production à grande échelle (durée estimée : 3 mois).

- **Mois 7-9** : Acquisition des équipements de production nécessaires et mise en place des procédures de fabrication.

- **Mois 10-11** : Production pilote pour valider les processus de fabrication et les contrôles de qualité.

- **Mois 12** : Transition vers une production à grande échelle et préparation de la commercialisation.

Phase 3 : Commercialisation et sensibilisation (durée estimée : en continu).

- **Mois 13 et suivants** : Lancement du produit sur le marché, promotion et sensibilisation à travers des campagnes de marketing et de communication.

- **Mois 18 et suivants** : Suivi des retours clients, ajustements éventuels de la formulation en fonction des commentaires et des besoins des utilisateurs.

- **Mois 24 et suivants** : Expansion de la distribution, partenariats avec des professionnels de la santé bucco-dentaire et participation à des événements de l'industrie pour renforcer la visibilité du produit.

Deuxième axe

Aspects innovants

1.6 Nature des innovations

Notre lotion de bain de bouche présente plusieurs aspects innovants qui la distinguent des produits existants sur le marché. Voici les principales caractéristiques innovantes de notre lotion :

- Formule à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* : Notre lotion de bain de bouche est formulée avec une huile essentielle de *Thymus vulgaris* spécialement sélectionnée pour ses propriétés antimicrobiennes. Le thym est reconnu pour ses effets bénéfiques sur la santé buccodentaire, notamment en combattant les bactéries responsables de la mauvaise haleine et en favorisant une meilleure hygiène buccale.
- Effet apaisant et rafraîchissant : L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* utilisée dans notre lotion de bain de bouche offre un effet apaisant et rafraîchissant à la fois. Elle procure une sensation agréable en bouche, aidant à soulager les irritations, les inflammations et les sensations de gêne.
- Action antibactérienne et antifongique : Grâce à ses propriétés antimicrobiennes, notre lotion de bain de bouche contribue à réduire la présence de bactéries et de champignons dans la cavité buccale. Cela aide à prévenir les infections buccales et à maintenir une flore buccale saine.
- Formule naturelle et respectueuse de l'environnement : Nous accordons une grande importance à l'utilisation d'ingrédients naturels et respectueux de l'environnement dans notre lotion de bain de bouche. En évitant les ingrédients chimiques agressifs, nous proposons une alternative plus douce et plus écologique pour la santé bucco-dentaire.
- Sans alcool et sans colorants artificiels : Notre lotion de bain de bouche est formulée sans alcool et sans colorants artificiels. Cela la rend adaptée aux personnes ayant une sensibilité aux produits contenant de l'alcool et contribue à une expérience buccale plus douce et naturelle.
- Goût agréable et rafraîchissant : Nous avons sélectionné des ingrédients naturels pour offrir un goût agréable et rafraîchissant à notre lotion de bain de bouche. Cela ajoute une sensation de fraîcheur à l'expérience du bain de bouche, la rendant plus plaisante et incitant à une utilisation régulière.

1.7 Domaine d'innovation

- Le domaine d'innovation de notre lotion de bain de bouche se situe dans le domaine de la santé bucco-dentaire et de l'hygiène buccale. Nous apportons une approche novatrice

en utilisant une formule à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, qui présente des propriétés antimicrobiennes et contribue à maintenir une bonne santé buccale.

- En intégrant cette huile essentielle spécifique dans notre lotion de bain de bouche, nous offrons une alternative naturelle et efficace pour lutter contre les bactéries responsables de la mauvaise haleine, des irritations buccales et des problèmes de santé bucco-dentaire. Cette approche novatrice permet de favoriser une hygiène buccale optimale tout en apportant une sensation apaisante et rafraîchissante.
- Notre domaine d'innovation s'étend également à l'utilisation d'ingrédients naturels et respectueux de l'environnement, ainsi qu'à la formulation sans alcool et sans colorants artificiels. En proposant une solution de bain de bouche qui combine efficacité, naturalité et respect de l'environnement, nous répondons aux attentes croissantes des consommateurs en matière de produits d'hygiène bucco-dentaire.

Troisième axe

Analyse stratégique du marché

1.8 Le segment du marché

- Le segment du marché ciblé par notre lotion de bain de bouche est celui des produits d'hygiène buccale et des soins dentaires. Ce segment englobe les consommateurs soucieux de leur santé bucco-dentaire et à la recherche de produits efficaces et naturels pour compléter leur routine de soins buccaux.
- Dans ce segment, il existe une demande croissante pour des solutions naturelles et respectueuses de l'environnement, sans compromettre l'efficacité et la performance. Les consommateurs sont de plus en plus conscients des ingrédients utilisés dans les produits d'hygiène buccale et cherchent des alternatives naturelles aux produits conventionnels qui peuvent contenir des agents chimiques agressifs.
- De plus, la sensibilisation à l'importance de l'hygiène buccale et de la santé bucco-dentaire est en augmentation, ce qui crée des opportunités sur le marché. Les consommateurs recherchent des produits qui offrent des bénéfices supplémentaires tels que l'action antimicrobienne, l'effet apaisant ou rafraîchissant, et qui répondent à leurs besoins spécifiques.
- Notre lotion de bain de bouche se positionne comme une solution innovante répondant à ces attentes du marché. En offrant une formule à base d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, nous nous distinguons en proposant un produit naturel, efficace et respectueux de l'environnement. De plus, notre lotion offre des avantages tels que l'activité antimicrobienne, l'effet apaisant et rafraîchissant, ce qui la rend attrayante pour les consommateurs à la recherche d'une alternative naturelle pour leur hygiène buccale.
- En analysant le segment du marché des produits d'hygiène buccale, nous identifions une opportunité de croissance pour notre lotion de bain de bouche en répondant aux besoins des consommateurs en quête de solutions naturelles et efficaces pour maintenir une bonne santé bucco-dentaire.

1.9 Mesure de l'intensité de la concurrence

- En Algérie et même en Afrique, le marché des bains de bouche est dominé par des marques proposant des produits traditionnels à base de composants chimiques. Ces concurrents bénéficient d'une présence bien établie sur le marché et d'une base de clients fidèles.
- Cependant, notre lotion de bain de bouche se démarque par son approche innovante et ses nombreux avantages pour la santé bucco-dentaire. Notre produit se compose d'une

formule entièrement naturelle, sans agents chimiques agressifs, ce qui en fait une alternative plus sûre et respectueuse de l'environnement.

- De plus, notre lotion de bain de bouche offre des propriétés antimicrobiennes puissantes grâce à l'incorporation d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*, reconnue pour ses propriétés antibactériennes et rafraîchissantes. Elle aide à combattre les bactéries responsables de la mauvaise haleine, de la plaque dentaire et des problèmes de gencives.
- Notre produit se distingue également par son goût agréable et rafraîchissant, qui offre une sensation de propreté et de fraîcheur durable après chaque utilisation.
- En proposant une lotion de bain de bouche naturelle, efficace et agréable à utiliser, nous répondons à la demande croissante des consommateurs en quête de solutions bucco-dentaires plus saines. Nous cherchons à sensibiliser le marché aux bénéfices de notre produit, tout en offrant une alternative de qualité supérieure aux bains de bouche traditionnels présents sur le marché actuel.

1.10 La stratégie marketing

- **Communication axée sur les avantages :**

Nous mettrons en avant les principaux avantages de notre bain de bouche, tels que son action rafraîchissante, son efficacité contre la mauvaise haleine, son pouvoir antibactérien et sa contribution à une meilleure santé bucco-dentaire. Nous communiquerons sur les résultats tangibles que nos clients peuvent obtenir en utilisant notre produit, en mettant l'accent sur l'amélioration de leur confiance en soi et de leur hygiène buccale globale.

- **Campagnes de sensibilisation à la santé bucco-dentaire :**

Nous développerons des campagnes de sensibilisation pour informer les consommateurs sur l'importance d'une bonne hygiène bucco-dentaire et sur les risques associés à une mauvaise santé buccale. Nous fournirons des conseils pratiques et des informations éducatives sur la prévention des caries, des gingivites et d'autres problèmes dentaires, tout en positionnant notre bain de bouche comme un outil efficace pour maintenir une bouche saine.

- **Recommandations professionnelles :**

Nous collaborerons avec des professionnels de la santé bucco-dentaire tels que les dentistes, les hygiénistes dentaires et les orthodontistes pour recommander notre bain de bouche à leurs patients. Nous fournirons des échantillons gratuits et des informations détaillées sur les

avantages de notre produit aux professionnels de la santé, afin qu'ils puissent les partager avec leurs patients et les encourager à l'inclure dans leur routine d'hygiène buccale.

- **Marketing digital :**

Nous utiliserons les plateformes en ligne telles que les sites web, les médias sociaux et les blogs spécialisés pour promouvoir notre bain de bouche. Nous créerons du contenu informatif et engageant sur les problèmes bucco-dentaires courants, les conseils d'hygiène buccale et les avantages de notre produit. Nous interagirons avec notre communauté en répondant à leurs questions, en partageant des témoignages positifs et en offrant des promotions exclusives pour encourager l'achat.

- **Packaging attrayant et informations claires :**

Nous veillerons à ce que notre emballage soit attrayant et reflète les valeurs de notre marque. Nous fournirons des informations claires sur les ingrédients, les instructions d'utilisation et les résultats attendus. Nous mettrons en évidence les certifications et les labels de qualité pour renforcer la confiance des consommateurs dans notre produit.

- **Évaluation des résultats et ajustements :**

Nous suivrons de près les performances de notre stratégie marketing en analysant les ventes, les retours clients et les retombées médiatiques. Nous effectuerons des enquêtes de satisfaction et recueillerons les commentaires des consommateurs pour améliorer continuellement notre produit et notre stratégie marketing.

Quatrième axe

Plan de production et d'organisation

1.11 Le processus de production

Voici le processus de production proposé pour le développement de notre solution de bain de bouche à base d'huiles essentielles de *Thymus vulgaris* :

- **Extraction des huiles essentielles** : Les huiles essentielles seront extraites de la plante *Thymus vulgaris* par hydrodistillation de type Clevenger. Ce processus permettra de récupérer les composés volatils présents dans la plante.
- **Identification des sites de sécrétion** : Une étape importante consistera à identifier les sites de sécrétion des huiles essentielles au niveau des feuilles de *Thymus vulgaris*. Cela permettra de localiser les zones riches en composés actifs.
- **Détermination du rendement** : Le rendement en huile essentielle sera évalué pour mesurer l'efficacité de l'extraction. Cette étape permettra de quantifier la quantité d'huile essentielle obtenue par rapport à la quantité de matière végétale utilisée.
- **Caractérisation des propriétés organoleptiques et physico-chimiques** : Les propriétés de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* seront caractérisées. Cela inclura l'analyse de sa composition chimique, de ses propriétés physiques et de ses activités biologiques potentielles.
- **Test d'activité antimicrobienne** : Des tests seront réalisés pour évaluer l'activité antimicrobienne des échantillons d'huiles essentielles étudiées. Ces tests permettront de déterminer leur efficacité contre les bactéries et les champignons responsables des infections buccales.
- **Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-MS)** : Cette technique sera utilisée pour analyser en détail la composition chimique des huiles essentielles. Elle permettra d'identifier les différents composés présents et de quantifier leur concentration.
- **Évaluation de la toxicité aiguë** : La toxicité aiguë de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sera évaluée en déterminant la dose létale (DL50). Cette étape permettra de garantir la sécurité d'utilisation de notre produit.
- **Développement de la solution de bain de bouche** : En se basant sur les résultats obtenus, une solution de bain de bouche sera développée en utilisant les huiles essentielles étudiées. Cette solution sera formulée de manière à offrir une efficacité antimicrobienne tout en étant sûre et agréable à utiliser.



Figure : une lotion parapharmaceutique « Bain de bouche » (Produit fini 100 ml)

1.12 La main d'œuvre

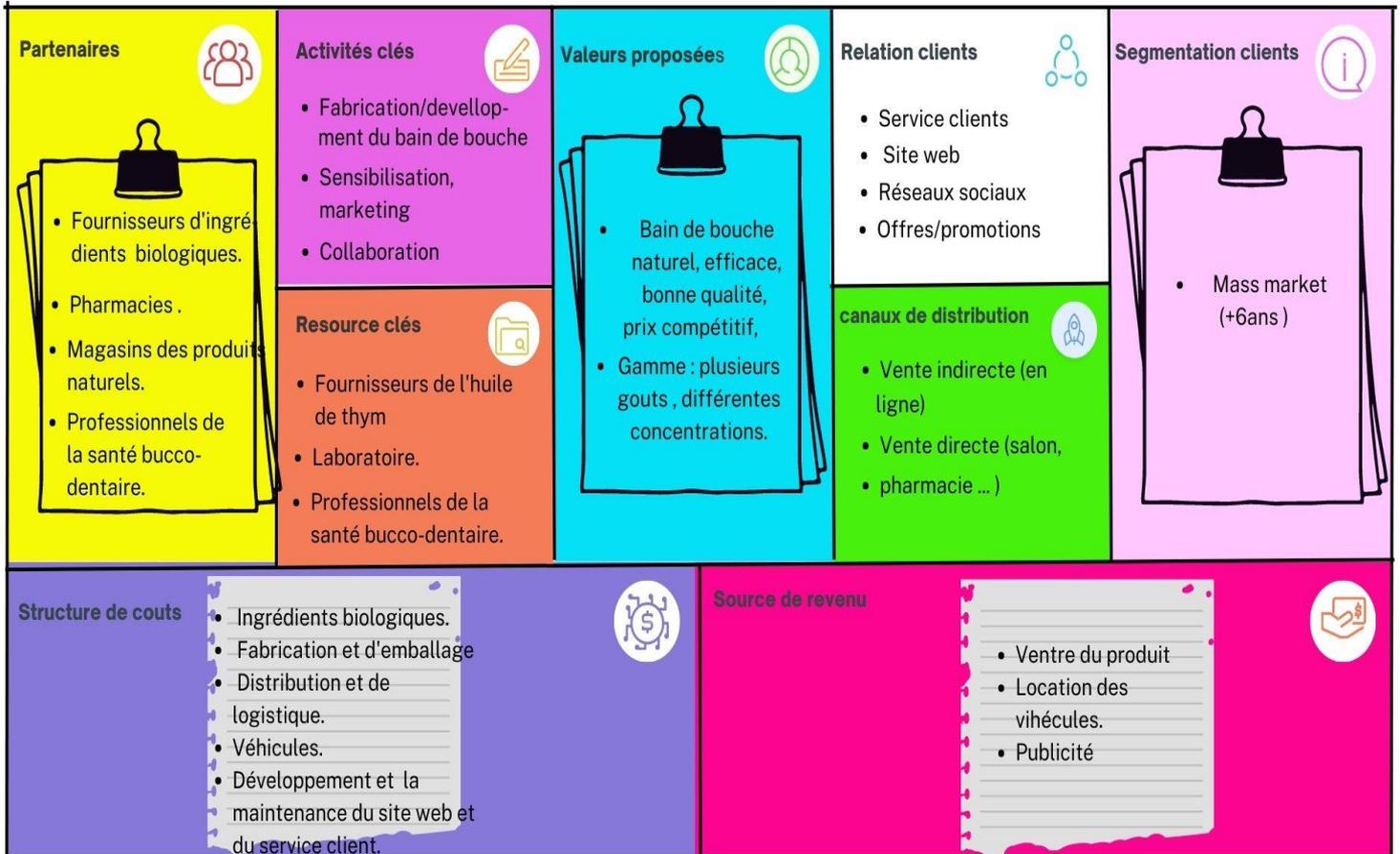
Notre projet créera une vingtaine d'emploi au début et au fur et a mesure que l'entreprise va prospérer, la demande de main d'œuvre augmentera. Pour chaque poste, il faut une certaine qualification en rapport avec le poste.

1.13 Les principaux partenaires

Nos partenaires les plus importants sont :

- Les agences de financement.
- Incubateur de l'université de Constantine 1.
- Agences de marketing.
- Agences publicitaires.

Business Model Canvas



Mémoire présenté dans le de l'arrêté ministériel 1275 en vue de l'obtention du diplôme de Master et diplôme startup –diplôme brevet

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique

Titre :

Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de la plante de *Thymus vulgaris* et Élaboration d'une lotion pharmaceutique de bain de bouche.

Résumé :

Thymus vulgaris est une espèce botanique appartenant à la famille des Lamiaceae, et fait partie des plantes aromatiques médicinales (PAM), également connue sous le nom de "Zaïter" en Algérie. Les huiles essentielles (HE) sont des métabolites secondaires des plantes aromatiques qui possèdent des vertus thérapeutiques grâce à leurs activités biologiques. Notre étude vise à valoriser l'espèce *Thymus vulgaris*. Nous avons localisé les sites de sécrétion de l'huile essentielle en réalisant une étude anatomique des feuilles fraîches collectées à Ain Djarlab, dans la wilaya de Mila. L'extraction de l'huile essentielle à partir des feuilles séchées a été réalisée par hydrodistillation selon la méthode de Clevenger. Nous avons évalué la qualité de l'huile essentielle selon les normes AFNOR, puis nous avons étudié ses activités biologiques in vitro, notamment son activité antimicrobienne par la méthode des disques sur gélose, ainsi que sa concentration minimale inhibitrice (CMI) contre six souches microbiennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*). Les résultats de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE du *Thymus vulgaris* ont été soumis à une analyse de la variance à 3 facteurs (ANOVA 3) : Concentration, Souches, et leur interaction Concentration : Souches, afin de déterminer s'il y a un effet significatif sur la variable réponse "zone" en utilisant le logiciel statistique Excel. Nous avons également évalué sa toxicité aiguë in vivo et analysé sa composition chimique par CG/MS. L'huile essentielle est sécrétée au niveau des poils sécréteurs. Le rendement en huile essentielle obtenue était de 2,09 %. Cette huile présente un large spectre d'action contre toutes les souches testées, avec des diamètres d'inhibition variant de 7 à 46,5 mm pour les souches bactériennes et de 7 à 44,5 mm pour les souches fongiques, avec différentes concentrations d'huile essentielle testées (25 %, 50 %, 75 % et 100 %). La CMI obtenue pour les bactéries était semblable et égale à la CMI obtenue pour les champignons, avec une valeur estimée de 0,281 mg/ml. L'analyse de variance (ANOVA) que nous avons réalisée montre que les facteurs concentration, souche et leur interaction ont un effet significatif sur la variable réponse "zone". L'analyse de la composition chimique a permis d'identifier 39 constituants, les composés majoritaires étant le thymol (44,44 %) et le γ -terpinène (28,18 %), suivis du p-cymène (10,10 %), de l' α -terpinène (3,77 %), du β -myrcène (2,52 %), de l' α -phyllandrène (1,77 %) et du T-caryophyllène (1,44 %), avec un chémotype riche en thymol et moins riche en carvacrol. L'étude de la toxicité aiguë a révélé que cette huile essentielle était toxique chez les souris albinos à des doses supérieures à 1000 mg/kg (DL50). En conclusion, cette étude suggère que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle dépend des caractéristiques physico-chimiques, des composés présents et des souches microbiennes utilisées. Notre objectif est de développer une lotion parapharmaceutique (bain de bouche) à base de cette huile essentielle, dans le but de l'utiliser pour les soins buccodentaires.

Mot clés : *Thymus vulgaris*, Huile essentielle, Extraction, Activité antimicrobienne, CMI, CG/MS, Thymol, DL50, Bain de Bouche.

Membre du jury :

Encadreur : Dr. BOULAHROUF Khaled (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Président : Dr. BENKAHOUL Malika (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur : Dr. MEGHNOUS Ouissem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Incubateur : BELIL Inès (Professeur - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

CATI : Dr. BETINA Soumia (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Secteur Socio-économique : BENLATRECH Salim (Catalyse Lab).

Présentée par : Zaïbet Fatima Zohra
Adoui Assala

Année universitaire 2022/2023