الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ Dr. YAHIA FARES DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE SCIENCE DE LA NATURE ET DE LA VIE



MEMOIRE DE MASTER

En vue de l'obtention du Diplôme de

Master en Biologie

Spécialité: Microbiologie appliquée

THEME

ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET ANTIMYCOBACTERIENNE DE *ZINGIBER OFFICINALE* ET DE *THYMUS VULGARIS*

Présenté par

Mlle. HENTABLI Imen **Mlle. BOUKIRAT Meriem**

Devant les jurys

Mr. OTMANINE Khaled	**MAA Université de Chlef**	**Promoteur**
Mr. HAMMOUDI Mounir	**MAA Université d'Ain Defla**	**Président**
Dr. KHAMES Mammar	**MCB Université de Médéa**	**Examinateur**
Dr. AINAS Mahfoud	**MCB Université de Médéa**	**Examinateur**

Année Universitaire: 2017/2018

Remerciements

Nous aimerions en premier lieu remercie le dieu Allah qui nous avons donné la volonté et le courage pour réaliser ce travail.

Nous voudrions témoigner nos reconnaissances au Mr. OTMANINE Khaled, pour avoir encadré ce travail. Nous le remercions particulièrement pour sa rigueur scientifique, son exigence et ses encouragements, en nous faisant partager son expérience et ses connaissances scientifiques, durant la réalisation de ce mémoire, au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Médéa.

Cette aventure a été possible grâce à une personne que nous apprécions et que nous respecterons énormément : M^lle HENTABLI Selma. Nous vous remercions chaleureusement pour votre confiance à notre égard, pour vos judicieux conseils, votre disponibilité ainsi que le temps et l'énergie que vous nous avez consacrés. Vous avez été un mentor extraordinaire.

Un remerciement particulier est adressé à Mr. HAMMOUDI Mounir Maître de Conférences à l'université de Médéa, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire. Veuillez trouver ici, *Monsieur, l'expression de nos plus profonds respects et notre entière reconnaissance.*

Nous tenons à remercier, Dr. KHAMES Mammar, Maître de Conférences à l'université de Médéa, pour le grand honneur qu'il nous a fait en acceptant d'examiner ce travail. Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement précis et votre grande disponibilité.

Nous sommes aussi très honoré que, Dr. AINAS Mahfoud, Maître de Conférences à l'université de Médéa, ait accepté de juger notre travail, Trouvé ici l'expression de notre reconnaissance.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à Mr. NABI Ibrahim, Maître de Conférences à l'université de Médéa, pour nous avoir accueillies au sein de son laboratoire, aussi pour sa bienveillance et sa générosité.

Nous remercions vraiment Mlle. AISSANI Fatma Zohra, Mr. DAOUDI Mohamed et Mr SKENDER pour leurs judicieuses conseils, leurs chaleureux encouragements et plus particulièrement pour Leurs aides durant la réalisation de ce travail.

Milles mercis aux :

Dr. HENTABLI Hamza pour son aide précieuse et ses conseils.

Enseignants et membres du Laboratoire : Mlle. Imen et Mme. Fayrouz pour leurs aides précieuses.

Dédicaces

*A ma **chère mère**, vous m'avez donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Je tiens à vous dire merci, pour votre patience, vos encouragements et vos judicieux conseils.*

*A l'astre qui s'est éteint et qui continue toujours de m'éclaircir sur la voie, A **mon père** que je dédie cette réussite. Que Dieu, le tout-Puissant, l'accueil en son vaste paradis.*

Hentabli Imen

Dédicaces

Louange à Allah, qui nous a guidés à cela, et nous n'avons eu aucun conciliateur, sauf qu'Allaah nous a guidés et Que la paix et les bénédictions soient sur notre prophète Mohomed.

Je tiens en tout premier lieu à remercier :

Mes chers parents mon source de joie et de bonheur et la bougie qui illumine mon chemin, Pour tous vos sacrifices, votre amour, votre tendresse, votre soutien, votre confiance et vos prières tout au long de mes études.

A ma chère binôme imene et à toute sa famille et surtout notre grande sœur M^{lle} Selma qui nous a accompagnée et nous a guidée par ses conseils.

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études, Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.

Boukirat Meriem

Résumé

Le but de cette étude est de déterminer et évaluer l'activité antimicrobienne et antimycobactérienne des extraits proviennent de plantes médicinales, *Zingiber officinale* et *Thymus vulgaris*. Les extraits ont été préparés, par quatre solvants, acétone et éthanol à l'état pur et ces mêmes solvants à 70% et 30% de l'eau distillée afin de varier la polarité du solvant. Le pouvoir antimicrobien des extraits de gingembre, de thym et ce de leurs associations a été évalué, *in vitro*, vis-à-vis de 23 souches microbiennes de référence, par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide et celle des dilutions en milieu liquide, En outre, 200µl (0.2ml) de chaque extrait a été mis à la surface de milieu lowenstein-jensen dans le but de déterminer l'activité antimycobactérienne de ces plantes. Les résultats indiquent que, le meilleur rendement est obtenu par l'extrait acétonique 70% de gingembre avec une valeur de 97.20%. Ainsi, les extraits de gingembre et de thym ont montré une activité antimicrobienne contre tous les microorganismes testés, la meilleure activité inhibitrice était contre *Staphylococcus sp* et *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 avec des zones d'inhibition significatives supérieures à 35mm (P_{valeur}=0,0057) lors l'utilisation de l'extrait éthanolique de thym. La concentration minimale inhibitrice CMI de l'extrait éthanolique de *T.vulgaris* est la plus faible CMI (0.145mg/ml) suivi par la valeur de l'extrait éthanolique de gingembre (100mg/ml) et l'extrait de l'association (122.5 mg/ml). Et de là, l'effet antimicrobien a été modifié selon les solvants utilisés, l'éthanol s'est révélé être un bon solvant pour l'extraction des composés actifs antimicrobiens. Concernant l'évaluation de l'effet antimycobactérien des extraits, les résultats montrent que l'extrait éthanolique de thym a un pouvoir antimycobactérien énorme ce qui a été confirmé par l'absence totale de colonies de *Mycobacterium tuberculosis* à la surface de tube contenant cet extrait.

Mots clés : *Thymus vulgaris, Zingiber officinale, antimicrobien, antimycobactérien,*

Abstract

The aim of this study was to determine and evaluate the antimicrobial activity of *Zingiber officinale* and *Thymus vulgaris* extracts. These extracts were prepared by using four solvents of different polarities; Acetone, Ethanol, and 70% of these solvents with 30% distillated water. The antimicrobial effect of ginger, thyme and their associations was evaluated *in vitro* against 23 referenced microbial strains using the disc diffusion and agar dilution methods. Moreover, 200µl (0.2ml) of each extract was poured on the surface of lowenstein-jensen medium in order to determine the antimycobacterial activity of these plants. The results indicated that the greatest extraction yield was obtained by the 70% acetonic ginger extract with 97.20%. In addition, ginger and thyme extracts showed an antimicrobial activity against all microorganisms tested, the highest activity was against *staphylococcus sp* and *Listeria monocytogene*s ATCC 15313 with significant inhibition zones greater than 35 mm (P value = 0.0057) when thyme ethanolic extract was used. The minimum inhibitory concentration MIC of *T. vulgaris* ethanolic extract is the lowest (0.145 mg/ml) followed by the MIC of ginger ethanolic extract (100 mg/ml) and their combination extract (122.5 mg/ ml). Thus, the extraction solvents had a significant effect on the antimicrobial activity, as ethanol was found to be a great solvent to extract antimicrobial compounds. As for the antimycobacterial effect, our results showed that the thyme ethanolic extract had a remarkable antimycobacterial effect which was confirmed by the total absence of *Mycobacterium tuberculosis* colonies on the surface of the tube that contains this extract.

Keywords: *Thymus vulgaris, Zingiber officinale, antimicrobial, antimycobactérial.*

الملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد و تقييم النشاط المضاد للبكتيريا و المضاد لبكتيريا السل لمستخلصات مستخرجة من بعض الأعشاب الطبية كالزنجبيل *Zingiber officinale* و الزعتر *Thymus vulgaris*. المستخلصات تم تحضيرها بواسطة أربعة مذيبات بقطبيات مختلفة، وهم الاسيتون و الايثانول في حالتهم النقية و 70% منهم بالاضافة الى 30% ماء مقطر. تم تقييم القوة المضادة للبكتيريا *in vitro* لمستخلص الزنجبيل، الزعتر و خليطهما على 23 من الكائنات الدقيقة ذات مرجع و تم هذا التقييم بواسطة طريقة انتشار الاقراص في الوسط الصلب و ايضا بطريقة التخفيف في الوسط السائل. و من ناحية اخرى، 200 ميكرولتر(0.2 مل) من كل مستخلص تم وضعه على الوجه الظاهرللوسطlowenstein-jensen وذلك لدراسة النشاط المضاد لبكتيريا السل. أظهرت النتائج ان مستخلص 70%الاسيتون للزنجبيل كان له افضل مردودية بنسبة 97.20%. في حين ان مستخلصات الزنجبيل و الزعتر اظهروا بعض النشاط المضاد للبكتيريا لجميع السلالات التي تمت دراستها، و كانت اكبر نسبة تثبيط لمستخلص الزعتر الاثانولي على *Staphylococcucus sp* و ATCC 15313 *Listeria monocytogenes* باقطار تثبيط معتبرة اكبر من35 مم (P_{valeur}=0.0057). قيم التركيزات الاصغر تثبيطا لنشاط البكتيريا CMI المتحصل عليها تباينت من مستخلص الى اخر، المستخلص الا يثانولي للزعتر T.vulgaris لديه قيمة ال CMI الاقل (0.145مغ/مل) تتبعه قيمة المستخلص الايثانولي للزنجبيل (100مغ/مل) و المستخلص الذي يجمعهما معا (122.5 مغ/مل). و من خلال هذا، نستنتج ان النشاط المثبط للبكتيريا يتغير حسب المذيب المستخدم، حيث ان الايثانول هو المذيب الافضل لاستخلاص المكونات الفعالة المضادة للبكتيريا. اما بالنسبة لتقيم المستخلصات المضادة لنشاط بكتيريا السل، اظهرت النتائج ان المستخلص الايثانولي للزعتر يحتوي على قوة هابلة مضادة لبكتيريا السل و التي اثبتت بواسطة الغياب التام لمستعمرات بكتيريا *Mycobacterium tuberculosis*على سطح اللانبوب الذي يحتوي على هذا المستخلص.

كلمات البحث : *zingiber officinale* ، *Thymus vulgaris*، ضد البكتيريا، مضاد لبكتيريا السل.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

Liste des figures xvi
Liste des tableaux xviii
Abréviation xix
INTRODUCTION 1
Les objectifs 2
Organisation de la thèse 3
CHAPITRE 1 4
Les Plantes médicinales et leurs effets pharmacologiques 4
1 Gingembre 4
1.1 Généralité sur gingembre 4
1.2 Composition chimique 5
1.3 Principales propriétés pharmacologiques du gingembre 6
1.3.1 Activité antimicrobienne 6
1.3.2 Les activités analgésiques et anti-inflammatoires 7
1.3.3 Activité anticancéreuse 7
1.3.4 Activité antioxydante 8
1.3.5 Autres utilisations 8
2 Thym 9
2.1 Généralité sur le thymus 9
2.2 Composition chimique 10
2.3 Pharmacologie de *Thymus Vulgaris* 12
2.3.1 Activité antioxydante 13
2.3.2 Activité antiinflammatoire 13
2.3.3 Activités antimicrobiennes 13
CHAPITRE 2 15
Activité antimicrobienne des plantes 15
1 Activité antimicrobienne des extraits 15
1.1 La composition chimique des extraits et leurs composants actifs 15
1.2 Mode d'action des extraits des plants 16
1.3 Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne 16
1.3.1 Méthodes de diffusion sur milieu solide 16
1.3.2 Détermination de la CMI 17
1.4 Les paramètres influençant l'étude de l'activité antimicrobienne 18
1.4.1 Diffusion des extraits des plants 18

1.4.2 La nature de microorganisme 18
CHAPITRE 3 19
PROCEDURE EXPERIMENTALE 19
1 Matériels 19
1.1 Les équipements et les produits utilisés 19
1.2 Matériel végétal : 20
2 Extraction de l'oléorésine par des solvants : 21
2.1 Préparation des émulsions 22
2.2 Identification des composés chimiques par spectroscopie infrarouge 23
3 Les Souches indicatrices 24
4 L'activité antimicrobienne des extraits 26
4.1 Préparation d'inoculum 26
4.2 Préparation du milieu de culture 26
4.3 Activité antimicrobienne 26
4.4 Incubation et lecture 27
5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) 27
6 L'Effet antimycobacterien des extraits 28
7 Analyses statistiques 29
7.1 Présentation graphique par boîte à moustaches 29
7.1.1 Les informations graphiques retirées 30
CHAPITRE 4 19
RESULTATS ET DISCUSSION 31
1 Analyse physicochimique des extraits 31
1.1 Rendements des extraits 31
1.2 Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge 33
2 Etude de l'activité antibactérienne des extraits 35
2.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de gingembre 35
2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne de *thymus vulgaris* 42
2.3 Boite à Moustache, de l'action des extraits vis-à-vis 23 souche 47
2.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des associations : 48
2.5 Comparaison entre l'efficacité des extraits avec les antibiotiques 52
3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) 53
4 L'évaluation de l'activité mycobacterienne 56
CONCLUSION 58
BIBELIOGRAPHIE 60
ANNEXES 64

Liste des figures

Figure 1. 1 (a) La classification de la plante (b) Rhizome de gingembre 4

Figure 1. 2 la structure chimique des composées de gingembre Zingerone (1); gingerol (2); zingiberene (3); β-sesquiphellandrene (4); shogaol (5); bisabolene (α-form; 6); β-phellandrene (7); farnesene (8); 1,4-cineol (9); citral (10); camphene (11); 6-paradol (12); 6

Figure 1. 3 la plante et la classification de thymus Vulgaris (Victor Kurte)..... 9

Figure 1. 4 thymus vulgaris Frais et des branches sèches de la plante..... 10

Figure 1. 5 Principales constituent de T. vulgaris. Linalol (1), myrcene (2), camphor (3), borneol (4), β-pinene (5), β-caryophyllene (6), p-cymene (7), carvacrol (8), thymol (9),γ-terpinene (10), thymyl methyl ether (11), carvacryl methyl ether (12), limonene (13) 11

Figure 1. 6 Les constituent phénoliques de T. vulgaris. Rosmarinic acid (17), caffeic acid (18), gentisic acid (19), syringic acid (20), ferulic acid (21), apigenin (22), luteolin (23), cirsilineol (24), cirsimaritin (25), 5-desmethylnobiletin (26), 5-desmethylsine 12

Figure 2. 1 Schéma de la méthode des aromatogramme 17

Figure 2. 2 Schéma de la méthode des dilutions permettant la détermination de CMI..... 18

Figure 3. 1 présente les plantes utiliser : (a) Zingiber officinale (b) thymus vulgaris. 20

Figure 3. 2 les étapes de l'extraction (a) prise de poids, (b) macération, (c) filtration, (d) évaporation de solvant, (e) extrait de thymus et gingembre 21

Figure 3. 3 Les émulsions préparées à partir de l'extrait de gingembre (a) et de thymus (b). 22

Figure 3. 4 Les émulsions de l'association..... 22

Figure 3. 5 Spectrophotométrie IR (Laboratoire de Génie des procédés, UHB CHLEF)..... 23

Figure 3. 6 l'ensemencement de Mycobacteriuim tuberculosis humain. 28

Figure 3. 7 Représentation graphique de boxplot (boite à moustache). 29

Figure 3. 8 Les différents variables et leurs pourcentages 30

Figure 4. 1 Spectre infrarouge des extraits GE, TE, GETE 33

Figure 4. 2 Présente l'effet antimicrobien de l'extrait éthanolique de gingembre 37

Figure 4. 3 Présente l'effet antimicrobien de l'extrait acétonique gingembre. 38

Figure 4. 4 Présente l'effet de gingembre sur les bactéries gram+, Ecart type : barre noire .. 39

Figure 4. 5 Illustre effet de gingembre sur les bactéries gram-, Ecart type : barre noire 39

Figure 4. 6 présente effet de gingembre sur les souches fongique, Saccaro : S.cervisiae ATCC 19763 –Candida : C.albicans ATCC 10231. 40

Figure 4. 7 Présente l'effet de thym sur les bactéries gram+, Ecart type : barre noire 42

Figure 4. 8 Présente l'effet antimicrobien des extraits éthanolique et acétonique de thym. 1 :S.aureus ATCC43300- 2 :S.aureus ATCC25923- 3 :S.aureus ATCC29213-4 :S.aureus isolé- 5 :S.aureus ATCC6538-6 :S.epidermidis ATCC12228- 7:L.monocytogene ATCC15313-

8:E.feacal ATCC29212- 9 :E.feacalis ATCC65669-10 :B.subtilis isolé - 11:B.subtilis ATCC23857 – 12 : B.subtilis ATCC6631- 13 :B.amyloliquefaciens ATCC2350-14 :P.mirabilis isolé- 15 :E.coli ATCC25922- 16 :E.coli ATCC25622 -17 :E.coli isolé- 18 :E.coli ATCC11150-19 :P.aeruginosa ATCC9027- 20 :P.aeruginosa isolé- 21 :K.pneumoniae ATCC 4352-22 :C.albicans ATCC19763- 23 :S.cerevisiae ATCC19763. 43

Figure 4. 9 Illustre effet de thym sur les bactéries gram-, Ecart type : barre noire 44

Figure 4. 10 présente l'effet de thym sur les souches fongique, Saccaro : S.cervisiae ATCC 19763 –Candida : C.albicans ATCC 10231 45

Figure 4. 11 Présente l'effet moyen de différents extraits provient de thymus et de gingembre. 47

Figure 4. 12 Présente l'effet de l'association des extraits sur les bactéries gram+, ST :S.aureus ATCC 43300 – SB : S.aureus ATCC 25923 – S2: S.aureus 29213 – S3: S.aureus isolé – SF3 : S.aureus ATCC 6538– SE : S.epiderlidis ATCC 12228– LIS : L.monocytogene ATCC 153 15313– ECBE : E.feacalis ATCC 29212– ESF: E.feacalis ATCC 6569 –B1 : B.subtilis isolé – B2 :B.subtilis ATCC23857–B3 : B.subtilis ATCC6631– B4 : B.amyloliquefaciens ATCC23350. 48

Figure 4. 13 Présente l'effet antimicrobien des extraits des associations. 1 :TAGE 2 :TAGA 3 :TEGE 4 :TEGA 1 :S.aureus ATCC43300- 2 :S.aureus ATCC25923- 3 :S.aureus ATCC29213-4 :S.aureus isolé- 5 :S.aureus ATCC6538-6 :S.epidermidis ATCC12228- 7:L.monocytogene ATCC15313- 8:E.feacal ATCC29212- 9 :E.feacalis ATCC65669-10 :B.subtilis isolé - 11:B.subtilis ATCC23857 – 12 : B.subtilis ATCC6631- 13 :B.amyloliquefaciens ATCC2350-14 :P.mirabilis isolé- 15 :E.coli ATCC25922- 16 :E.coli ATCC25622 -17 :E.coli isolé-18 :E.coli ATCC11150-19 :P.aeruginosa ATCC9027- 20 :P.aeruginosa isolé-21 :K.pneumoniae ATCC 4352- 22 :C.albicans ATCC19763- 23 :S.cerevisiae ATCC19763. 49

Figure 4. 14 iIllustre effet de l'association sur les bactéries gram- U : P.mirabilis isolé –Pseudo f : p.aerogenosae ATCC 9027– Pseudo : p.aerogenosae isolé – E1 : E.coli ATCC25922 – E2 : E.coli ATCC25622 –E3: E.coli isolé – E4F: E.coli ATCC4352–KLB: K.pneumoniae ATCC 9027 50

Figure 4. 15 présente effet de l'association des extraits sur les souches fongique, Saccaro : S.cervisiae ATCC 19763 –Candida : C.albicans ATCC 10231 51

Figure 4. 16 Présente l'effet moyen de différents extraits de l'association de Z.officinale et T.vulgaris..... 51

Figure 4. 17 Détermination de la CMI de l'extrait de gingembre (a)B.subtilis ATCC6631, b) S.aureus ATCC 6538(c), L.monocytogene ATCC 15313 et (d) S.aureus ATCC 43300..... 54

Figure 4. 18 Détermination de la CMI de l'extrait de thym (a) L.monocytogene ATCC 15313, (b) B.subtilis ATCC6631, (c) S.aureus ATCC 6538, et (d) S.aureus ATCC 43300..... 54

Figure 4. 19 Détermination de la CMI de l'extrait de l'association (a) B.subtilis ATCC6631, (b) S.aureus ATCC 6538, (c) L.monocytogene ATCC 15313 et (d) S.aureus ATCC 43300.. 55

Figure 4. 20 évaluation de l'activité antimycobacterienne. (a) ensemencement de prélèvement N°1. (d) zoom de prélèvement N°1. Tube1: prélèvement de patient. Tube2: tube non ensemencé. Tube3:Témoin. Tube4:GE. Tube5:TE. Tube6: TEGE. (b) ensemencement de prélèvement N°2. (c) zoom de prélèvement N°2. Tube1: prélèvement de patient. Tube2: tube non ensemencé. Tube3:Témoin. Tube4:TE. Tube5:GE. Tube6: TEGE. 57

Liste des tableaux

Tableau 3. 1 Les produits utilisés. 20
Tableau 3. 2 Les souches microbiennes utilisées 25

Tableau 4. 1 présente les rendements obtenus. 31
Tableau 4. 2 Résultats de l'IR. 34
Tableau 4. 3 l'effet antimicrobien des extraits 36
Tableau 4. 4 Présente les différentes probabilités d'association. 48
Tableau 4. 5 Présente les valeurs de CMI de Z.officinal. 53
Tableau 4. 6 présente les valeurs de CMI de T.vulgaris . 53
Tableau 4. 7 Présente les valeurs de CMI de l'association de thym, et de gingembre. 53

Abréviation

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la mèticiline.

FDA : Food and drog administration.

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations /L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

COX : Une cyclo-oxygénase.

SOD : superoxyde dismutase.

GPX : glutathion peroxydase.

GST : S-transférase de glutathion.

CPF : l'insecticide chlorpyrifos.

MPO : enzyme myélopéroxydase.

NO : monoxyde d'azote.

TNF- α : Le facteur de nécrose tumorale.

IL-1β / IL-6 / IL10: *Interleukin-1*. *Interleukin*-6, *Interleukin* 10

ARNm : L'acide ribonucléique messager.

CMI : concentration minimal inhibitrice.

HE : huile essentielle.

DMSO: Le dimethyl sulfoxide.

UV: ultra violet.

RE : *Rotary Evaporator*.

ML : millilitre.

IR : inftra rouge.

µM : micro mitre.

ATCC: American Type Culture Collection.

DSP: laboratoire de bactériologie d'établissement public de santé de proximité Médéa.

°C : celsius.

Nm: nano –mètre.

G: gram.

Mg: milligramme.

H : heure.

MH : Muller Hinton.

NCCLS : Comité National des Normes pour Laboratoires Cliniques.

SB : Sabouraud.

µL : micro litre.

µg : micro gramme.

Mm : millimètre.

UFC : unité formant colonie.

LPS : lipopolysaccharides.

ATP : adénosine triphosphate.

GA : extrait acètonique de *Zingiber officinal.*

TA : extrait acètonique de *Tymus vulgaris.*

GE : extrait ethanolique de *Zingiber officinal.*

TE : extrait ethanolique de *Thymus vulgaris*.

TEE : extrait ethanolique/eau de *Thymus vulgaris.*

GEE : extrait ethanolique/eau de *Zingiber officinal.*

GAE : extrait acètonique/eau de *Zingiber officinal.*

TAE extrait acètonique/eau de *Tymus vulgaris.*

TEGE : extrait ethanolique de *Thymus vulgaris* + extrait ethanolique de *Zingiber officinal.*

TAGA : extrait acètonique de *Tymus vulgaris* + extrait acètonique de *Zingiber officinal.*

TAGE : exttrait ethanolique de *Thymus vulgaris* + extrait acètonique de *Zingiber officinal.*

TEGA : extrait ethanolique de *Thymus vulgaris* + extrait acètonique de *Zingiber officinal.*

ANOVA : analysis of variance.

M: médiane.

Q1 ; premier quartile.

Q2 : deuxième quartile.

Q 3 : troisième quartile.

P : la probabilité de faire une erreur.

AMC : Amoxicilline.

GEN : Gentamicine.

CEF : Cèfazoline.

FLU : Fluconazol

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La résistance microbienne aux agents antimicrobiens apparaît de nos jours comme une des préoccupations majeures de santé publique. Les bactéries pathogènes sont à l'origine de diverses pathologies et intoxication alimentaires. L'émergence et la dissémination de souches bactériennes résistantes résultent de l'usage anarchique et abusif des antibiotiques (Kang C. *et al.* 2011).

Les bactéries de gram positives telles que *Staphylococcus aureus* sont les causes majeures des infections nosocomiales, elle présente de 10% d'infections graves. Cette bactérie est également responsable de syndrome de choc toxique, l'endocardite, d'ostéomyélite ou de l'intoxication alimentaire (Laughton, 2006). Liu, (2011) a indiqué que 64% des infections nosocomiales étaient associés avec *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), et seulement 17 % des patients infectés par MRSA ont reçu un traitement efficace. De plus, les bactéries de gram négatives comme *Klebsiella pneumoniae* est couramment liés aux infections des voies urinaires ou respiratoires, provoquant une pneumonie, des infections vésicales, ou des infections des reins (Cano V *et al*. 2009).

Parmi les bactéries responsables aux maladies les plus contagieuses, on cite *Mycobacterium tuberculosis* qui provoque la tuberculose. C'est une maladie qui touche le plus souvent les poumons. Elle se transmet lors de l'expectoration de gouttelettes de sécrétions bronchiques par des personnes atteintes de la tuberculose (Perriot *et al.* 2010). Cette maladie reste une préoccupation mondiale, avec 8 millions de personnes atteintes chaque année et 2 millions de décès. En Algérie, 22389 cas de tuberculose, dont 7964 cas de tuberculoses pulmonaires et 14 425 cas de tuberculoses extra-pulmonaires, ont été recensés par les services sanitaires durant l'année 2016. Les plus forts taux sont observés à Oran, Blida, Médéa, Mostaganem et Relizane, selon les statistiques fournies par les Services de la Direction de Santé Publique (Gassem, 2016).

Bien que les antibiotiques de première ligne sont suffisants pour traiter la plupart des patients infectés par des souches de *Mycobacterium tuberculosis,* mais le taux de l'efficacité de traitement a été diminuer ces dernières années en raison de l'apparition des souches résistantes aux traitements conventionnels, ceux que l'on appelle des souches multi-résistantes (Ettehad D *et al.* 2012).

Malheureusement, ces bactéries et beaucoup d'autres micro-organismes ont développé une résistance aux divers antibiotiques utilisés dans le traitement des infections graves. Ce qui a obligé les chercheurs à explorer des nouvelles substances antimicrobiennes provenant de diverse source comme des nouveaux agents inhibitrices. Les récents rapports ont décrit le rôle des plantes médicinales la prévention et le traitement de nombreuses infections (Liu Q. *et al.* 2017).

L'utilisation des plantes médicinales pour prévenir ou guérir des maladies était une des premières pratiques thérapeutiques dans l'histoire de l'humanité (Eddouks *et al*. 2007). De nombreuses plantes telles que le gingembre et le thym ont été utilisées pour traiter les maladies infectieuses, vu qu'elles possèdent des propriétés antimicrobiennes contre les champignons et les bactéries pathogènes (Banerjee, A *et al.* 1999, Lai P *et al.* 2004). De plus, les métabolites secondaires de ces plantes sont connus comme des agents inhibiteurs sans effets secondaires (Nabavi S. *et al.* 2015). Par conséquent, ces plantes pourraient être utilisées pour découvrir et développer de nouveaux agents antimicrobiens contre les microorganismes pathogènes.

Les objectifs

Ce travail consiste principalement à étudier l'activité antimicrobienne des extraits provient de gingembre et de thym contre 23 souches pathogènes, le travail consiste à :

- L'extraction des oléorésines de *Zingiber officinal* et de *Thymus vulgaris* par des solvants différents.
- l'étude de l'activité antimicrobienne de *Zingiber officinal,* de *Thymus vulgaris* et leurs associations vis-à-vis les souches pathogènes.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices CMI de ces extraits.
- L'étude de l'activité antimycobactérienne de ces extraits contre deux souches isolées de *Mycobacterium tuberculosis.*

Organisation de mémoire

Notre manuscrit est structuré en cinq parties, le premier est consacré à une introduction générale. La seconde partie est une synthèse bibliographique présente un aperçu sur les plantes médicinales étudiées, leurs compositions chimiques et leurs propriétés pharmacologiques, finalement on a examiné les différents méthodes utilisées pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits des plantes.

La troisième partie du manuscrit présente le matériel et les méthodes mis en œuvre dans le cadre de la réalisation de ce travail. Les résultats obtenus au cours de cette étude sont ensuite exposés dans la quatrième partie et sont discutés. Finalement, la dernière partie est une conclusion générale permet de récapituler les principaux résultats de ce travail avec une présentation des principales perspectives.

CHAPITRE 1

CHAPITRE 1

Les Plantes médicinales et leurs effets pharmacologiques

1 Gingembre

1.1 Généralité sur gingembre

Le terme de gingembre vient à l'origine du mot sanskrit " srngaveram ", qui signifie "en forme des bois du cerf". Les arabes l'ont appelé "zinjabil"/ "زنجبيل", traduit en français "gingembre", et le nom scientifiques de cette plante est *Zingiber officinale* (Brown *et al*. 2009). Le gingembre (*Zingiber officinalis*), est une plante herbacée vivace qui pousse jusqu'à une hauteur d'environ 1 m appartenant à la famille des zingibéracées (Braga *et al*. 2006).

Malgré que le gingembre est peu exigeant pour la qualité des sols. Il préfère cependant les zones ombragées et humides, aussi il a besoin d'une chaleur constante mais il a une large distribution à travers tropicale et les régions subtropicales du monde il est cultivé en Inde, en Chine, dans tout le sud-est asiatique (Indonésie, Philippine, etc.) ainsi qu'en Afrique (Nigeria), en en Jamaïque, comme plante annuelle (Iserin *et al.* 2001).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Zingiberidae
Ordre	Zingiberales
Famille	Zingiberaceae
Genre	*Zingiber*
Espèce	*Zingiber Officinale*

(a)



(b)

Figure 1. 1 (a) La classification de la plante (b) Rhizome de gingembre (Kuete V.2017)

Le rhizome est fréquemment utilisé comme condiment pour divers aliments et boissons (Basset *et al*. 2013). Il est utilisé soit frais, séché, ou comme l'extrait. Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux FDA ont classé le gingembre comme additif alimentaire (Chrubasik et *al*. 2005; Ali et *al.* 2008). Selon les statistiques 2012 de Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production mondiale de gingembre était de 2 095 056 tonnes, avec l'Inde, ayant 33% (703 000 tonnes) de la production mondiale, suivie par la Chine (environ 20%; 425 000 tonnes), le Népal (environ 12%; 255 208 tonnes), Nigéria et en Thaïlande (environ 7%; 156 000 et 150 000, respectivement), et l'Indonésie (environ 5%; 113 851 tonnes).

1.2 Composition chimique

La majorité des composants chimiques sont situés principalement dans le rhizome de gingembre qui est très riche en amidon, qui représente près de 60%, mais ils renferment également des protéines, des graisses, des huiles essentielles (Bruneton *et al*. 1999). Les rhizomes frais du gingembre contiennent aussi un mélange de zingerone, shogaols, paradols et gingérols responsables de son odeur et de sa saveur caractéristiques et le gout piquant (Bruneton *et al*. 1999).

D'autres constituants incluent, capsaïcine, gingediol, galanolactone, acide gingesulfonic, galactosylglycerols, gingerglycolipids, diarylheptanoids, Nera, monoacyldi-vitamines, et phytostérols (Chrubasik *et al.* 2005; Ali *et al.* 2008). L'oléorésine de gingembre est principalement composée de sesquiterpénoïdes avec zingiberene comme composant principal. Et d'autres composants terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes et alcools sesquiterpéniques) et de polyphenols, y compris les gingerodiones, gingersiols, dehydrogingerdiones et diarylheptanoids) (Koch *et al*. 2017).

Le composé Zingerone (1) est produit à partir de gingérols (2) pendant les processus de séchage ou de cuisson (McGee, 2004). Ces composés sont responsables de la sensation piquante chaude dans la bouche et sont également responsables de beaucoup des effets pharmacologiques de l'usine (Bruneton *et al*. 1999).

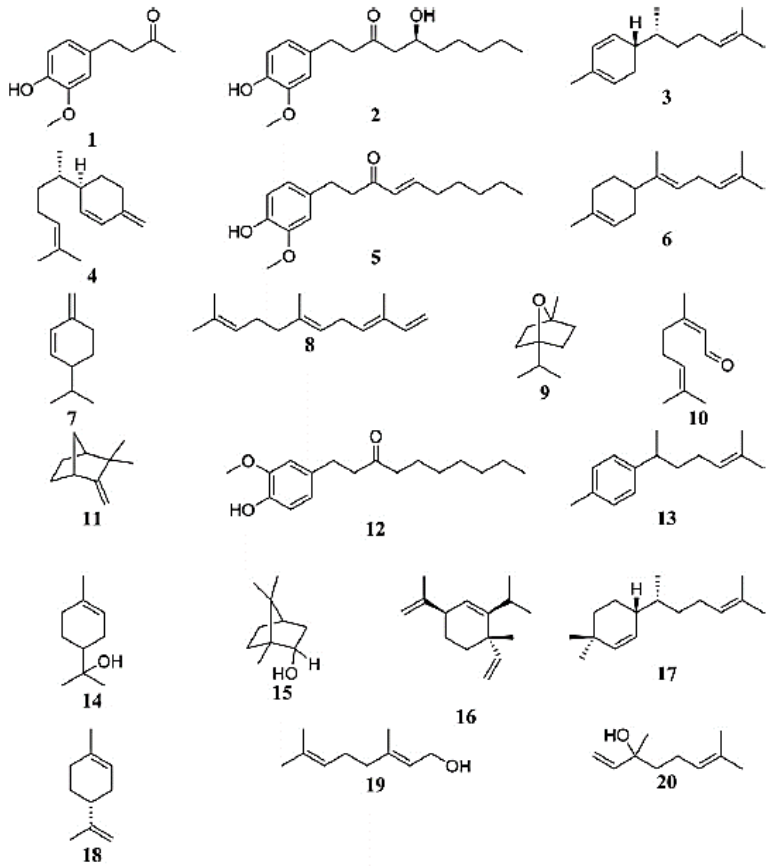


Figure 1. 2 la structure chimique des composées de gingembre Zingerone (1); gingerol (2); zingiberene (3); β-sesquiphellandrene (4); shogaol (5); bisabolene (α-form; 6); β-phellandrene (7); farnesene (8); 1,4-cineol (9); citral (10); camphene (11); 6-paradol (12);

La proportion de chaque composant dans un échantillon de gingembre dépend du pays d'origine, du processeur commercial, la nature de gingembre et la méthode de l'extraction (Packer *et al*.2008, Ali *et al.* 2008, Koch *et al*. 2017).

1.3 Principales propriétés pharmacologiques du gingembre

De nombreuses recherches scientifiques ont documenté le potentiel biologique et pharmacologique de gingembre, y compris effet antibactérien, analgésique et anti-inflammatoire, antidiabétique, anti-tumorale, etc.

1.3.1 Activité antimicrobienne

Des travaux ont montré que l'extrait éthanolique du gingembre exerce une activité anti fongique et antibactérienne importantes notamment envers les bacilles (Ficker *et al.* 2003). Il a été montré également un effet inhibiteur significatif envers *Candidat albicans, Aspergillus*

niger (antifongique*), Bacillus subtilis et Pseudomonas sp* (antibactérien) (Wannissorna *et al.* 2005 ; Sabulal et *al.* 2006). De plus, l'extrait du gingembre réduit la concentration minimale inhibitrice des aminoglycosides chez les entérocoques résistants à la vancomycine. Ainsi, L'huile essentielle du gingembre a montré aussi un effet contre le virus de l'herpès (Koch *et al.* 2008). Une protéine isolée à partir du rhizome de gingembre a montré un effet inhibiteur envers différents champignons comme *Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, Mycosphaerella, arachidicola,* et *Physalospora piricola* (Wang et T.B Ng, 2005).

1.3.2 Les activités analgésiques et anti-inflammatoires

Les effets analgésiques et anti-inflammatoires du gingembre et de ses constituants ont été Signalés, la consommation de 2 g/jour de gingembre capable de réduire la douleur musculaire résultant de la course prolongée, particulièrement s'il est pris pour un minimum de 5 jours (Wilson, 2015).

Les composés de gingembre ont également démontré un effet anti-inflammatoire chez des modèles de souris et de rats, à titre d'exemple : une étude établit sur un modèle de souris a monté que le gingembre inhibe l'inflammation des poumons induite par les allergènes en réduisant l'éosinophilie des voies respiratoires et les cytokines de la voie Th2 (Louise *et al.* 2008).

Le composé 8-Paradol, un constituant naturel de gingembre, a été trouvé le plus puissant inhibiteur de la COX-1. Administration intrapéritonéale de 6-Gingerol (25 – 50 mg/kg) a provoqué une inhibition de l'acide acétique (Young *et al.* 2005). Également 6-Gingerol (50–100 mg/kg) a provoqué une inhibition de l'œdème de la patte induite par carraghénane (Young *et al.* 2005)

1.3.3 Activité anticancéreuse

L'efficacité du gingembre dans la prévention ou la suppression de la croissance tumorale a été examinée chez des modèles de rats et souris mais également sur des lignées cellulaires humaines dans différents types de cancer, y compris le lymphome (Rubila & Ranganathan 2016), l'hépatome (Hanim *et al*. 2008, Weng *et al.* 2012), le cancer colorectal (Jessica Citronberg *et al* 12014, Zick *et al*. 2014), le cancer du sein (Ling *et al.* 2010), le cancer de la peau (Cojocaru SI *et al* G 2015), et pleines d'autres variétés de cancer.

Les principaux composants de *Z.officinale,* 6-shogaol et 6-Gingerol ont montré un effet antiproliférant sur plusieurs lignées de cellules tumorales, l'extrait de gingembre à une activité

anticancéreuse puissante contre les cellules cancéreuses pancréatiques. En fait, l'extrait éthanolique du gingembre a supprimé la progression du cycle cellulaire par conséquent, il provoqué la mort de cellules cancéreuses du pancréas (Akimoto *et al.* 2015).

1.3.4 Activité anti-oxydante

Un des mécanismes les plus importants pour expliquer les bienfaits du gingembre est associé à ses propriétés antioxydantes, Le gingembre est aussi efficace que l'acide ascorbique comme antioxydant. Dans un modèle de rats ou l'altération de la fonction hépatique et rénal a était induite par un pesticide 'Carbendazime', le gingembre a rétablit efficacement les paramètres hématologiques et les structures et fonctions des tissus étudiés par un mécanisme impliquant l'inhibition de la peroxydation lipidique et l'augmentation des systèmes de défense antioxydants (Mariama S *et al.* 2015).

D'autres résultat montrent que l'extraits de gingembre riche en 6-gingerol a amélioré les activités des enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPX) et la S-transférase de glutathion (GST) ainsi que le glutathion (GSH) dans le cerveau, l'ovaire et l'utérus de rats exposés à l'insecticide chlorpyrifos (CPF) ,tout en empêchant les élévations induites par le CPF du niveau de NO et de l'activité de l'enzyme myélopéroxydase (MPO) .

1.3.5 Autres utilisations

Le gingembre a une activité hypoglycémiante, il baisse la glycémie et permet une meilleur résistance à l'insuline, de ce fait il est conseillé pour les personnes diabétiques (Mobasseri *et al.* 2013; Mozaffari *et al.* 2014).

L'extrait de gingembre a montré un effet radio-protecteur chez les animaux de laboratoire (Jagetia *et al*. 2004) et sur des cellules cultivées in vitro (Manjeshwar Shrinath Baliga *et al* 2012). Ses effets sur le système nerveux ont également été étudiés démontrant qu'il peut être bénéfique dans le traitement de la démence, y compris la maladie d'Alzheimer (Packer *et al.* 2008).

En Asie, le gingembre est utilisé comme plante médicinale pour soigner les problèmes d'estomac et la diarrhée (Platel et Srinivazan, 2004). Ainsi, ils ont démontré que le gingembre était plus efficace que la vitamine B6 et aussi efficace qu'un traitement sur les nausées et les

vomissements pendant la grossesse. Cette propriété antiémétique s'est confirmée pour la prévention des patientes en chirurgie postopératoire (gynécologie, laparoscopie) (Gigon, 2012).

2 Thym

2.1 Généralité sur le thymus

Le nom du thym (en anglais *thyme)* vient du grec *thumos*, qui signifie « odeur » ou « parfumer » à cause de l'odeur agréable que la plante dégage (Pariente, 2001). Elle appartient à la famille des lamiacées qui est l'une des familles les plus utilisées comme source mondiales d'épices et d'extrait à fort pouvoir thérapeutique (Gherman *et al.* 2000, Hilan *et al.* 2006). Cette famille comprend près de 670 espèces regroupées dans environ 250 genres. (Hosseinzadeh *et al.* 2015).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	*Thymus*
Espèce	*Thymus vulgaris*

(a)



(b)

Figure 1. 3 la plante et la classification de *Thymus vulgaris* (Kurte V.2017)

Le thymus est une plante aromatique qui a une tige dressée, pouvant atteindre 40 cm de hauteur (Hosseinzadeh *et al*. 2015). Cette plante a une distribution mondiale se trouve dans toutes les zones tempérées d'hémisphère nord, il est cultivé dans la plupart des pays européens, tels que la France, l'Espagne, l'Italie, la Bulgarie, il est également bien cultivé dans plusieurs

pays africains (Hosseinzadeh *et al.* 2015) en Egypte, au Maroc, Algérie, Tunisie, Libye (Stahl-Biskup et Sáez, 2002), Cameroun (Nkouaya Mbanjo *et al.* 2007), au Nigéria (Kore et Ottawa, 2008) et en Afrique du Sud (Schmitz, 2015), et certaines parties de l'Asie. (Mebarki 2010).



Figure 1. 4 thymus vulgaris Frais et des branches sèches de la plante (Kuete V.2017).

En Algérie, il existe plusieurs espèces de thymus, environ 215 espèces y a compris le *thymus vulgaris* à michelet tizi ouzou, *Thymus algériensis* qui est endémique dans les régions montagneuses et dans le tell d'Algérie, *Thymus fontanesii* se trouve en Est Algérie-Tunisie, *Thymus pallidus* à constantine et dans le sous-secteur de L'Atlas Saharien et beaucoup d'autre espèces (Mebarki 2010).

2.2 Composition chimique

Les constituants phytochimiques du thym comprennent les phénols, les terpénoïdes, et surtout thymol, et les saponines (Elmir *et al*. 2014). L'huile essentielle de thym a montré une haute teneur en monoterpènes oxygénée (56,53%) et faible teneur en hydrocarbures monoterpènes (28,69%), les hydrocarbures sesquiterpène (5,04%) et les sesquiterpènes oxygénés (1,84%) (Reddy *et al*. 2014).

Le composé prédominant parmi les composants de extraits de thymus a été identifiés comme thymol (composé 9; 51,34%) tandis que la quantité de tous les autres composants était inférieur à 19%, par exemple terpinène (6,9 - 18,0 %),carvacrol (2,4 - 4,2 %), linalol (4,0 – 6,2 %) (Reddy et *al.* 2014). Les structures chimiques des principaux terpénoïdes de thymus sont présentées dans la figure 2.5 (Reddy *et al.* 2014).

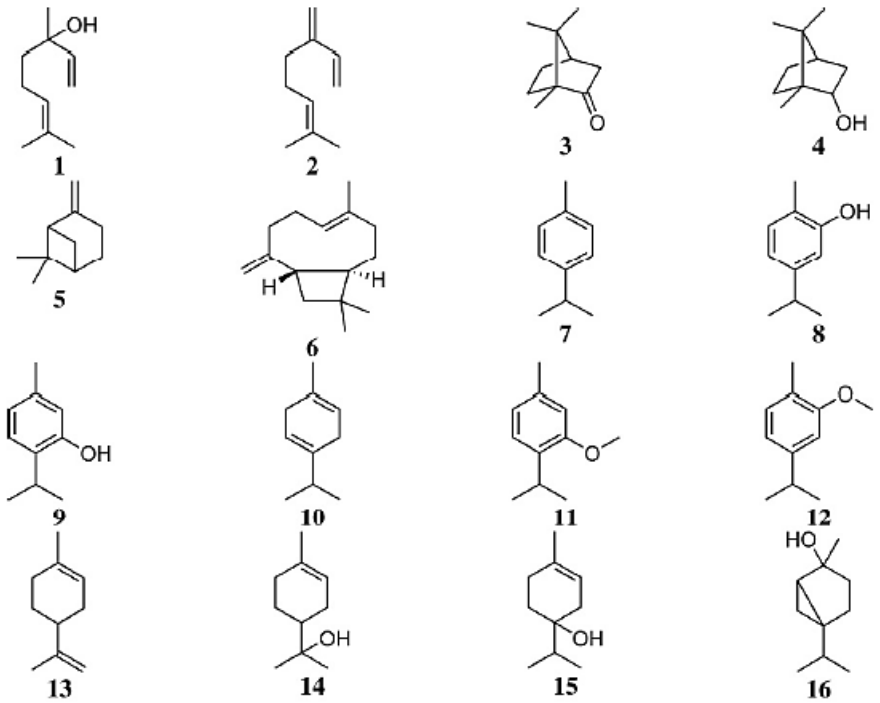


Figure 1. 5 Principales constituent de T. vulgaris. Linalol (1), myrcene (2), camphor (3), borneol (4), β-pinene (5), β-caryophyllene (6), p-cymene (7), carvacrol (8), thymol (9),γ-terpinene (10), thymyl methyl ether (11), carvacryl methyl ether (12), limonene (13)

L'un des ingrédients actifs de l'extrait de thym est le carvacrol. La présence de cette substance est confirmée par de nombreuses expériences de laboratoire et des recherches effectuées dans plusieurs universités aux États-Unis. L'autre ingrédient actif est le thymol. Ces deux substances chimiques agissent ensemble comme de puissants agents antibactériens, antifongiques, antiviraux et antiparasitaires (Stahl-Biskup and Venskutonis, 2012).

D'après (Kivilompoloet Hyotylainen, 2007; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012), une partie des principaux constituants d'extraits provient de thym contient également des phénols, tels que l'acide rosmarinique (17) qui contribuent à l'utilisation commerciale de l'herbe acide caffeic 18), Environ 25 différents flavonoïdes (Wang *et al*. 1998; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012; Vila, 2002) tels que apigénine (22), lutéoline (23) qui a un effet antimycobactérienne.

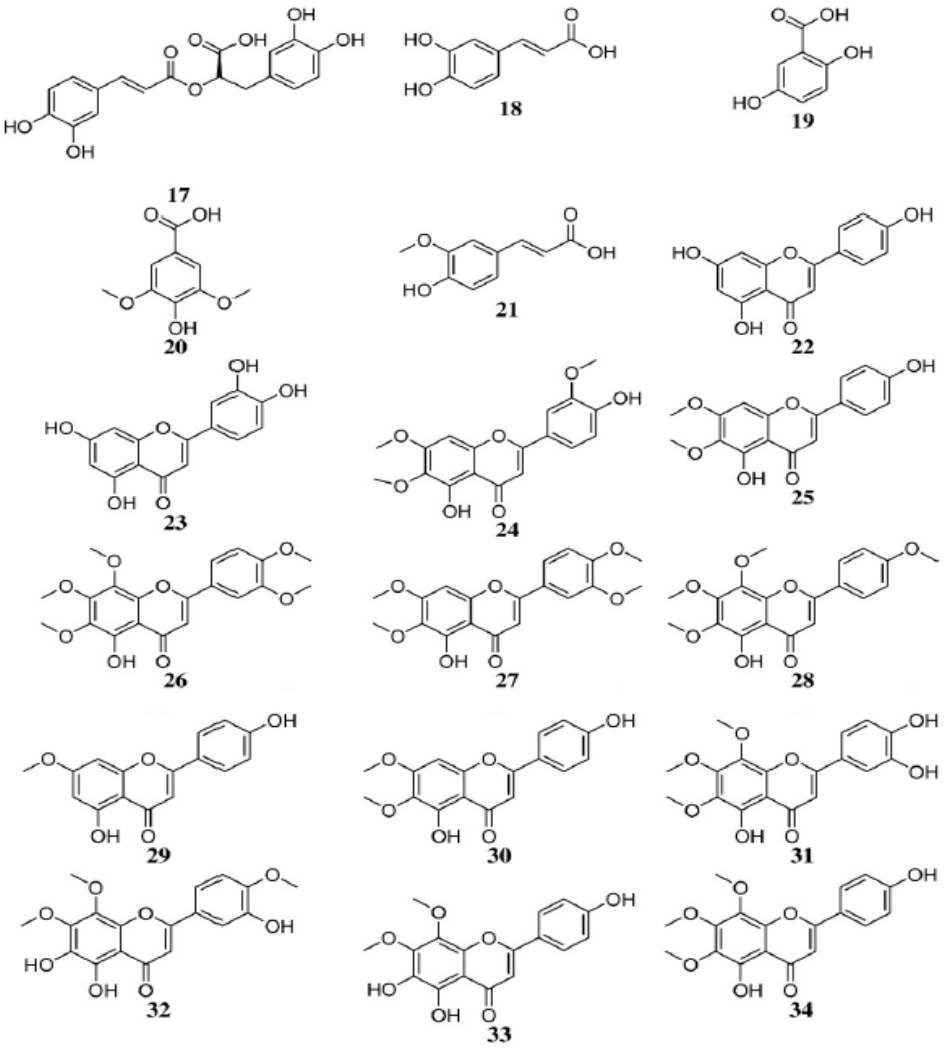


Figure 1. 6 Les constituent phénoliques de T. vulgaris. Rosmarinic acid (17), caffeic acid (18), gentisic acid (19), syringic acid (20), ferulic acid (21), apigenin (22), luteolin (23), cirsilineol (24), cirsimaritin (25), 5-desmethylnobiletin (26), 5-desmethylsine

2.3 Pharmacologie de *Thymus Vulgaris*

Le thym a été utilisé dans les industries alimentaires et aromatiques comme un exhausteur de saveur dans une grande variété d'aliments, de boissons et de produits de confiserie, ainsi que d'un agent de conservation des aliments, en raison de ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Outre ces effets, le thym présente une variété d'activités biologiques. (Zhou *et al.* 2014).

2.3.1 Activité anti-oxydante

Les composés phénoliques du thym ont une excellente activité antioxydante qui peut être supérieure à la bien connu hydroxytoluène hydroxy toluène et α-tocophérol antioxydants (Lee et Shibamoto, 2002). L'huile essentielle de thym a été rapporté pour avoir une capacité de piéger les radicaux libres pour l'oxydation lipidique (valeur de 18,6 μg/ml), il agit donc comme un agent antioxydant naturel (miladi *et al.* 2013, El-Nekeety *et al*. 2011).

2.3.2 Activité anti-inflammatoire

L'extrait de thymus a été rapporté pour son activité anti-inflammatoire. Il réduit la production et l'expression génique des médiateurs proinflammatoires, tels que les tumeurs le facteur de nécrose alpha (TNF-α), l'interleukine-1 bêta (IL-1β) et l'interleukine 6 (IL-6), et augmente l'expression de la cytokine anti-inflammatoire, interleukine-10 (IL10) (Ocana et Reglero, 2012). Selon Vigo *et al.* (2004) le thym a une activité antiinflammatoire par inhibition significative de l'oxyde nitrique (no) synthase expression de l'ARNm. Aussi ils ont également montré que l'extrait hydroalcoolisé du thym a un effet de modulateur d'exposition sur la douleur aiguë et chronique chez la souris (tallier *et al*. 2009).

2.3.3 Activités antimicrobiennes

Les plantes du genre *thymus* sont des herbes médicinales importantes, qui sont connues par leurs effets antimicrobiens, et sont aussi riches en différentes substances actives, telles que les composés 7 – 10 (Nadi *et al*. 2015). Diverses préparations, y compris les huiles essentielles, les extraits bruts, et les constituants de *T.vulgaris* ont été signalées pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales.

2.3.3.1 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'extrait de thym a été démontrée contre 14 isolats cliniques de *Staphyloccocus Escherichia coli, aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et d'autres souches bactériennes, telles que *Bacillus cereus, Klebsiella pneumoniae* (Tohidpour *et al.*2010). Ils ont trouvé que la concentration minimale inhibitrice (CMI) de 9,25 μg/ml contre *E. coli*, et 55,5 μg/ml contre *K. pneumoniae* et MIC les valeurs variaient de 18,5 à 37 μg/ml contre le *SARM.*

Sfeir *et al.* (2013) et Sienkiewicz *et al.* (2011) ont également signalé une forte activité antibactérienne des extraits de thym contre 120 souches appartenant aux genres *Staphylococcus, Enterococcus, Escherichia, Streptococcus* et *Pseudomonas.* D'autres travaux

ont montré que les souches cliniques et standard de *S. aureus* étaient très sensibles aux constituants du thymus, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, Carvon, camphène, 1,4-cineol, menthone, et terpinène (Abu-*et al*. 2012; Nadi *et al*. 2015).

2.3.3.2 Activité antifongique

Les extraits de thym ont été rapportés pour leurs effets antifongiques contre les champignons y compris les espèces d'Aspergillus, comme *a. oryzae, a. brasiliensis et a. flavus, a. flavus, a. parasiticus, a. ochracus, et Fusarium monilifor*me (Soliman et Badea, 2002; Kalemba et Kunicka, 2003; Manda et DebMandal, 2016).

Sacchetti *et al.* (2005) ont étudié l'activité de 11 huiles essentielles et les extraits éthanoliques sur des levures de pourritures alimentaires permet elles *candidat albicans* et *saccharomyces cervisiae* et les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de thymus est les plus efficaces sur ces levures. En plus, les effets de thym sur des différents levures et moisissures ont était décrits dans plusieurs études (Feng W *et al.* 2007), plus précisément (pinto et *al.* 2006) ont testé séparément l'activité des principaux composés des extraits de thymus le carvacrol, β cymène, γ terpinène sur *candida albicans* dont elles montrent une activité très importante de carvacrol.

2.3.3.3 Activité antivirale

L'extrait d'éthanol à 80% de *T. vulgaris* a une activité antivirale contre le virus herpès simplex 1 et 2, ainsi que contre les souches résistantes à l'acyclovir de l'herpès simplex virus 1 (Nolkemper *et al*. 2006). Rezatofighi (2014) a étudié l'effet antiviral contre la maladie de Newcastle appelée « pseudopeste aviaire », qui réduise la puissance virale de plus de 56 fois.

2.3.3.4 Activité antimycobactérienne

La tuberculose est la maladie épidémique la plus ancienne dans le monde. Environ, 1 million patients meurent chaque année et on estime que pour 2020, un milliard de personnes auront acquis la maladie, 200 millions pourrait le développer, et 70 millions mourront en raison de la tuberculose.

Selon (Jimenez-Arellanes *et al.* 2006) a permis d'évaluer environ 50 espèces de plante médicinale, dont sept inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*, et le *thymus vugaris* est l'un d'entre eux. Le *thymus vugaris* est utilisé pour traiter les maladies respiratoires et gastro-intestinales et récemment est utilisé pour inhiber la croissance *M. tuberculosis*. D'après Vikrant Arya *et al*. (2011) l'extrait et l'huile essentielle de *thymus vulgaris* ont un effet anti-mycobacterienne grâce à la présence de un composent phénolique qui est lutéoline.

CHAPITRE 2

Activité antimicrobienne des plantes

1 Activité antimicrobienne des extraits

Les effets antimicrobiens de différentes espèces d'herbes et de leur huiles essentielles (HE) sont connus depuis longtemps et mis à profit pour augmenter la durée de vie des aliments et pour lutter contre les bactéries qui peuvent être la cause de nombreuses maladies végétales et animales et des contaminations alimentaires ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux (Gachkar L *et al.* 2007 , Dimitrijevic S.L *et al.* 2007 ; Mata A.T *et al.* 2007 , oussala M *et al*. 2006 , Bakkali F *et al*. 2008).

L'aromathérapie est l'emploi thérapeutique des huiles essentielles vu que beaucoup de plantes aromatiques et leurs huiles essentielles montrent une activité antimicrobienne et pourraient empêcher la croissance des microorganismes d'altérations et pathogènes (Sacchetti *et al.* 2005; Souza *et al.* 2009).

1.1 La composition chimique des extraits et leurs composants actifs

L'activité antimicrobienne est liée directement à la structure chimique des extraits, en effet la majorité des composés comme (alcools, phénols, composés terpéniques et cétoniques) ayant un caractère lipophile et hydrophile (Kalemba et Kunicka, 2003) qui confère à l'huile essentielle leur propriété antimicrobienne.

De plus les composés phénolique comme le thymol, le carvacrol et l'eugènol sont les plus actives de fait que les huile essentielle riche en phénol comme les huile de thym et d'origan sont signalé comme ayant la plus haute activité antibactérienne selon plusieurs études (Nadia Zayyad *et al.* 2015 ; Mebarki *et al.* 2010**),** tandis que les aldéhydes et les cétones, sont également décrits aussi comme très actifs. Ainsi que de nombreuses huiles essentielles présentent une forte teneur en alcools comme α-terpinéol et en terpinène-4-ol est légèrement moins actifs que les composés phénoliques et carbonylés et leur activité antibactérienne est toutefois plus élevée que celle générée par les éthers, comme le 1,8 cinéole ou l'anéthole.

1.2 Mode d'action des extraits des plants

À cause de polymorphisme des huiles essentielles il n'existe pas un mécanisme d'action unique à l'activité antibactérienne (Carson *et al.* 2002), la lyposolubilitè des molécules des huiles essentielles permettre leur solubilité dans la membrane cytoplasmique de fait que elle peuvent induit une déstabilisation de la membrane plasmique et par la suite la modification de la perméabilité de la membrane plasmique et l'inhibition de certains 'activité enzymatique nécessaire à la métabolite bactérienne (Souza *et al.* 2013) qui enduit la mort de la cellule bactérienne (Burt. 2004).

1.3 Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Les méthodes d'évaluation utilisées donnent parfois des résultats différents selon les conditions expérimentales pour chaque manipulateur (Surk, 2003), les principaux méthodes d'évaluation de pouvoir antimicrobienne des extraits de plantes sont la méthode de diffusion en milieu gélosé et la méthode de dilution.

1.3.1 Méthodes de diffusion sur milieu solide

1.3.1.1 Aromatogramme

L'aromatogramme permet l'estimation qualitative de l'effet de l'huile essentielle. Elle consiste à utiliser des boites de Pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman, préalablement imprégnés de quantités connues d'HE, sont alors placés en surface de la gélose (Wilkinson, 2006; Traoré, 2006; kechkar, 2008), après incubation les bactéries se développent sur toute la surface de gélose sauf ou elles rencontrent une concentration d'HE suffisante pour inhiber leur croissante. On observe ainsi autour des disques une zone circulaire indemne de colonies appelée une zone d'inhibition. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus la souche est sensible à l'HE. Plus elle est petit, plus la bactérie résistance à l'HE (Faucher et avril 2002).

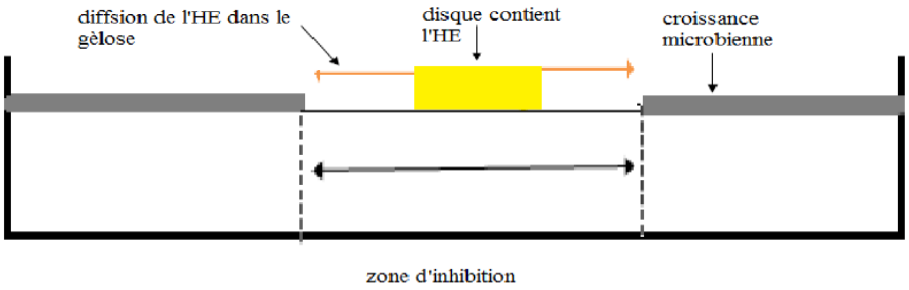


Figure 2. 1 Schéma de la méthode des aromatogramme (originale).

La sensibilité d'un germe est nulle pour un diamètre inférieur ou égale à 9 mm. La sensibilité est limitée pour un diamètre compris entre 9 et 13 mm. Elle est moyenne pour un diamètre entre 12 et 25 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 25 mm le germe est très sensible (Duraffourd *et al.* 1990).

1.3.1.2 Méthode des puits

C'est une autre méthode de diffusion sans disque consiste à découper un trou circulaire verticale dans la gélose et y verser une solution de l'extrait d'une concentration bien déterminer dans ces puits. L'HE diffuse radialement crée une zone d'inhibition circulaire à la surface de la gélose préalablement ensemencé avec la suspension bactérienne (Dorman et Deans 2000).

1.3.1.3 La méthode de dilution ou micro méthode

C'est une méthodes ou l'extrait à traiter est directement mélangé en concentration bien déterminé au milieu de culture solide et il est inoculé à un taux déterminer des microorganismes, après l'incubation on note la présence ou l'absence de culture (Giamperi *et al.* 2002).

1.3.2 Détermination de la CMI

La méthode de dilution en bouillon (liquide) est utilisée aussi pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices CMI, qui est définie par la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Oussou *et al.* 2008; Derwich *et al.* 2010).

Une gamme de dilution de l'extrait est additionnée à une série de tubes contenant un milieu de culture liquide de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions, la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observé dans le milieu (kechkar, 2008), et donc, plus l'extrait est dilué en restant inhibiteur de la croissance de microorganisme

plus il est puissant. La plus faible concentration qui inhibe la croissance est appelé concentration minimal inhibitrice « CMI » (Perry *et al*. 2004).

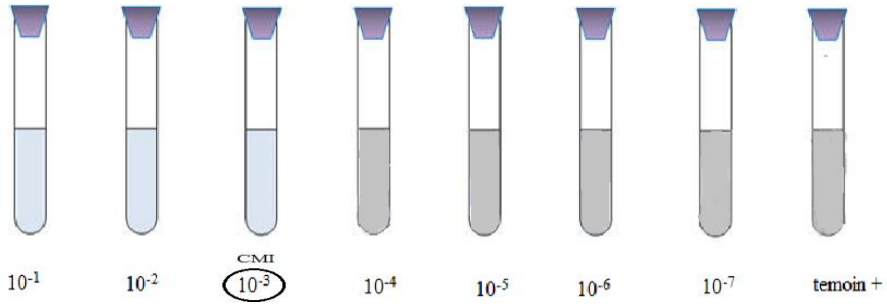


Figure 2. 2 Schéma de la méthode des dilutions permettant la détermination de CMI.

1.4 Les paramètres influençant l'étude de l'activité antimicrobienne

1.4.1 Diffusion des extraits des plants

Les méthodes de contact direct sont fiables pour les agents antimicrobiens hydrosolubles posent un problème de diffusion, d'homogénéité et de dispersion des extraits en raison de leurs très fiables solubilités dans les milieux de culture aqueux. A cause de cette dernière, des émulsifiants tels que, le Tween 80, le Tween 20 et l'éthanol sont souvent utilisés pour augmenter la solubilité des composés hydrophobes dans les milieux solides ou liquides (Suppakul *et al*. 2003). Le dimethyl sulfoxide (DMSO) est utilisé pour préparer des dilutions des extraits et d'huiles essentielles (Sacchetti *et al*. 2005). Il a été démontré qu'il ne possède pas d'activité antibactérienne (Gachkar *et al*. 2007).

1.4.2 La nature de microorganisme

En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des extraits des plants qui agissent aussi bien sur les bactéries gram positive que sur les bactéries gram négative. Toutefois, les bactéries gram négative paraissent moins sensibles à leurs actions et ceci est directement lié à la structure de leurs parois cellulaires (Burt, 2004). Il existe cependant quelques exceptions. Les bactéries gram négative comme *Campylobacter jejuni* a été décrite comme particulièrement sensible à l'action des extraits de plantes (Wannissorn *et al*. 2005). Par contre, les champignons montrent généralement une sensibilité supérieure par rapport aux bactéries (Cox *et al*. 2000)

CHAPITRE 3

CHAPITRE 3

PROCEDURE EXPERIMENTALE

Le présent travail consiste à étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales: le gingembre (*Zingiber officinale*) et le thym vulgaire (*Thymus vulgaris*). Ces plantes médicinales ont été choisies parmi tant d'autres pour leur caractère médicinal, leur grande utilisation par la population et leurs vertus thérapeutiques intéressantes.

1 Matériels

1.1 Les équipements et les produits utilisés

Cette étude est effectuée au laboratoire de la faculté des sciences au niveau de pole l'université de Médéa (lycée annexe); et pour réaliser cette expérience on a besoin du matériel suivants:

- Rotavapeur RE300 Cole-Parmer pour la séparation du solvant de l'extrait.
- Spectrophotomètre UV/visible type mini 1240 SHIMADZU utilisé pour la préparation des suspensions bactériennes selon les standards de McFarland.
- Plaque chauffante avec Agitation de type Stuart UC 152 utilisé pour la préparation des milieux de culture.
- Filtres stériles (whatman filter papers) de diamètre de 150mm utilisé pour la filtration de homogénat/filtrat et la solution.
- Pour l'utilisation microbiologique on a utilisé Vortex de type VELP.
- Autoclave pour la stérilisation des solutions et les milieux de cultures.
- Toutes les pesées sont effectuée à l'aide d'une Balance à précision de type Denver avec l'incertitude de d=0,1 mg.
- Etuve de type Memmert utilisé pour l'incubation des microorganismes, et le séchage de filtrat

- Les données sont traitées à l'aide d'Anova de logiciel python 3.6.

Les produits utilisés au cours de toutes les expériences sont consignés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3. 1 Les produits utilisés.

Produits			
Ethanol 96%	Tween 80%	Hektoen	Fluconazole
Acétone 95.6%	Mueller hinton	Chapman	Amoxicilline
Eau physiologique 0.9%	Sabouraud	Gélose nutritive	Gentamicine
Eau distillé	Lowenstein Jensen	MacConkey	Céfazoline

1.2 Matériel végétal :

Le matériel végétal utilisé dans cette étude a été procuré du marché local de Médéa, Algérie, qui est composé de :

- Echantillon 1: Des rhizomes de gingembre frais d'origine chinoise de l'espèce « *Zingiber officinale* ». Ces rhizomes ont été épluchés et coupés en petits morceaux, les mettre dans un mortier pour les broyer jusqu'à l'obtention d'un homogénat du gingembre.

- Echantillon 2: les feuilles de thym de l'espèce « *Thymus vulgaris* » d'origine de Médéa (Algérie).



Figure 3. 1 présente les plantes utiliser : (a) *Zingiber officinale* (b) *Thymus vulgaris*.

2 Extraction de l'oléorésine par des solvants :

Quatre systèmes de solvants ont été choisis séparément, acétone et éthanol à l'état pur et ces mêmes solvants à 70% et 30% de l'eau distillée dans le but de variée la polarité du solvant. L'extraction a été faite par une macération de 50g de plante dans 500ml de solvant pendant 24h dans un récipient fermé et à température ambiante. Après 24 h, la solution est filtrée par un filtre de 150mm diamètre, ensuite la séparation du solvant de l'extrait est faite à l'aide d'un appareil appelé Rotavapor « évaporateur rotatif ». Dans cet appareil, l'évaporation sous vide est réalisée en utilisant une pompe à vide avec une vanne de contrôle. Pendant l'évaporation le ballon est mis en rotation et plongé dans un bain liquide chauffé. L'appareil est muni d'un réfrigérant avec un ballon de récupération de condensat. La rotation du ballon crée une surface d'échange plus grande permettant donc d'effectuer une évaporation rapide. L'abaissement de la pression permet d'évaporer le solvant à température réduite à 40°C et l'extrait est récupéré en évitant ainsi la dégradation thermique éventuelle des composés extraits. Enfin l'extrait est conservé à 4 °C dans l'obscurité pour les analyses ultérieures.

L'opération est répétée deux fois afin d'épuiser la plante et le filtrat est séché à 40°C puis le pesé pour calculer le rendement de l'extraction R selon la formule détaillée ci- dessous :

Avec; R: Rendement

P_0: Poids initial.

P_1: Poids après extraction et séchage.

$$R\ (\%) = \frac{P_0 - P_1}{P_0}\ x\ 100$$

La procédure de l'extraction est illustrée dans la figure suivante.

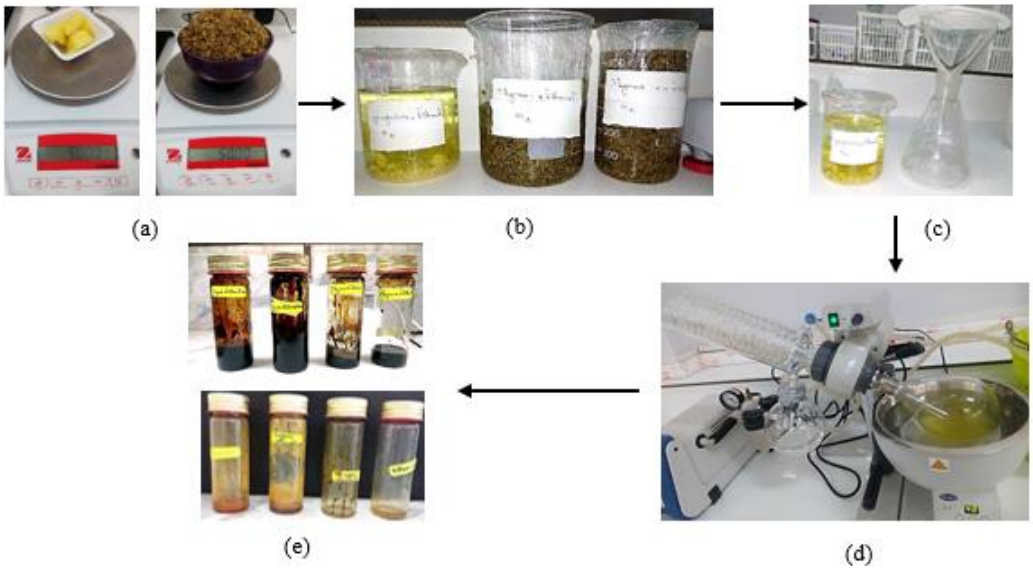


Figure 3. 2 les étapes de l'extraction (a) prise de poids, (b) macération, (c) filtration, (d) évaporation de solvant, (e) extrait de thymus et gingembre

2.1 Préparation des émulsions

Les extraits proviennent de gingembre sont utilisés directement vu que leurs fluidité permettant leurs diffusion.

En raison de la viscosité des extraits proviennent de thymus, Des émulsions ont été préparées à partir de ces derniers en ajoutant (1ml) de l'eau distillée et (0.1ml) d'un émulsionnant, le Tween 80, pour optimiser la fluidité et faciliter la diffusion de l'extrait.

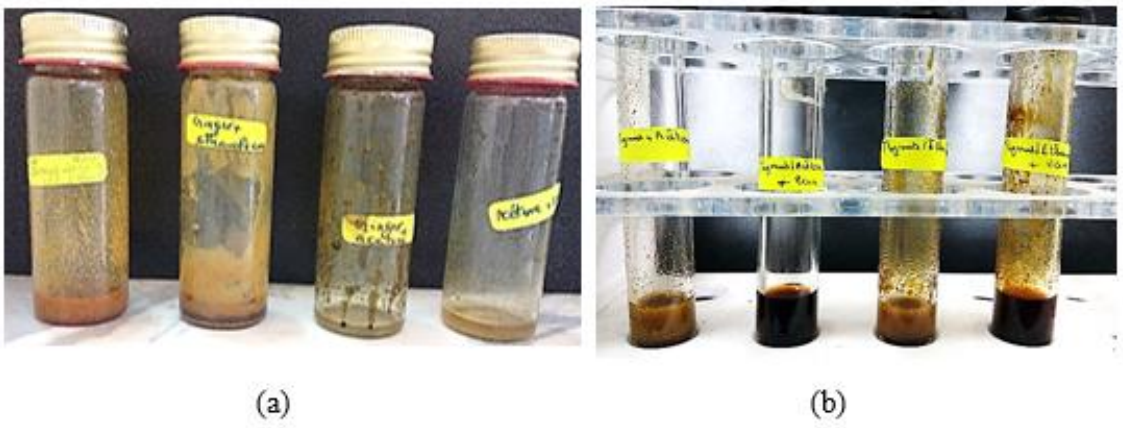


Figure 3. 3 Les extraits de gingembre (a) et les émulsions préparées à partir de thymus (b).

Pour tester l'effet antimicrobien de l'association entre *Zingiber officinale* et *thymus vulgaris,* on a préparé des émulsions qui sont un mélange entre les extraits éthanolique, acétonique pur déjà préparé, le choix de ces extraits revient à leurs efficacités par rapport aux autres.

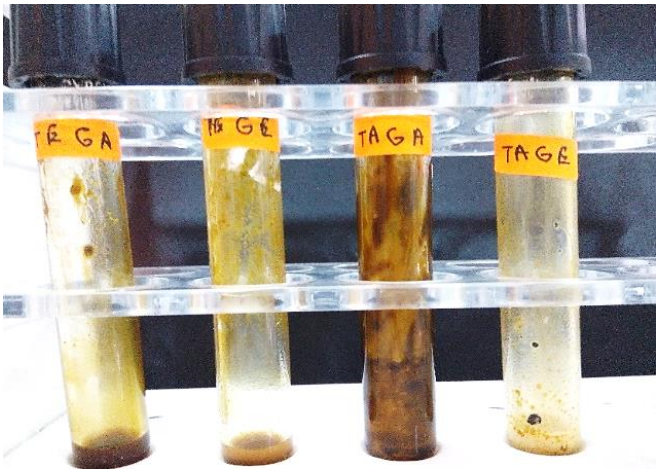


Figure 3. 4 Les émulsions de l'association

2.2 Identification des composés chimiques par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est un moyen de diagnostic permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule. En effet, l'expérience montre que certaines fréquences de vibration, dites « fréquences de groupe », sont caractéristiques de la présence d'un groupement chimique dans la molécule étudiée. Ainsi, la spectroscopie infrarouge est un très puissant moyen de caractérisation pour identifier des groupements moléculaires et obtenir de nombreuses informations microscopiques sur leur conformation et leurs éventuelles interactions (Keirsse J, 2003).



Figure 3. 5 Spectrophotométrie IR (Laboratoire de Génie des procédés, UHB CHLEF).

Les échantillons sont soumis à un rayonnement électromagnétique dans la gamme de longueur d'onde du centre infrarouge (2,5 µm < < 50 µm). Le champ électrique induit par l'onde électromagnétique peut interagir avec un moment dipolaire d'une entité moléculaire présente dans le matériau. Lorsque la fréquence de champ coïncide avec la fréquence de vibration d'un mode propre de la molécule, l'interaction créée engendre la vibration de certaines liaisons et l'absorption de l'énergie de l'onde excitatrice correspondante. La fréquence à laquelle est absorbé le rayonnement dépend de la nature des liaisons, de la masse des atomes concernés et de l'environnement proche du groupement considéré (Keirsse J, 2003).

3 Les Souches indicatrices

Au cours de cette étude, 25 souches microbiennes ont été utilisés, 18 souches proviennent de l'American Type Culture Collection ATCC :

- 7 souches ont été fournis de laboratoire d'analyse de Boumerdes : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ATCC 29213, *Bacillus subtilis ATCC23857, Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Entérocoques feacalis* ATCC 29212, *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23350 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.
- 3 souches ont été obtenues de laboratoire d'ain defla : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Entérocoques feacalis* ATCC 6569.
- 8 souches ont été fournies de laboratoire de recherche de l'université Hassiba Ben Bouali de Chlef: *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Bacillus subtilis* ATCC6631, *staphylococcus epidermidis ATCC* 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *Escherichia coli* ATCC11150, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Candida albicans* ATCC10231 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763.

Ainsi que 7 souches isoler qui sont :

- 5 souches bactériennes isolées des prélèvements humains et identifiées au niveau du laboratoire de bactériologie d'établissement public de santé de proximité Médéa, DSP : *staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, proteus mirabilis, Bacillus subtilis*
- deux (2) souches mycobacteriennes isolées de crachat humaine et identifiées au niveau de service de contrôle de la tuberculose et des maladies respiratoire zoubayria- Médéa : *mycobacterium tuberculosis*

Tous ces microorganismes sont pathogènes avec des potentialités différentes selon le type d'infections provoquées et sont responsables d'infections nosocomiales et résistantes aux antibiotiques, ce qui a motivé leur choix.

Les milieux de culture des souches, leurs grams, leurs températures d'incubation et leurs codes utilisés sont présents dans le tableau suivant.

Tableau 3. 2 Les souches microbiennes utilisées

num	**microorganismes**	**Code**	**Gram**	**milieux de culture**	**températures d'incubation**
1	*Staphylococcus aureus* ATCC 43300	St	+	Gélose Chapman	37 ºC
2	*Staphylococcus aureus* ATCC 25923	Sb	+	Chapman	37 ºC
3	*Staphylococcus aureus* ATCC 29213	SA2	+	Chapman	37 ºC
4	*Staphylococcus aureus* isolé	SA3	+	Chapman	37 ºC
5	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538	SAf	+	Chapman	37 ºC
6	*Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228	SE	+	Chapman	37 ºC
7	*Listeria monocytogene* ATCC 15313	Lis	+	Gélose Nutritif	37 ºC
8	*Entérocoques feacalis* ATCC 29212	ECBC	+	Gélose Nutritif	37 ºC
9	*Entérocoques feacalis* ATCC 6569	EsF	+	Gélose Nutritif	37 ºC
10	*Bacillus subtilis* isolé	B1	+	Gélose Nutritif	37 ºC
11	*Bacillus subtilis* ATCC23857	B2	+	Gélose Nutritif	37 ºC
12	*Bacillus subtilis* ATCC6631	B3	+	Gélose Nutritif	37 ºC
13	*Bacillus amyloliquefaciens* ATCC23350	B4	+	Gélose Nutritif	37 ºC
14	*proteus mirabilis* isolé	u	-	Hektoen	37 ºC
15	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027	Pseudo F	-	MacConkey	37 ºC
16	*Pseudomonas aeruginosa* isolé	Pseudo	-	MacConkey	37 ºC
17	*Escherichia coli* ATCC 25922	E1	-	Hektoen	37 ºC
18	*Escherichia coli* ATCC 25622	E2	-	Hektoen	37 ºC
19	*Escherichia coli* isolé	E3	-	Hektoen	37 ºC
20	*Escherichia coli* ATCC11150	E4	-	Hektoen	37 ºC
21	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352	klb	-	Hektoen	37 ºC
22	*Saccharomyces cerevisiae* ATCC19763	SS		Sabouraud Agar	25 ºC
23	*Candida albicans* ATCC10231	Ca		Sabouraud Agar	25ºC

4 L'activité antimicrobienne des extraits

4.1 Préparation d'inoculum

La revivification des différentes espèces bactériennes est faite par passage successif sur gélose nutritive. Chaque espèce est ensemencée au préalable sur une gélose nutritive, pour obtenir une culture de 18 à 24 h. Ensuite, 4 à 5 colonies bactériennes bien isolées sont mises en suspension dans l'eau physiologique à 0,9 % NaCl. Puis cette suspension est ajustée au standard Mc Farland 0,5 à l'aide d'un spectrophotomètre, correspondant à une densité optique DO entre 0,08 à 0,1 lue à 625 nm, ce qui correspond à une suspension contenant environ de 10^8 bactéries/ ml et 10^4 levures/ml (Rodrigues *et al*. 2005).

4.2 Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture approprié à cette étude est le milieu Muller-Hinton préparé comme suit: 38 g de la gélose Muller-Hinton a été dissous dans un litre d'eau distillée, puis laissais le mélange bouillir avec une agitation jusqu'à dissolution complète, puis l'auto-claver pendant 20 minutes à 121°C.

4.3 Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne a été réalisée en utilisant la méthode de diffusion de disque sur le milieu gélose de Muller Hinton (MH) pour les souches bactériennes et Sabouraud (SB) pour les souches fongiques, cette méthode a été standardisée par le Comité National des Normes pour Laboratoires Cliniques (NCCLS) (Kiehlbauch *et al*. 2000).

L'ensemencement de ces deux milieux est réalisé par écouvillonnage, à l'aide d'un écouvillon stérile puis l'introduit dans la suspension microbienne et essoré contre la paroi interne du tube, en réalisant des stries parallèles et aussi serrées que possible à la surface d'une boite de Pétri préalablement coulée. L'opération est répétée trois fois en tournant la boité 60° et en tournant l'écouvillon sur lui-même.

Des disques de papier filtre, de 9 mm de diamètre, ont été séparément imprégnés de 30µg = 15 µl de chaque extrait testé (extraits préparés à partir de gingembre, de thym et leurs associations) déposés à la surface de la boite de Pétri ensemencée. un disque témoin d'antibiotique préparé a été appliqué sur les mêmes boites, Amoxicilline, Gentamicine et Céfazoline 30µg pour les souches bactériennes, et pour les souches fongiques Fluconazole, ces disques servi comme contrôle positif efficace contre les espèces microbiennes. (Rodrigues *et al.* 2005).

4.4 Incubation et lecture

Après 24 h d'incubation à 37°C pour les bactéries et à 48h d'incubation à 25°C pour les levures. La lecture de l'activité antimicrobienne a été évaluée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition de croissance en millimètres formée autour du disque (y a compris le diamètre du disque de 9 mm). Les manipulations sont répétées 3 fois pour chaque test**.** L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par Mutai *et al*. (2009) a été suivi. Ces derniers ont classé la substance testée selon le diamètre de la zone d'inhibition (D) de la croissance microbienne en cinq classes :

- Non inhibitrice: $D < 10$ mm
- Légèrement inhibitrice: $11\text{mm} \leq D \leq 16$ mm
- Modérément inhibitrice: $16\text{ mm} \leq D \leq 20$ mm
- Fortement inhibitrice: $21\text{ mm} \leq D \leq 29$ mm
- Très fortement inhibitrice: $D \geq 30$ mm

5 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait éthanolique de gingembre et thymus et leur association ont été déterminées selon la méthode de dilution en milieu liquide recommandée par NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) avec quelques modifications.

Les tests ont été réalisés dans le bouillon de Gélose nutritive contenant les extraits et du Tween 80 pour avoir une meilleure homogénéisation. Une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-11} a été

réalisées dans des tubes a essaie. Ensuite une suspension bactérienne de (0.1ml) avec une densité optique qui correspond à 10^8UFC/ml a été ajoutée dans les tubes.

Une série des témoins, contenant le milieu de culture, le tween 80 et la suspension bactérienne est également préparés. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures. La croissance bactérienne est indiquée par la présence d'un trouble dans la totalité du tube. Enfin, ces tubes vont être utilisés comme des inoculums pour ensemencer des boites de gélose par écouvillonnage pour confirmer la croissance ou l'absence de germe après 24h d'incubation.

6 L'Effet antimycobacterien des extraits

Cette partie a été réalisée au niveau de service de contrôle de la tuberculose et des maladies respiratoire à zoubayria- Médéa, sous la supervision et l'aide de chef service qui a accepté de manipuler à nos tours. En raison de manque de moyens et de la disponibilité d'une seule forme de milieu Lowenstein-jensen spécifique de *Mycobacteruim tuberculosis* dans des tubes a essaie, on était limité pour voir l'effet de nos extraits sur ce germe.

Les extraits utilisés au cours de cette étape de l'expérience sont: l'extrait éthanolique de *Zingiber officinale* (GE), l'extrait éthanolique de *thymus vulgaris* (TE), et leurs associations (TEGE). Le choix de ces extraits revient à leurs efficacités et leurs effets antimicrobiens. A l'aide d'une micropipette, 200µl (0.2ml) de l'extrait a été mis à la surface de milieu lowenstein-jensen, puis on a les laissé 24 h pour séché.

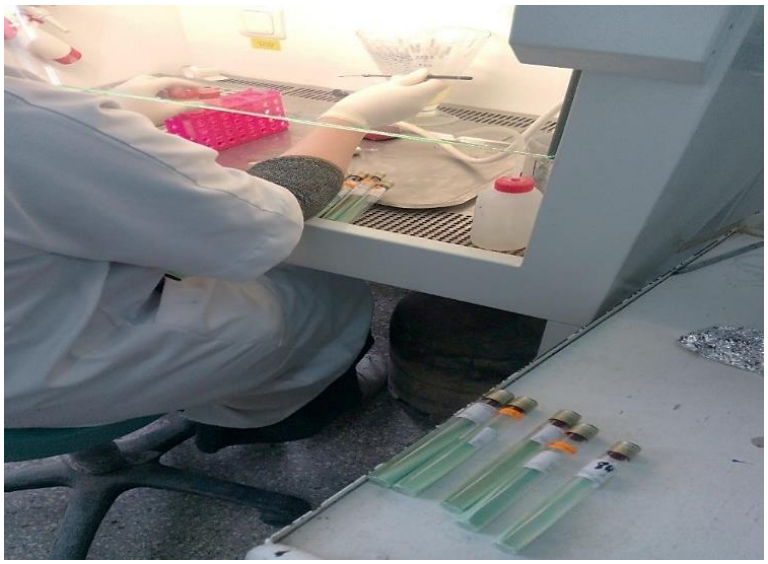


Figure 3. 6 l'ensemencement de *Mycobacteriuim tuberculosis* humain.

Deux souches de *Mycobacterium tuberculosis* prélevées de deux patients différents ont été ensemencées dans les milieux qui contenant nos extraits, et des milieux témoins ont été également ensemencés. Figure 3.5 présente cette étape.

Les tubes sont incubés inclinés et incomplètement vissés afin de permettre l'évaporation de l'excès de liquide de l'échantillon (48 heures à 37°C). Après ces 48h les tubes vont être fermés d'une façon étanche et sont soumis à 28 jours d'incubation. Après 28 jours d'incubation à 37°C. La lecture de l'effet antimycobacterien des extraits est indiqué par l'absence ou la présence des colonies lisses et crèmes sur les cultures jeunes, puis atteignent plus de 5 mm de diamètre et deviennent beiges, rugueuses, à bords irréguliers en chou-fleur**.**

7 Analyses statistiques

Les résultats des tests sont exprimés en moyenne ± SD. La différence entre le contrôle et les différents tests, est déterminée par l'analyse de la variance (ANOVA) univariée pour les comparaisons des moyennes et la détermination des taux de signification. Les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

La boîte à moustaches est une méthode efficace de présentation graphique de données numériques qu'on a calculées en utilisant python. Python est un programme d'analyse destinée à tracer et visualiser des données sous formes de graphiques (Lutz, M. (1996). Programming python (Vol. 8). O'Reilly Company).

7.1 Présentation graphique par boîte à moustaches

Les boîtes à « boxplot » permettent de visualiser et de comparer la distribution et la tendance centrale des valeurs numériques via leurs quartiles. Les quartiles servent à fractionner les valeurs numériques en quatre groupes égaux en fonction de cinq valeurs clés : minimum, premier quartile, médiane, troisième quartile et maximum.

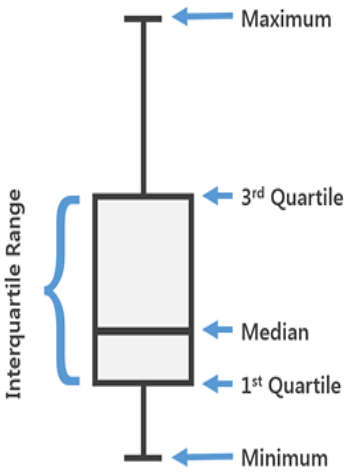


Figure 3. 7 Représentation graphique de boxplot (boite à moustache).

7.1.1 Les informations graphiques retirées

Nous pouvons avoir une idée de la tendance centrale des zones inhibitions de chaque extrait en observant la position de la médiane (M). La médiane permet de déterminer 50 % des zones d'inhibitions mesurées, c'est-à-dire si M est entre 10-20mm avec une valeur de 17mm, donc 50% des souches ont une zone d'inhibitions de 17mm.

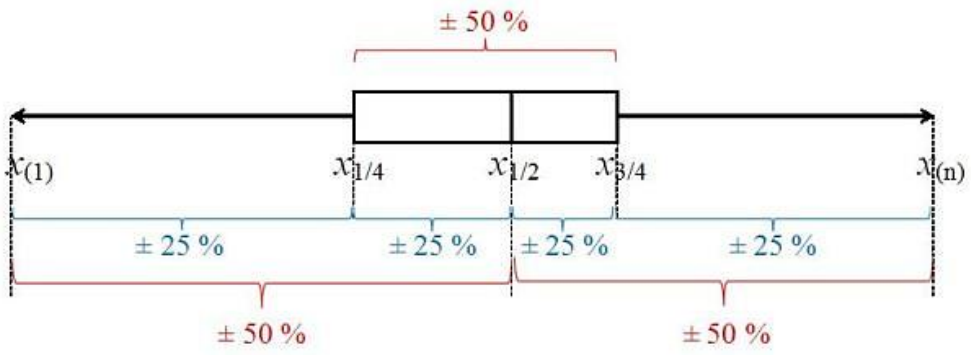


Figure 3. 8 Les différents variables et leurs pourcentages

La valeur du 1er quartile Q1 (25% des zones), correspondant au trait inférieur de la boîte, qui permet de déterminer 25 % des zones les plus faibles.

La valeur du 3ème quartile Q3 (75% des zones), correspondant au trait supérieur de la boîte, qui permet de déterminer 25 % des zones qui ont des valeurs supérieures à la médiane.

Les 2 « moustaches» inférieure et supérieure, représentées ici par les petits rectangles verticaux de part et d'autre de la boîte. Ces 2 moustaches, présentes les zones inhibitrices minimales et maximales de chaque extrait. Par exemple, si la valeur maximale égale à 36mm c'est-à-dire la plus grande zone d'inhibition de l'extrait est 36mm.

Ces variables nous permettent de déterminer le meilleur extrait avec une forte efficacité sur les 23 souches étudiées.

CHAPITRE 4

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Analyse physicochimique des extraits

1.1 Rendements des extraits

Les rendements moyens des extraits préparés ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la plante. Le tableau suivant illustre ces résultats.

Tableau 4. 1 présente les rendements obtenus.

Plante	Solvant	Poids initiale	Poids finale	Rendement
Z.officinale	Ethanol	50 g	04.81 g	90.38 %
	Ethanol+eau (70%+30%)	50 g	03.83 g	92.34 %
	Acétone	50 g	02.18 g	95.64 %
	Acétone+eau (70%+30%)	50 g	01.40 g	97.20 %
T.vulgarus	Ethanol	50 g	44.12 g	11.76 %
	Ethanol+eau (70%+30%)	50 g	38.42 g	23.16%
	Acétone	50 g	46.00 g	08.00%
	Acétone+eau (70%+30%)	50 g	41.66 g	16.68 %

Les échantillons de *T.vulgaris* ont fourni un taux de rendement de 11.76%, 8% lors de l'utilisation d'éthanol, acétone pur comme solvant successivement, ainsi que le rendement des extraits d'éthanol+eau (70%+30%) et acétone+eau (70%+30%) sont 23.16% et 16.68% respectivement.

Par contre, les échantillons de *Z.officinale* ont montré un taux plus élevé par rapport à celui obtenu à partir de *T.vulgaris* due à l'humidité de gingembre, vu que le rhizome contient 80% d'eau. Les rendements obtenus lors de utilisation d'éthanol, acétone pur sont respectivement

90.38%, 95.64%. Alors que le rendement de l'extrait d'éthanol+ eau (70%+30%) est 92.34 %, et celui d'acétone + eau (70%+30%) est 97.2 %.

Les rhizomes de Z.*officinale* et les feuilles de *T.vulgaris* ont été soumis à des extractions par macération (pendant 24 h) en utilisant quatre solvants de polarité différente éthanol, acétone pur et éthanol/eau 70%+30%, acétone/eau70%+30%. Cette différence de polarité permet d'extraire une large gamme de métabolites secondaires de la plante (Green, 2004). La composition, ainsi que la quantité des métabolites secondaires d'un extrait, peuvent être influencée par plusieurs facteurs tel que le mode et le temps d'extraction, la température, la nature du solvant ainsi que sa polarité qui permet de solubiliser et extraire les composés de polarité similaire au solvant (Green, 2004 ; Ncube *et al*, 2008). De même, le choix d'un solvant pour l'extraction de la matière végétale, doit répondre à un certains nombres de critères dont la faible toxicité et la facilité de l'évaporation à basse température (Hughes, 2002 ; Ncube *et al.* 2008).

Par ailleurs, dans une étude comparative entre différents solvants utilisés dans l'extraction de la matière végétale, l'éthanol s'est révélé être un meilleur solvant pour l'extraction de substances antimicrobiennes à partir des plantes médicinales par rapport à d'autres solvants, pour lequel L'extrait d'éthanol des 3 plantes médicinales exécuté plus activité antibactérienne que l'extrait d'eau correspondant aux mêmes concentrations (Abu-Shanab *et al.* 2006).

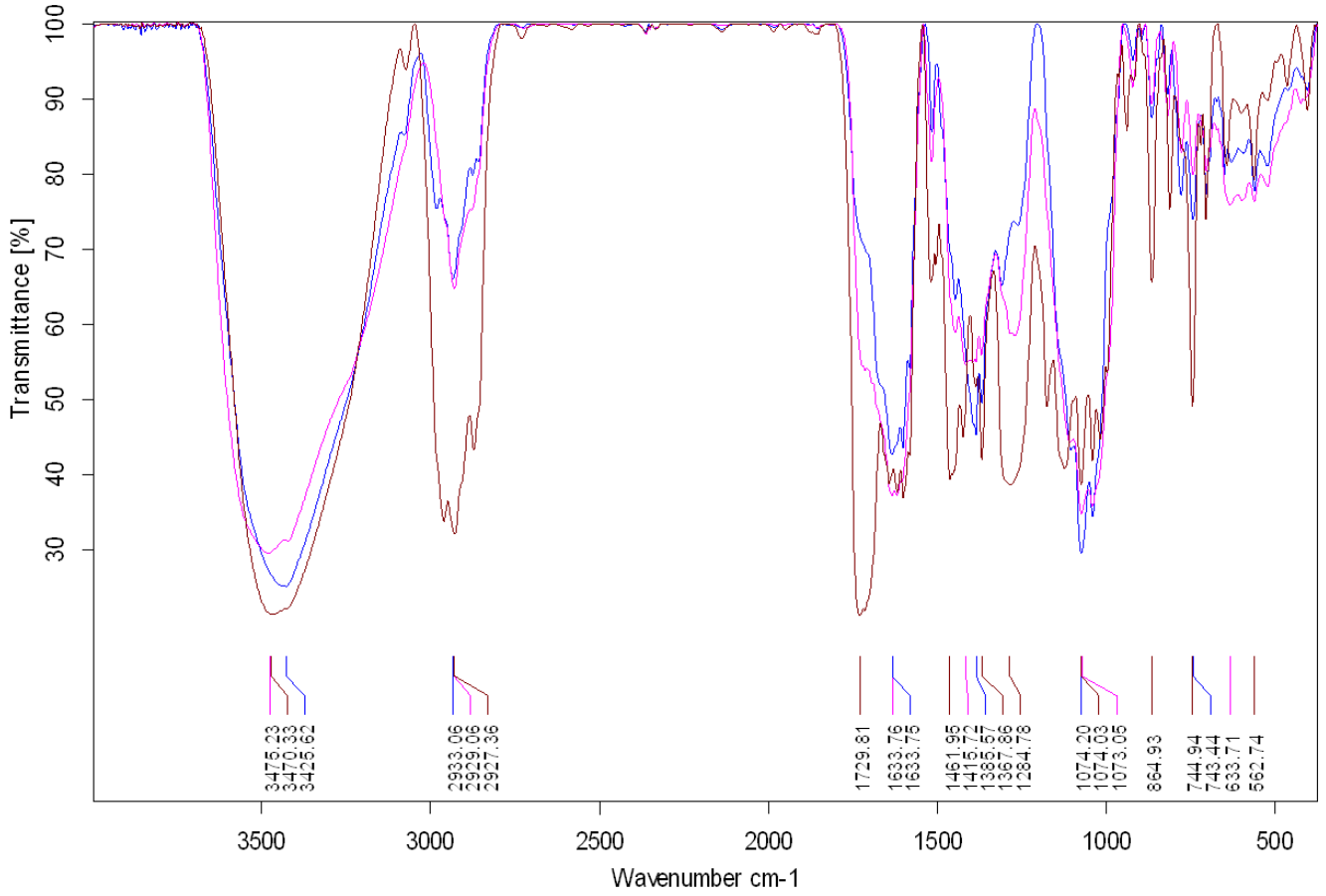
De plus, Wisam H *et al* (2017) ont démontré que les teneurs phénoliques déterminés dans l'extrait éthanolique sont beaucoup plus élevées que dans l'extrait aqueux. D'autre part Kristina Loziene *et al* (2007) ont montré que les solvants éthanol et acétone sont les meilleurs solvants pour l'extraction des composés phénoliques non volatils, y compris les flavonoïdes et les phénols, qu'ayant une activité antibactérienne contre diverses bactéries pathogènes.

Ces résultats ont pu montrer que les rendements des extractions par des solvants polaires, sont plus importants par rapport aux solvants moins polaires, qui ont la capacité de délipider et dépigmenter la matière végétale (Bruneton, 2009).

1.2 Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge (FTR)

La spectrophotométrie FTR a été utilisée afin de déterminer la composition chimique des plantes médicinales étudiées. La figure suivante montre les spectres IR des extraits éthanoliques de gingembre, de thym et leurs associations.

Figure 4. 1 Spectre infrarouge des extraits GE, TE, GETE



C:\Documents and Settings\ACER VERITON\Application Data\OPUS_65\Data\Extrait par maceration du Thymus par ethanol.0	Extrait par maceratı	31/05/2018
C:\Documents and Settings\ACER VERITON\Application Data\OPUS_65\Data\mélange des deux extrait (Gingembre Thymus ethanol).0	mélange de	31/05/2018
C:\Documents and Settings\ACER VERITON\Application Data\OPUS_65\Data\Extrait par maceration du Gingembre par ethanol.0	Extrait par macer	31/05/2018

Seite 1 von 1

On résume les principaux pics des spectres infrarouges dans le tableau suivant :

Tableau 4. 2 Résultats de l'IR.

LES LIAISONS CHIMIQUES	LES NOMBRES D'ONDES (CM^{-1})		
	GINGEMBRE	THYMUS	G, T MELANGE
O-H	**3425.62**	**3470,33**	**3475,23**
$(C-H)_{CH2}$	**2933,06**	**2927,36**	**2929,06**
C = O		**1729,81**	
C = C	**1633.75**		**1633,76**
$(C-H)_{CH3}$ Ou $(C-N)_{R-CO-NH2}$		**1461,95**	**1415,72**
$(C-O)_{Ar-OH}$	**1385,57**	**1367,86**	
C-OH	**1074,20**		**1073,05**
Cycle aromatique	**743,44**	**562,74**	**633,71**

Les résultats de l'étude par spectrophotomètres infrarouge (IRTF) des différents extraits de gingembre et de thymus sont représentés dans le tableau4.2. Les valeurs des nombres d'ondes(ύ) de vibration de différentes liaisons sont consignées sur ce tableau.

On remarque une ressemblance entre les valeurs de l'extrait de gingembre et du thymus, qui se révèle par la présence presque des mêmes fonctions chimiques, Notons par ailleurs, que ces fonctions sont celles caractéristiques des constituants des deux extraits. Quant au mélange on note l'absence de deux nombre d'onde enregistrés dans les extraits séparés dans la région de C = O, et de $(C-O)_{Ar-OH}$ d'où une première hypothèse que les deux extrait en réagie entre eux en formant des nouvelles molécules.

2 Etude de l'activité antibactérienne des extraits

Le présent travail s'intéresse à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits de deux plantes médicinales. Il s'agit de gingembre (*Zingiber officinale*) et le thym (*thymus vulgaris*), vis-à-vis 23 espèces bactériennes et fongiques de référence.

Les résultats du test de sensibilité microbienne aux extraits sont regroupés dans le tableau 4.3. Les valeurs indiquées sont les moyennes de trois essaies. L'action antimicrobienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné des extraites étudiés. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Comme cela a été rapporté dans la littérature, nous avons considéré qu'un extrait a une action antimicrobienne si son diamètre d'inhibition est supérieur à 10 mm (Liu Q. *et al.* 2017).

2.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne de gingembre

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition des extraits éthanolique et acétonique vis-à-vis des souches microbiennes sont illustrés dans le tableau4.3 et les figures 4.2 et 4.3. Ces résultats montrent que les extraits de gingembre sont pourvus de pouvoir antibactérien. On note cependant, des différences d'efficacité, entre les extraits éthanolique et acétonique pur par rapport à l'éthanol/eau (70-30%), acétone/eau (70-30%).

Les souches bactériennes se comportent différemment vis-à-vis des extraits testés. Nous remarquons que les extraits éthanolique et acétonique pure montrent une activité antibactérienne intéressante vis-à-vis des bactéries gram positif (la figure4.4). En citant *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC6538 avec des diamètres des zones d'inhibition ayant atteint 26,00 mm, 28,00 mm vis-à-vis l'extrait éthanolique (GE) et 20,00 mm, 24.67mm avec l'extrait acétonique (GA) respectivement. D'autres réponses positives ont été enregistrées avec trois autres souches bactériennes : *Listeria monocytogene* ATCC 15313, *Entérocoques féacalis* ATCC 29212, et *S.epidermidis* ATCC 12228. Cependant, ces extraits ne montrent qu'une faible activité vis-à-vis, *Bacillus sp*.

Tableau 4. 3 l'effet antimicrobien des extraits

	GE	GEE	GA	GAE	TE	TEE	TA	TAE	TAGA	TAGE	TEGA	TEGE	AMC	CEF	GEN	FLU
ST	26.00±3.97	9.33±0.47	20.00±4.08	11.67±3.09	40.00±00	22.00±1.63	33.00±7.26	20.67±2.49	40	30	40	40	50.33±1.25	41.66±1.69	27±1.9	-
SB	20.00±2.03	10.00±0.82	14.00±4.80	14.33±2.05	37.67±1.70	23.33±1.7	36.00±2.94	25.00±00	34	40	30	40	60.00±1.63	46.00±4.90	30±00	-
S2	12.33±2.05	10.33±0.47	17.33±2.05	14.67±3.00	38.00±1.63	21.67±2.36	35.67±6.02	21.33±0.94	26	24	32	25	26.66±2.49	33.05±2.16	33.02±1.2	-
S3	29.67±0.47	12.33±2.62	8.00±4.00	0.00±0.00	34.00±1.27	27.67±2.05	37.67±3.3	23.67±2.87	36	23	25	23	42.66±2.05	32.00±2.44	35.01±1.0	-
SAF	28.00±2.45	29.00±3.56	24.67±4.11	21.67±4.5	39.67±0.47	39.33±0.94	29.33±0.94	25.33±3.77	40	40	40	40	43.33±2.49	31.66±1.24	32.00±00	-
SE	27.00±2.45	13.67±2.36	23.33±2.49	19.00±4.55	39.67±0.47	39.33±0.94	26.33±0.47	25.00±00	40	40	40	40	42.66±1.88	34.00±2.44	33.04±1.0	-
LIS	35.67±3.3	15.33±5.56	29.33±3.4	31.67±6.20	36.33±0.94	35.67±1.7	31.67±2.36	30.67±1.7	40	34	40	40	56.00±4.32	57.66±1.69	36.00±00	-
ECBC	18.00±2.04	13.33±4.78	14.67±2.87	09.00±4.50	13.33±2.36	0.00±00	26.00±0.82	11.00±0.82	12	11	17	26	37.66±5.55	32.66±1.69	16.03±2.5	-
ESF	15.67±2.62	9.33±0.47	11.00±1.63	9.00±4.50	10.33±1.25	11.00±1.63	14.67±0.47	0.00±00	00	00	23	17	40.33±2.05	31.66±2.05	18.00±00	-
B1	0.00±00	0.00±00	0.00±00	0.00±00	18.33±2.94	10.00±0.82	15.00±00	11.00±00	12	11	20	24	43.33±2.49	32.14±0.81	35.7±1.5	-
B2	10.67±0.47	10.33±0.94	11.33±1.25	0.00±00	11.00±1.41	0.00±00	11.67±1.7	16.00±1.41	23	20	28	25	44.66±6.76	30.00±00	38.4±2.6	-
B3	11.67±2.36	9.33±0.47	24.33±4.5	22.00±6.5	10.67±0.47	0.00±00	21.00±0.82	11.00±0.82	11	15	22	23	24.66±4.98	33.15±5.71	34.00±00	-
B4	8.00±3.72	9.00±05.72	18.67±5.7	11.00±2.83	14.00±1.41	10.67±1.7	12.67±0.47	10.00±0.82	12	15	10	17	21.66±1.69	23.33±1.24	22.7±1.2	-
U	11.67±2.36	0.00±00	11.00±2.83	8.33±4.5	11.00±00.00	0.00±00	13.67±0.47	0.00±00	11	11	11	11	13.00±1.41	30.66±2.05	20.8±0.3	-
Pseud f	9.00±00.00	9.00±00	13.00±1.63	11.00±0.00	11.33±1.89	10.00±1.41	11.67±2.36	12.00±1.41	12	11	17	15	14.33±0.47	18.20±2.86	28.60±4.2	-
Pseudo	11.00±1.41	0.00±00	14.33±2.05	0.00±00	0.00±00	0.00±00	0.00±00	0.00±00	11	11	18	25	12.66±2.08	14.00±2.86	21.15±1.6	-
E1	0.00±00	0.00±00	0.00±00	0.00±00	11.00±2.42	10.33±0.47	0.00±00	0.00±00	00	00	00	00	10.33±0.47	15.33±2.82	28.00±00	-
E2	9.33±0.47	0.00±00	0.00±00	0.00±00	00.00±00	0.00±00	10.33±0.47	0.00±00	09	09	11	09	34.66±2.24	30.00±2.82	25.5±3.2	-
E3	11.67±2.36	09.33±4.24	8.67±4.78	0.00±00	16.67±2.24	10.00±0.82	18.00±2.16	9.00±4.9	13	11	13	11	23.00±0.81	25.66±1.24	22.00±00	-
E4f	13.00±1.63	08.33±4.5	13.00±2.97	13.00±2.45	14.00±2.83	11.67±3.09	14.00±2.94	12.00±2.8	30	37	28	36	23.66±2.62	26.33±2.05	22.4±1.9	-
KLB	11.33±2.62	08.00±4.00	0.00±00	0.00±00	9.00±3.24	0.00±00	10.33±1.25	0.00±00	11	11	11	11	25.33±1.24	28.00±2.16	33.45±0.1	-
Saccaro	14.67±1.25	11.33±0.94	11.00±0.82	0.00±00	21.33±1.7	19.67±2.87	23.33±0.94	19.00±0.94	25	25	20	18	-	-	-	22.33±0.5
Candida	10.67±0.94	09.33±0.47	10.00±0.00	0.00±00	21.00±2.00	11.33±1.25	15.33±0.94	17.33±0.94	40	40	38	38	-	-	-	0.00±0.00

(GE : extrait éthanolique- GEE: extrait éthanolique/eau- GA : extrait acétonique- GAE : extrait acétonique/eau) de gingembre –(TE : extrait éthanolique- TEE : extrait éthanolique/eau-TA : extrait acétonique-TAE : extrait acétonique/eau) de thym. TEGE : extrait éthanolique de l'association de thym et de gingembre-TAGA : extrait acétonique de l'association de thym et gingembre. TAGE : extrait éthanolique de thym+ extrait acétonique de gingembre. TEGA : extrait éthanolique de thym + extrait acétonique de gingembre-AMC : amoxicilline-CEF : céfazoline-GEN : gentamicine-Flu : fluconazol. Les valeurs = la moyenne de 3 essaies ± écart-types .

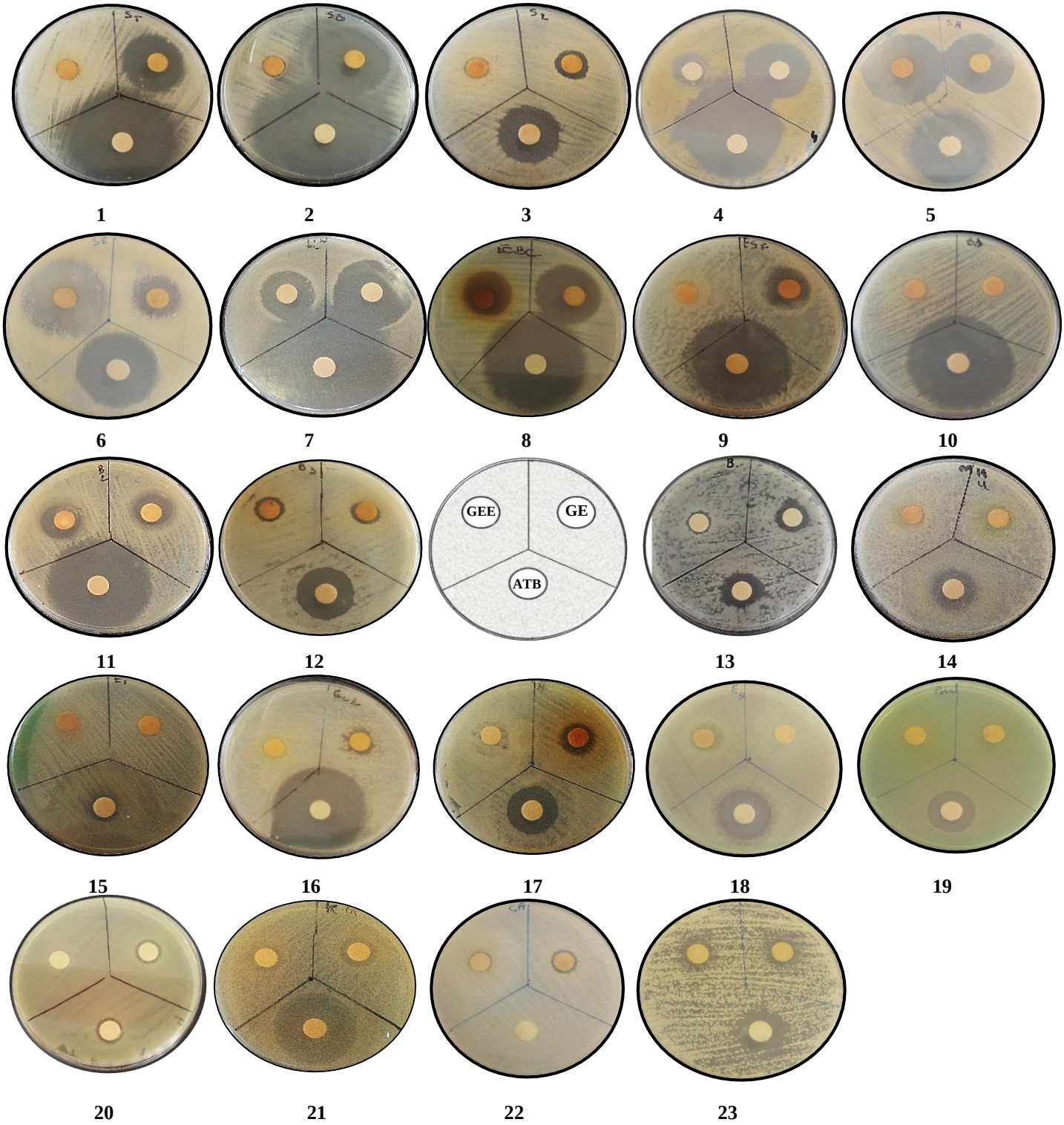


Figure 4. 2 Présente l'effet antimicrobien de l'extrait éthanolique de gingembre 1 :*S.aureus* ATCC43300- 2 :*S.aureus* ATCC25923- 3 :*S.aureus* ATCC29213-4 :*S.aureus* isolé- 5 :*S.aureus* ATCC6538-6 :*S.epidermidis* ATCC12228-7 :*L.monocytogene* ATCC15313- 8:*E.feacalis* ATCC29212- 9 :*E.feacalis* ATCC65669-10 :*B.subtilis* isolé - 11 :*B.subtilis* ATCC23857 – 12 *: B.subtilis* ATCC6631- 13 :*B.amyloliquefaciens* ATCC2350-14 :*P.mirabilis* isolé- 15 :*E.coli* ATCC25922- 16 :*E.coli* ATCC25622 -17 :*E.coli* isolé- 18 :*E.coli* ATCC11150-19 :*P.aeruginosa* ATCC9027- 20 :*P.aeruginosa* isolé- 21 :*K.pneumoniae* ATCC 4352- 22 :*C.albicans* ATCC19763- 23 :*S.cerevisiae* ATCC19763. GEE : gingembre éthanol eau –GE : gingembre éthanol- ATB : antibiotique.

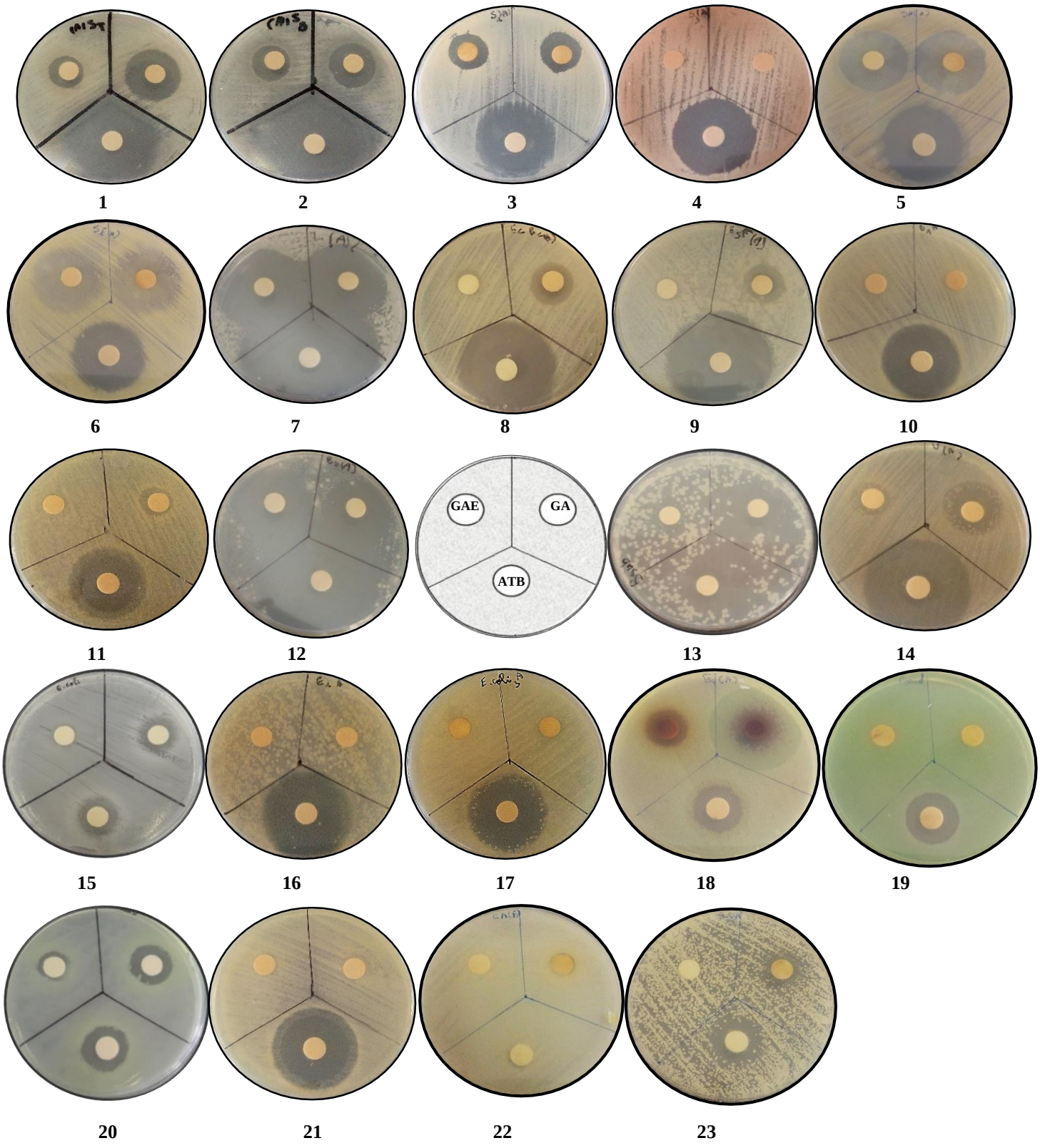


Figure 4. 3 Présente l'effet antimicrobien de l'extrait acétonique gingembre.
1 :*S.aureus* ATCC43300- 2 :*S.aureus* ATCC25923- 3 :*S.aureus* ATCC29213-4 *:S.aureus* isolé- 5 :*S.aureus* ATCC6538-6 :*S.epidermidis* ATCC12228-7 *:L.monocytogene* ATCC15313- 8:*E.feacalis* ATCC29212- 9 :*E.feacalis* ATCC65669-10 *:B.subtilis* isolé - 11 :*B.subtilis* ATCC23857 – 12 : *B.subtilis* ATCC6631- 13 *:B.amyloliquefaciens* ATCC2350-14 *:P.mirabilis* isolé- 15 :*E.coli* ATCC25922- 16 :*E.coli* ATCC25622 -17 *:E.coli* isolé- 18 :*E.coli* ATCC11150-19 *:P.aeruginosa* ATCC9027- 20 :*P.aeruginosa* isolé- 21 :*K.pneumoniae* ATCC 4352- 22 *:C.albicans* ATCC19763- 23 :*S.cerevisiae* ATCC19763. GAE : gingembre acétone eau- GA : gingembre acétone- ATB : antibiotique

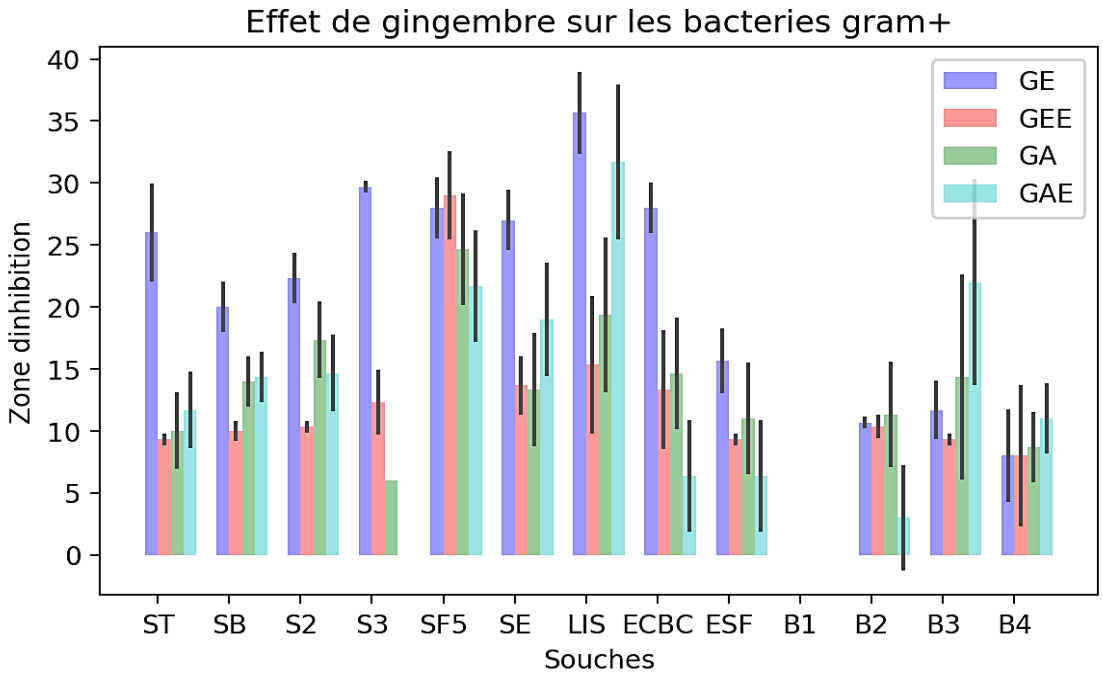


Figure 4. 4 Présente l'effet de gingembre sur les bactéries gram+, Ecart type : barre noire ST :*S.aureus* ATCC 43300 – SB *: S.aureus* ATCC 25923 – S2*: S.aureus* 29213 – S3: *S.aureus* isolé – SF3 : *S.aureus* ATCC 6538– SE *: S.epiderlidis* ATCC 12228– LIS : *L.monocytogene* ATCC 15313– ECBE *: E.feacalis* ATCC 29212– ESF: *E.feacalis* ATCC 6569 –B1 : *B.subtilis* isolé– B2 *:B.subtilis* ATCC23857- B3 : *B.subtilis* ATCC6631– B4 : *B.amyloliquefaciens* ATCC23350.

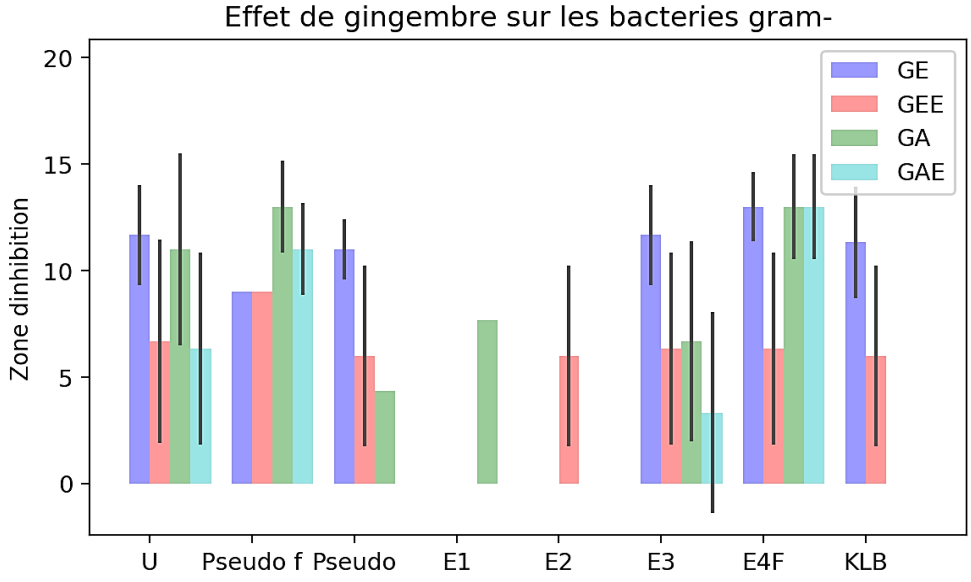


Figure 4. 5 Illustre effet de gingembre sur les bactéries gram-, Ecart type : barre noire U : *P.mirabilis* isolé –Pseudo f *: p.aerogenosae* ATCC 9027– Pseudo : *p.aerogenosae* isolé – E1 : *E.coli* ATCC25922 – E2 : *E.coli* ATCC25622 –E3: *E.coli* isolé – E4F: *E.coli* ATCC4352– KLB: *K.pneumoniae* ATCC 9027.

Figure 4.5 résume les résultats des diamètres des zones d'inhibition des extraits de gingembre vis-à-vis des bactéries à gram négatif. En effet, les bactéries à gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella. pneumoniae* ATCC 9027, *E.coli* ATCCC 25922 *et E.coli* ATCC 25622 se sont révélés résistantes à tous les extraits (≤10 mm). Les autres souches présentent une certaine sensibilité vis-à-vis des deux extraits (GE et GA), les meilleurs diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 11 et 14 mm avec *Escherichia coli* ATCC 4352, *et Proteus mirabilis* isolé.

Par contre, ces extraits ont présenté une activité faible vis-à-vis de *Saccaromyces cervisiae* ATCC 19763 (10 et 09,5 mm), et *Candida albicans* ATCC 10231 (10 et 09,5 mm), et l'extrait acétonique a 70% n'a présenté aucun effet vis-à-vis ces souches. Figure 4.6 illustre ces résultats.

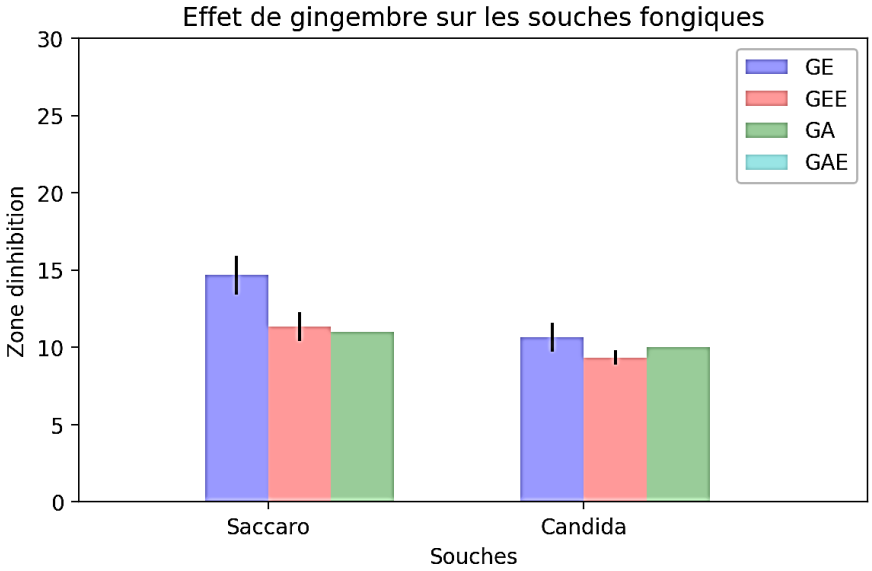


Figure 4. 6 présente effet de gingembre sur les souches fongique,
Saccaro : *S.cervisiae* ATCC 19763 –Candida : *C.albicans* ATCC 10231.

Les résultats montrent que seulement les extraits de gingembre éthanolique et acétonique purs sans modification de la polarité, ont une activité antimicrobienne contre les bactéries et les fongiques, particulièrement l'extrait éthanolique de gingembre (GE) qui a une activité inhibitrice importante. Et cela est confirmé par des autres études qui indiquent que l'extrait de gingembre éthanolique inhibe la croissance de certaines bactéries Gram négatives et Gram positives, ainsi que des pathogènes des voies respiratoires *Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* (Akoachere *et al.* 2002;Chen IN *et al.* 2008).

Nos résultats sont similaires à un travail mené par Amari et Rahmoun (2016), qu'indiquent que deux extraits de gingembre testés présentent des niveaux d'activités variables en fonction des bactéries suivantes : *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Proteus mirabilis,*

Micrococcus luteus et *Staphylococcus aureus* qui sont apparues sensible à l'action des deux extraits avec des diamètres d'inhibition compris entre 13 et 27 mm. Les résultats obtenus à partir des travaux récents d'Abd-Alrahman *et al*. (2013) et Riaz *et al.,* (2015) affirment que les extraits méthanolique et chloroformique de gingembre sont actifs *in vitro* vis-à-vis de la même gamme des bactéries.

En outre, Indu M.N *et al.* 2006 ont testé l'effet antimicrobien de gingembre sur 20 sérogroupes d'*E.coli,* 8 sérotypes de *Salmonella*, *L.monogenes* et *A. hydrophila, ils* ont trouvé que l'extrait de gingembre a inhibé seulement deux sérogroupes de *E.coli et L.monogenes.* Ces résultats suggèrent que l'activité inhibitrice ne dépend pas seulement à l'espèce de la souche, mais aussi à son génotype, ce qui vient de confirmer nos résultats.

Dans une autre étude réalisée par Gull *et al*. (2012), sur les rhizomes de Z. *officinale*, récoltés en Pakistan, les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* se sont montrés sensibles à l'action de l'extrait de gingembre. Ce qui n'est pas en accord avec nos résultats. Cette différence d'effet pourrait être due à la nature du solvant utilisé lors de l'extraction qu'entrainé une variation de la composition chimique avec l'influence de l'écosystème (Singh G *et al* 2008).

Cela peut être causé par la présence de gingérol et de shogaol en tant qu'ingrédient actif dans le gingembre. De ce fait, de nombreuses études ont indiqué que l'effet antimicrobien du gingembre est principalement due à la présence de mono- et sesquiterpènes oxygénés, composés phénoliques 'shogaol, gingérol' (Micheilin EM *et al* 2009), qui sont des composés phénoliques liposolubles principalement isolés à partir de la racine de gingembre (lui Z *et al* 2011).

De plus, ils ont trouvé que le 10-géringol et le 12-gingérol du rhizome de gingembre ont montré une activité antibactérienne *in vitro* contre un large spectre de bactéries, particulièrement de bactéries anaérobies associées à la parodontite de la cavité buccale humaine. (Akoachere *et al*. 2002, Park *et al*. 2008).

Notamment, autre composants comme le galanolactone de la famille de diterpene est connu comme un agent antimicrobien contre plusieurs espèces de Candida (Morita et Itokawa, 1988) et deux espèces de Bacillus Gram positif (Jang *et al.*2003). Ce qui n'est pas en accord avec nos résultats.

En raison de la présence de ces substances dans l'extrait de gingembre qui considèrent la cause principale de leur mode d'action antimicrobien. Comme ces composés ont des différents

effets, qui attaquent non seulement les parois cellulaires et les membranes cellulaires, mais aussi leur perméabilité et la libération de constituants intracellulaires (ribose, Na glutamate, etc.) et interfèrent également avec les fonctions membranaires (transport d'électrons, absorption de nutriments, protéine, synthèse d'acide nucléique et activité enzymatique). Ainsi, ces composés pourraient avoir plusieurs cibles invasives qui pourraient conduire à l'inhibition des bactéries pathogènes (Bajpai V *et al.* 2009).

2.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne de *thymus vulgaris*

D'après nos résultats, nous avons remarqué que presque tous les extraits provient de thym sont pourvus d'un fort pouvoir antibactérien, même en changeant la polarité de solvants.

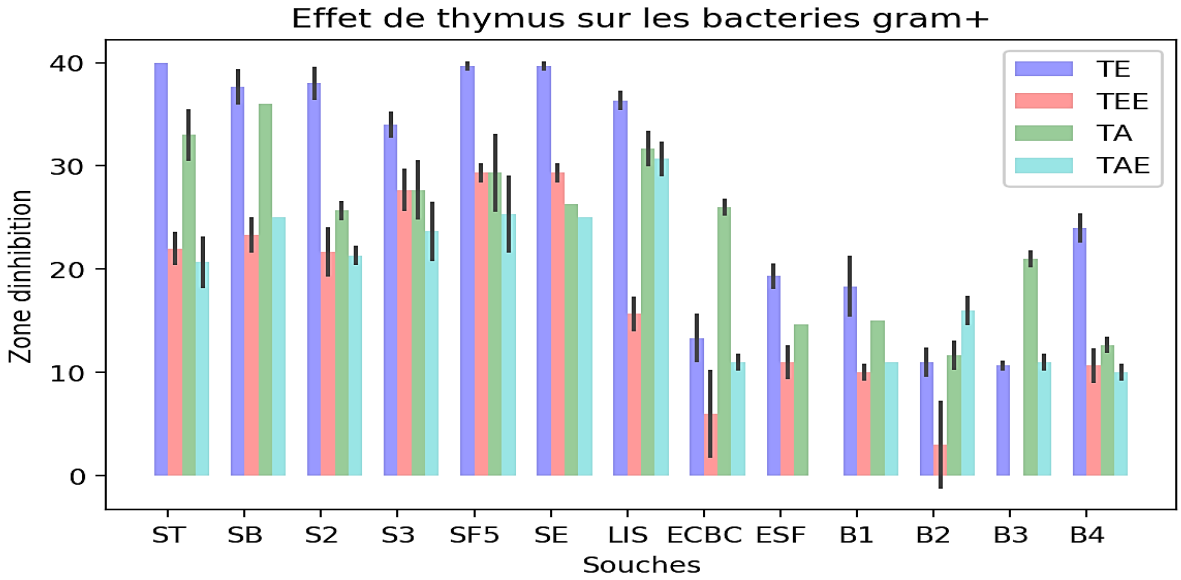


Figure 4. 7 Présente l'effet de thym sur les bactéries gram+, Ecart type : barre noire
ST :*S.aureus* ATCC 43300 – SB : *S.aureus* ATCC 25923 – S2: *S.aureus* 29213 – S3: *S.aureus* isolé – SF3 : *S.aureus* ATCC 6538– SE : *S.epidermidis* ATCC 12228– LIS : *L.monocytogene* ATCC 15313– ECBE : *E.feacalis* ATCC 29212– ESF: *E.feacalis* ATCC 6569 –B1 : *B.subtilis* ATCC23857 – B2 :*B.subtilis* isolé – B3 : *B.subtilis* ATCC6631– B4 : *B.amyloliquefaciens* ATCC23350.

La majorité des bactéries à gram + ont été inhibés avec les quatre extraits éthanoliques et acétoniques de thymus. L'activité antimicrobienne des différents extraits de thym sont évaluées sur 13 souches bactériennes (figure 4.7). En effet 5 souches de *S.aureus* et une souche *S.èpedermidus* ATCC12228 qui donnent une haute sensibilisée aux deux extraits éthanolique et acétonique avec des zones d'inhibitions qui comprise entre 26.33 et 40 mm. Pareillement *L.monocytogène* ATCC15313 montre une forte sensibilité aux extraits avec des zones d'inhibitions supérieures à 30 mm.

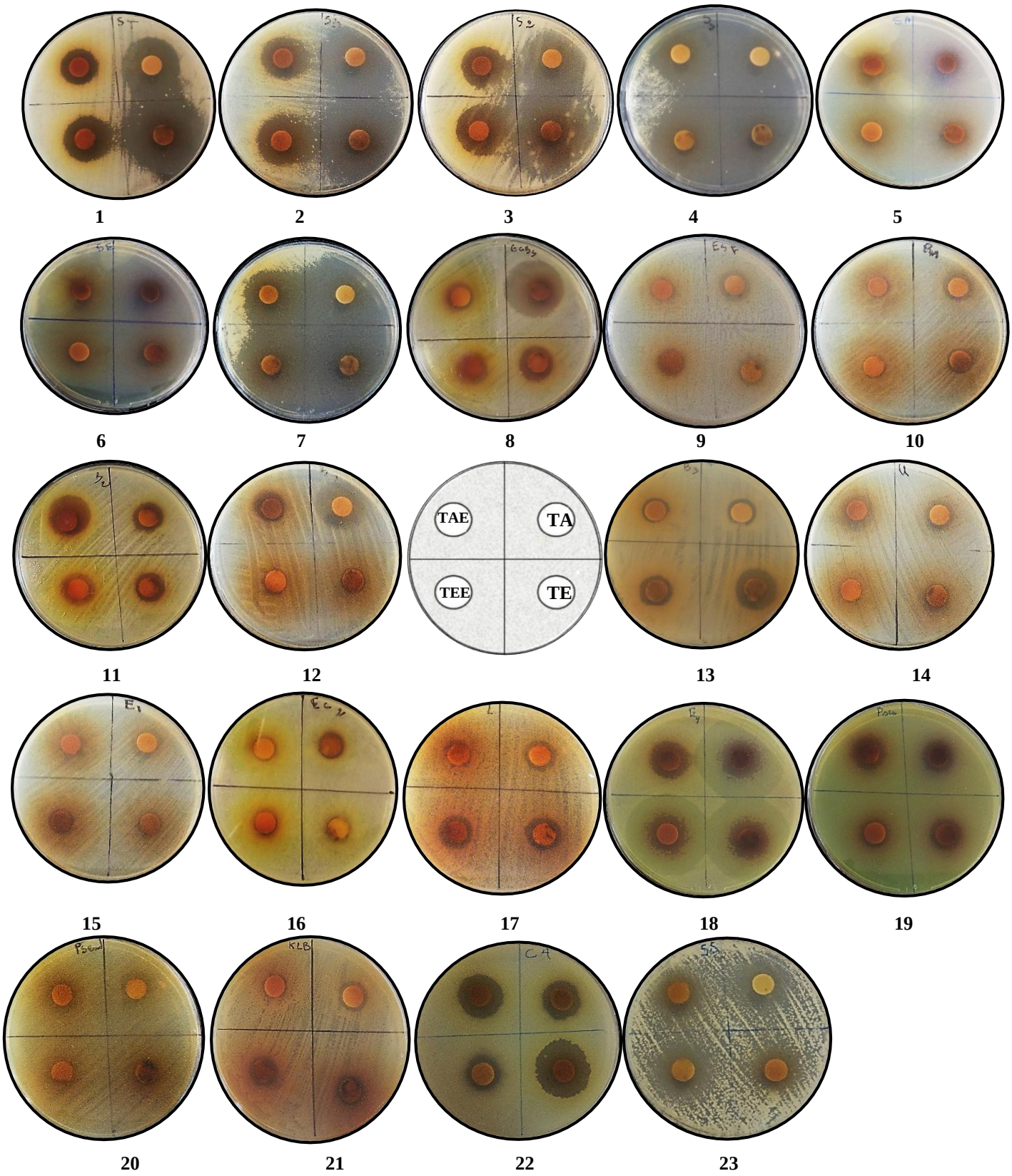


Figure 4. 8 Présente l'effet antimicrobien des extraits éthanolique et acétonique de thym. 1 :*S.aureus* ATCC43300- 2 :*S.aureus* ATCC25923- 3 :*S.aureus* ATCC29213-4 :*S.aureus* isolé- 5 :*S.aureus* ATCC6538-6 :*S.epidermidis* ATCC12228- 7:*L.monocytogenes* ATCC15313- 8:*E.feacal*is ATCC29212- 9 :*E.feacalis* ATCC65669-10 :*B.subtilis* isolé - 11:B.subtilis ATCC23857 – 12 : *B.subtilis* ATCC6631- 13 :*B.amyloliquefaciens* ATCC2350-14 :*P.mirabilis* isolé- 15 :*E.coli* ATCC25922- 16 :*E.coli* ATCC25622 -17 :*E.coli* isolé- 18 :*E.coli* ATCC11150-19 :*P.aeruginosa* ATCC9027- 20 :*P.aeruginosa* isolé- 21 :*K.pneumoniae* ATCC 4352- 22 :*C.albicans* ATCC19763- 23 :*S.cerevisiae* ATCC19763. TAE : thymus acétone eau- TA : thymus acétone- TEE : thymus éthanol eau –TE : thymus éthanol.

Cependant, les autres souches gram positif *Bacillus sp* et *E. fecalis* ATCC 6569 présentent une certaine sensibilité intermédiaire aux extraits, mis à part *E. fecalis* ATCC 29212 qui s'est montré une forte sensibilité à l'extrait acétonique (TA).

L'effet antimicrobien des extraits de thym sur les bactéries à gram négatif est présenté dans la figure 4.9.

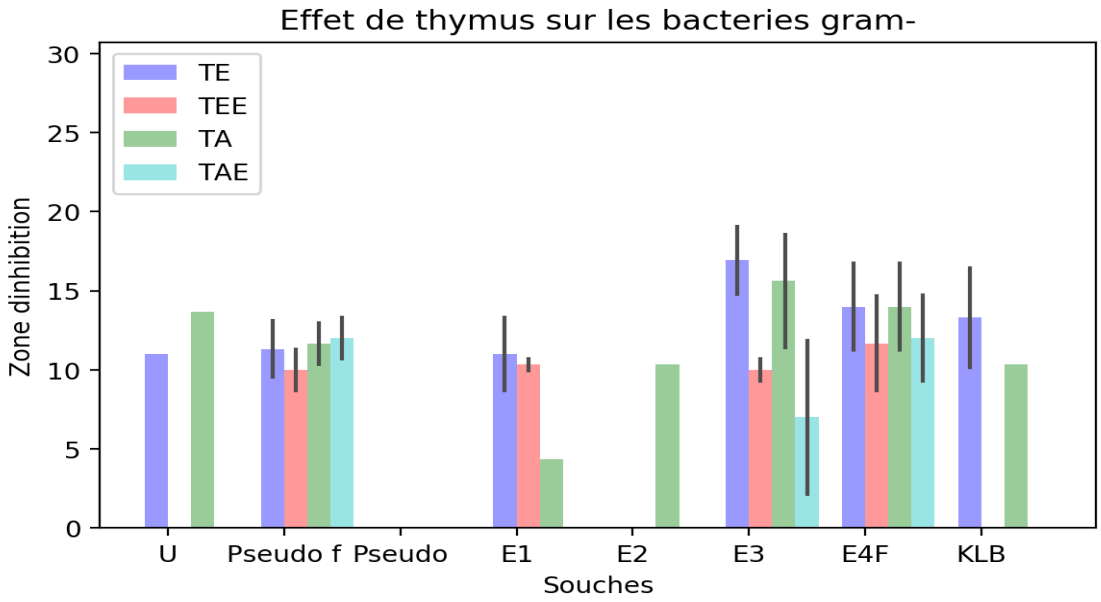


Figure 4. 9 Illustre effet de thym sur les bactéries gram-, Ecart type : barre noire
U : *P.mirabilis* isolé–Pseudo f : *p.aerogenosae* ATCC 9027– Pseudo *: p.aerogenosae* isolé – E1 : *E.coli* ATCC25922 – E2 : *E.coli* ATCC25622 –E3: *E.coli* isolé – E4F: *E.coli* ATCC4352– KLB: *K.pneumoniae* ATCC 9027

En revanche, les Gram négatifs ont présenté plus de résistance pour ces extraits que les gram positifs, mais il faut noter que ces souches sont sensibles vue leurs diamètre d'inhibition qui est supérieur à 10 mm. Alors que la plus faible activité antimicrobienne est donnée par *P.aerogenosa* isolé qui ne présente aucune sensibilité vis à vis tous les extraits de *thymus vulgaris* .aussi qu'*E.coli* ATCC 25622 a été inhibé seulement par l'extrait acétonique avec une zone de ≈10mm.

Les autres bactéries grams négatifs (*P.mirabilis* isolé, P.*aerogenosa* ATCC 9027 et *E.coli* ATCC 25922, *E.coli* isolè , *E.coli* ATCC11150 et *K.pneumoniae* ATCC 9027) présentent une résistance intermédiaire à ces extrait avec des zones intérimaires qui ne dépasse pas le 16mm. En outre, les souches fongiques ont été inhibées par les extraits de *thymus vulgaris*. La meilleure activité c'était due à l'extrait éthanolique (TE) qui a inhibé les deux souches avec des diamètres supérieures à 20 mm (voir figure4.10).

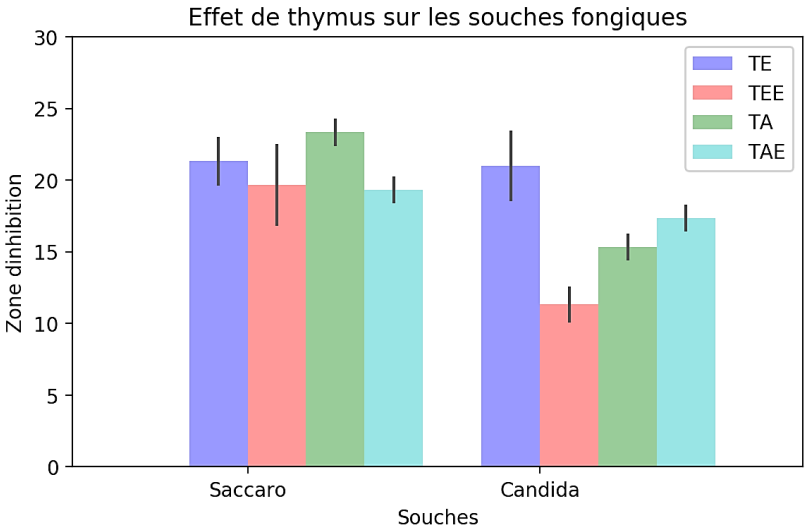


Figure 4. 10 présente l'effet de thym sur les souches fongique, Saccaro : *S.cervisiae* ATCC 19763 –Candida : *C.albicans* ATCC 10231

Plusieurs études ont été réalisé pour la détermination de pouvoir antimicrobien de certaines extraits de *Thymus vulgaris*, en citant celles de Tabak et ses assistants (1996), Ettayebi et ses collaborateurs (2000), Thuille (2003), Bouhdid (2006) et plusieurs autres qui ont indiqué que les extraits de *thymus vulgaris* portent une forte activité antimicrobienne surtout contre les bactéries à Gram +, ce qui confirme nos résultats vu que les extraits de *Thymus vulgaris* ont inhibé presque toutes les souches testées.

D'après les résultats obtenus, les extraits de thym agissent sur les gram+ particulièrement *S.aureus, L.monocytogene*s et aussi *S.epidermidus* qui ont été les plus sensibles, suivi par les *Enterococcus fecalis* et les *Bacillus sp* qui révèlent une activité intermédiaire envers ces extraits. Ces résultats sont similaires à ceux de Varga, E *et al* (2015) qui a testé l'effet de quatre extraits différents de thym sur *E.coli, P.mirabilis, P.aeruginosa, C.sakazakii, S.aureus. B.subtilis, L.monocytogenes, S.pyogenes, C.albicans* et enfin *S.cerevisiae*, ces extraits avaient une activité antimicrobienne significatives contre tous les microorganismes testés.

Ainsi que les gram- paraissent moins sensibles, et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire, puisque le thymus cible principalement la paroi de gram+ riche en peptidoglycane (Aznar, A *et al*. 2015). Les résultats obtenus montrent que *K.pneumonea* ATCC4352, *P.miribilis* isolé et *P.aerogenosa* ATCC9027, *Escherechia coli sp*, présentent une sensibilité intermédiaire, sauf *E.coli* ATCC25622 qu'a résisté à tous les extraits mis à part l'extrait acètonique, cette variation de l'effet des extraits sur *E.coli* est probablement due à la présence d'un polymorphisme génétique entre eux.

De plus, *P.aerogenosa* isolé a résisté vis-à-vis tous les extraits de *thymus vulgaris* cela est liée à sa grande capacité de développer une résistance envers nombreux agents antimicrobiens ce qui revient à la structure particulière de la membrane externe de ce genre, particulièrement imperméable aux molécules hydrophobes (Nordmann P *et al* 2006).

Par ailleurs, la paroi des bactéries Gram+ est riche en protéines tandis que chez les souches Gram– est surtout assemblée en lipopolysaccharides (LPS), la membrane extérieure de ces dernières constitue une barrière de perméabilité efficace. Le LPS, grâce à ses charges négatives de surface, empêche la diffusion des molécules hydrophobes, et les protéines excluent le passage des molécules hydrophiles de poids moléculaire élevé Alors que les bactéries Gram+ sont moins protégées contre les agents antibactériens Blackmore CG *et al* 2001.

Le mode d'action des extraits de thym dépend en premier lieu à leurs compositions et la propriété hydrophobe de leurs constituants, ainsi que leurs teneurs élevés en phénols tell que le carvacrol et le thymol qui sont des composés phénoliques connus par leurs propriétés antimicrobiennes (Fadli M *et al.* 2012). Et d'après dorman *et al* (2000) le thymol est le composé qui possède le plus large spectre d'activité antibactérienne, suivi du carvacrol et de l'α-terpinèol. (Aznar, A *et al.* 2015).

Il n'existe pas des études précises qui nous permettent de comprendre les mécanismes antimicrobiennes des phénols, mais des recherches ont démontré que les composés phénoliques causent des dommages au niveau de la membrane externe des bactéries, ce qui augmente la perméabilité membranaire aux protons, aux ions potassiums et une réduction des réserves de l'ATP intracellulaire, aussi elle possède une activité inhibitrice de l'ATPase qui induit la perturbation de la force proton-motrice et une dénaturation des protéines intracellulaires (Ultee *et al.* 2002).

En effet plusieurs études ont estiment que l'action des extraits de thymus est due à la concentration élevée du thymol et α–terpinène, et malgré la petite concentration du carvacrol et bornéol dans la composition on peut les considérer comme des composés clés avec lequel Le thymol et le carvacrol sont les plus bactéricides (Zohary *et al.* 2004).

L'activité antifongique des huiles du Thym sont attribuées au Thymol et au carvacrol. Ils provoquent une dégénérescence des champignons (hyphes) qui semblent à vider leur contenu cytoplasmique (Edris, 2007). Tandis que le mécanisme de toxicité phénolique est fondé principalement sur l'inhibition des enzymes fongiques contenant le groupement SH dans leur site actif et dégradent la membrane plasmique des levures (Celimene *et al*. 1999).

2.3 Boite à Moustache, de l'action des extraits vis-à-vis 23 souches

A ce sujet, les figures suivantes (a) et (b) présentent une comparaison de l'activité antimicrobienne de tous les extraits préparés vis-à-vis aux 23 souches testées. Afin de découvrir l'extrait qui présente plus d'efficacité.

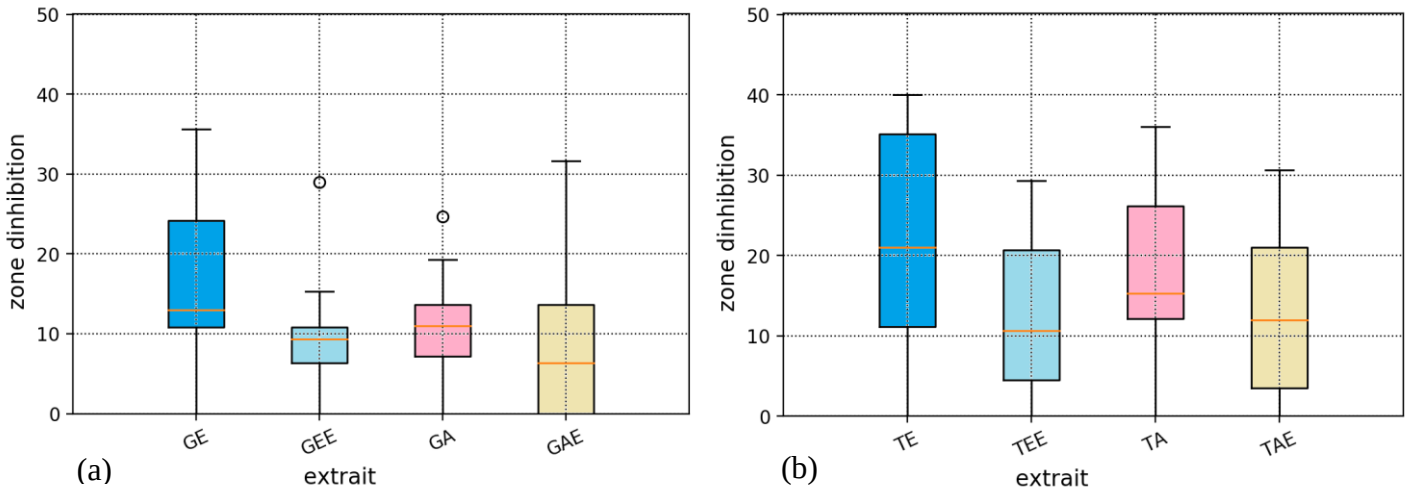


Figure 4. 11 Présente l'effet moyen de différents extraits provient de thymus et de gingembre.

La figure 4.11 nous a permet d'évaluer l'efficacité des extraits de gingembre et de thym en comparant leurs zones d'inhibitions. Dans la figure (a), les médianes des extraits provient de gingembre sont clairement différentes. La médiane de l'extrait de gingembre acétonique 70% (GAE) est 9.33 mm ce qui indique la non-efficacité de cet extrait, aussi les deux extraits d'éthanol 70% (GEE) et d'acétone (GA) ont des valeurs de médians similaires porches de 10 mm et leurs premiers quartiles Q1 sont 6.33mm et 6.67mm respectivement.

Tandis que la médiane de l'extrait éthanolique de gingembre (GE) est 13.00 mm avec la valeur de Q1 est 10.73mm et Q3 est 26.00mm et une valeur maximale est de 35.67 mm, ce qui indique que l'extrait éthanolique de gingembre (GE) est le meilleur par rapport les autres extraits de gingembre GEE, GA et GAE. De ce fait, il est considéré comme l'extrait de gingembre le plus efficace avec les plus grandes zones d'inhibitions vis-à-vis toutes les souches testées. Selon l'analyse de la variance (ANOVA) qui permet de déterminer le P_{value} de gingembre est 0.0040 qu'est considéré statistiquement significative.

De même la figure 4.11 (b) présente une comparaison entre les extraits de thym (P_{value} = 0.0057), les résultats montrent que l'extrait éthanolique de thymus (TE) est le plus efficace avec médiane de 21.00 mm, avec Q1 de 11mm et son Q3 égale à 36.33mm et une valeur maximale est de 40.00 mm, suivi par l'extrait acétonique TA qui a une médiane de 15.33mm et avec des

valeurs de quartiles de Q1 (11.75mm) et Q3 (26.33mm) et une valeur maximale de 36mm. Alors que les deux derniers extraits éthanol 70% et acétone 70% (TEE et TAE) ont des médianes de 10.67mm ,12.00mm respectivement**.**

Par conséquent, les extraits éthanolique et acétonique purs de gingembre et ceux de thym ont été choisi pour déterminer leurs effets en associations.

2.4 Evaluation de l'activité antimicrobienne des associations :

Dans cette partie, les extraits éthanolique et acétonique purs de gingembre et ceux de thym ont été utilisé pour préparer quatre différents extraits d'association qui sont présenté dans le tableau4.4.

Tableau 4. 4 Présente les différentes probabilités d'association.

Extraits	TA	TE
GA	TAGA	TEGA
GE	TAGE	TEGE

Selon les graphes (figures4.12, 4.13, 4.14 et 4.15) et le tableau4.3, on constate que l'effet antimicrobien des extraits devient plus important lorsqu'ils sont mélangés entre eux. Les

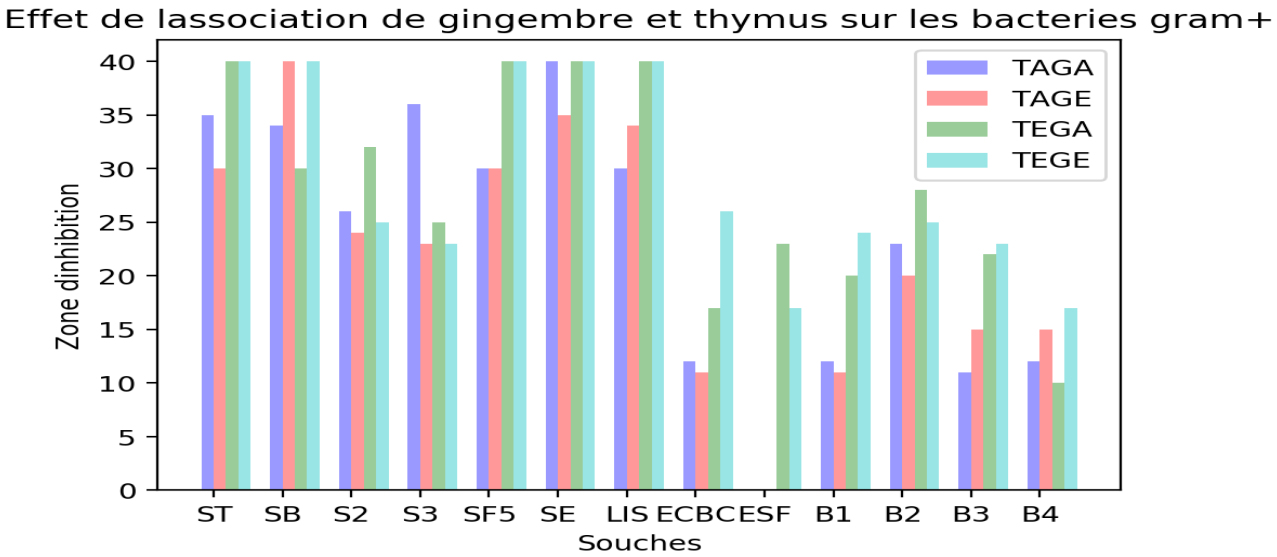


Figure 4. 12 Présente l'effet de l'association des extraits sur les bactéries gram+, ST :*S.aureus* ATCC 43300 – SB : *S.aureus* ATCC 25923 – S2: *S.aureus* 29213 – S3: *S.aureus* isolé – SF3 : *S.aureus* ATCC 6538– SE : *S.epiderlidis* ATCC 12228– LIS : *L.monocytogenes* ATCC 153 15313– ECBE : E.feacalis ATCC 29212– ESF: *E.feacalis* ATCC 6569 –B1 : *B.subtilis* isolé – B2 :*B.subtilis* ATCC23857–B3 : *B.subtilis* ATCC6631– B4 : *B.amyloliquefaciens* ATCC23350.

résultats obtenus montrent que l'effet des deux extraits éthanolique et acétonique de gingembre augmente quand ils sont associes avec les extraits de thym, de ce fait on aura un effet de potentialisation pour ces extraits. En effet, les valeurs inhibitrices les plus élevées sont obtenue par les extraits TEGE et TEGA vis-à-vis toutes les souches testés.

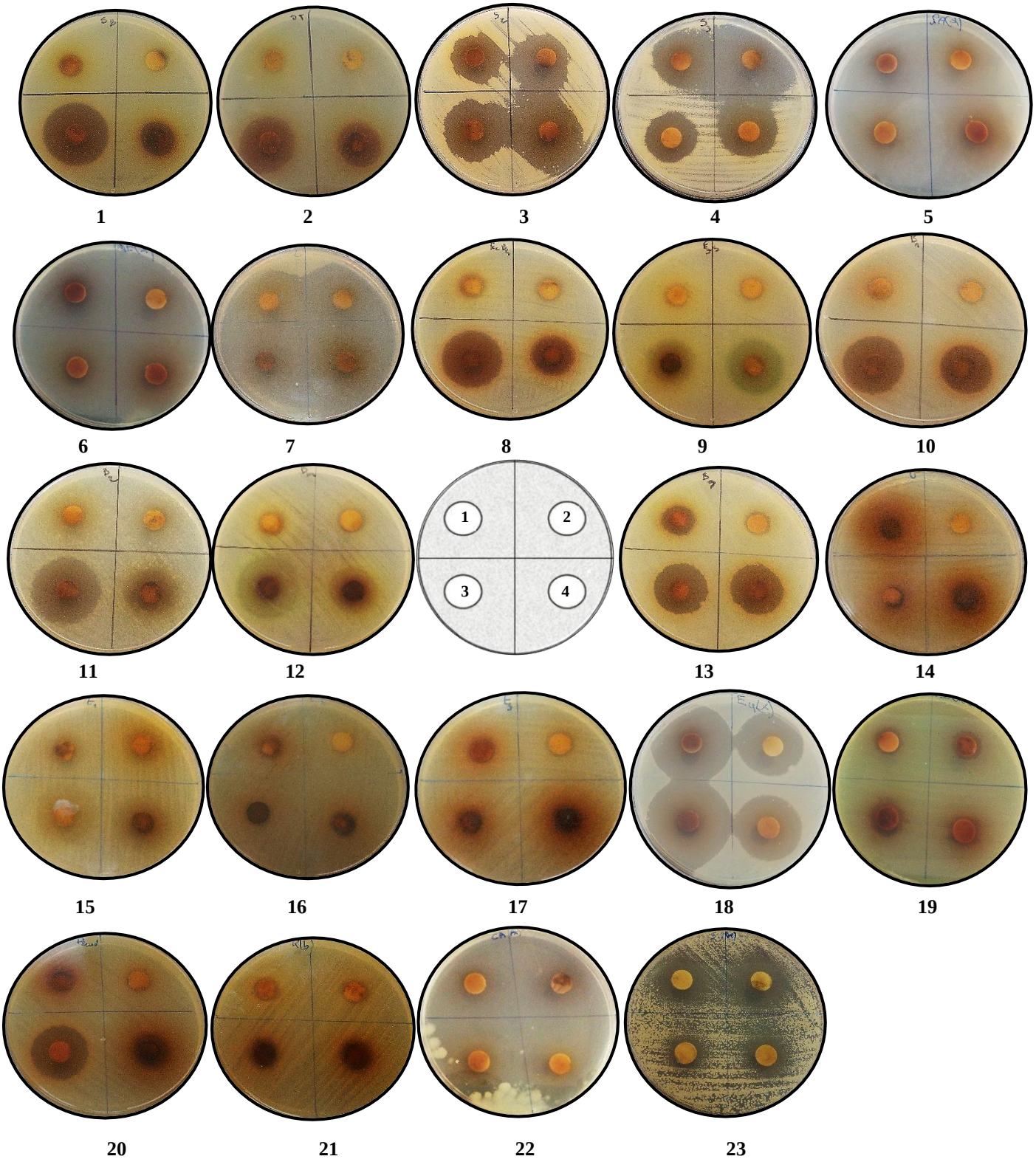


Figure 4. 13 Présente l'effet antimicrobien des extraits des associations. 1 :TAGE 2 :TAGA 3 :TEGE 4 :TEGA 1 :*S.aureus* ATCC43300- 2 :*S.aureus* ATCC25923- 3 :*S.aureus* ATCC29213-4 :S.*aureus* isolé- 5 :*S.aureus* ATCC6538-6 :*S.epidermidis* ATCC12228- 7:*L.monocytogenes* ATCC15313- 8:*E.feacalis* ATCC29212- 9 :*E.feacalis* ATCC65669-10 :*B.subtilis* isolé - 11:*B.subtilis* ATCC23857 – 12 : *B.subtilis* ATCC6631- 13 :*B.amyloliquefaciens* ATCC2350-14 :*P.mirabilis* isolé- 15 :*E.coli* ATCC25922- 16 :*E.coli* ATCC25622 -17 :E.coli isolé- 18 :*E.coli* ATCC11150-19 :*P.aeruginosa* ATCC9027- 20 :*P.aeruginosa* isolé- 21 :*K.pneumoniae* ATCC 4352- 22 :*C.albicans* ATCC19763- 23 :*S.cerevisiae* ATCC19763.

Les resultats d'association presentés dans la figure4.12 indique que chez prèsque toutes les souches référencées de *staphylococcus sp et L. monocytogène* ATCC 15313, les zone inhibitrices de l'extrait TEGE sont les plus grandes avec un diametre de 40mm, suivez par les valeurs de l'extrait TEGA avec des zones comprisent entre 25-40mm. par contre les *bacillus sp* prèsentent une sensibilitè intermèdiare aux extraits testés. Pourtant, l'extrait acétonique de thym (TA) perd son pouvoir intibacterien important (diminué) sur *S.aureus* ATCC 29213 et *E.feacalis* ATCC 29212, *E.feacalis* ATCC 6569 quand il été combiné avec les autres extraits, donc on observe un effet inhibiteur de l'activité due à l'association.

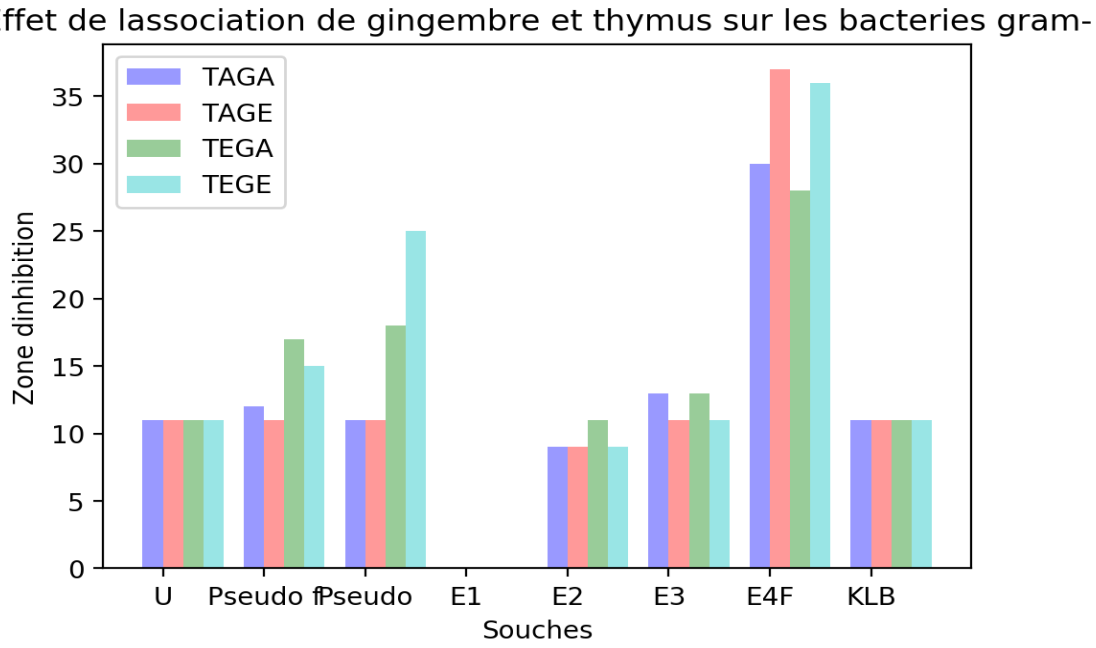


Figure 4. 14 iIllustre effet de l'association sur les bactéries gram- U : P.mirabilis isolé –Pseudo f : p.aerogenosae ATCC 9027– Pseudo : p.aerogenosae isolé – E1 : E.coli ATCC25922 – E2 : E.coli ATCC25622 –E3: E.coli isolé – E4F: E.coli ATCC4352–KLB: K.pneumoniae ATCC 9027

Par ailleurs, les bactéries gram- ont montré une résistance envers ces extraits (voir figure4.14), mis à part *E.coli* ATCC4352 qu'a présenté une forte sensibilité avec des zones d'inhibitions qui dépassent 25mm. Par contre *P.aerogenosa* isolé ne montre aucune sensibilité envers tous les extraits de thym seul, et de gingembre seul testés auparavant, mais cette souche devient sensible vis-à-vis GETE avec une zone de 25mm, on peut dire qu'on a eu une potentialisation de l'effet des extraits après leurs combinaison.

En outre, dans la figure4.15, l'effet inhibitrice des extraits d'association sur les souches fongiques a été caractérisé par des zones d'inhibition supérieures à 18mm, plus précisément *C.albicans* montre une forte sensibilité avec les quatre extraits de l'association avec une zone qui atteint jusqu'à 40mm, d'où un effet de potentialisation.

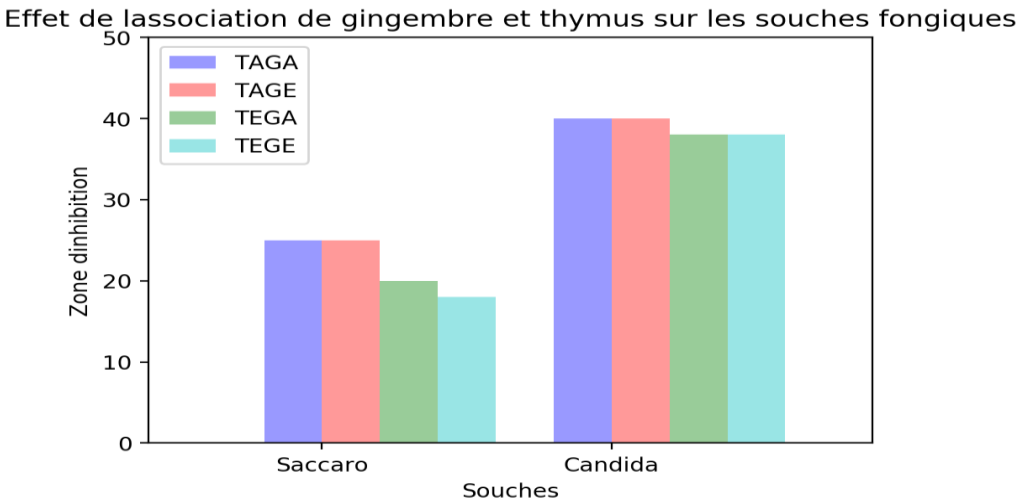


Figure 4. 15 présente effet de l'association des extraits sur les souches fongique, Saccaro : *S.cervisiae* ATCC 19763 –Candida : *C.albicans* ATCC 10231

Dans la figure 4.16, les médianes des extraits (TAGA) et (TAGE) sont entre 10 et 15mm suivi par l'extrait (TEGA) avec une médiane de 22 mm, tandis que la médiane de l'extrait éthanolique de gingembre et thym (TEGE) est 24.5mm qui a une valeur maximale de 40 mm, ainsi que Q1 dépasse 15mm et Q3 égale à 38mm, ce qui indique que cet extrait est le meilleur par rapport aux autres.

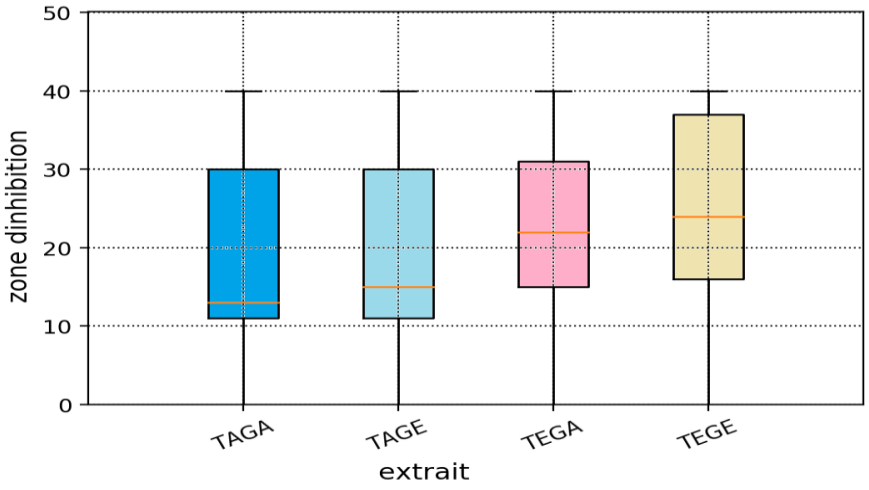


Figure 4. 16 Présente l'effet moyen de différents extraits de l'association de *Z.officinale* et *T.vulgaris.*

D'après nous résultats, Le meilleur effet synergique a été obtenu par les extraits TEGE suivi par TEGA vis-à-vis toutes les souches testés (P_{value}=0.052), cela a été traduit par l'augmentation de zone d'inhibition. Par contre, un effet antagoniste a été observé par l'interaction de l'extrait acétonique de *Thymus vulgaris* avec les extraits de gingembre, cela s'est traduit par une diminution de la zone d'inhibition. Donc l'effet des interactions entre les extraits dépend de l'interaction de leurs composants (Katryna *et al*. 2012).

Ainsi, d'autres travaux ont évalué l'effet de la combinaison de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. avec d'autres huiles essentielles comme, les huiles de laurier, d'orange amère, de menthe, de camphre, de myrte, et du romarin. Ils ont trouvés que l'addition du thym, a permis d'augmenter l'effet inhibiteur de leurs solutions (Katryna *et al*. (2012), Benaziza *et al.* (2017), Aussi, Oussalah *et al*. (2007), ont rapporté que la différence dans les activités antibactériennes des huiles essentielles peut être liée à la concentration, à la nature et le contenu, aux groupements fonctionnels, à la configuration des composés et leurs interactions synergiques possibles.

2.5 Comparaison entre l'efficacité des extraits avec les antibiotiques

Les *staphylococcus aureus* ont montré une variation de la sensibilité entre les antibiotiques et les extraits, *S.aureus* ATCC 29213 présente une sensibilité dominante à l'extrait éthanolique de *thymus vulgaris* avec une valeur de 38.00mm supérieur à celles des antibiotiques utilisés. Alors que, *S.aureus* ATCC 43300 et *S.aureus* ATCC 25923 ont présenté une sensibilité élevée à l'amoxicilline jusqu'à 50mm, suivie par une sensibilité similaire vis-à-vis l'extrait éthanolique de *T.vulgaris* TE, et ce de l'association TEGE avec des zones d'inhibitions qui dépasse 40mm. Ainsi que, l'effet de Gentamicine et l'extrait éthanolique de gingembre GE est identique sur la souche *S.aureus* ATCC 43300 avec des zones d'inhibition proches de 30mm. Et pour les autres bactéries à gram positif ont présenté une sensibilité dominante des trois antibiotiques par apport aux extraits testés (Voir l'annexe B).

Il est important de noté que, l'effet de l'extrait de l'association entre thym et gingembre TEGE montre une sensibilité vraiment élevée (40mm) par rapport à celles de antibiotiques (≈25mm) vis-à-vis *E.coli* ATCC11150. De même, cet extrait montre une sensibilité similaire à Gentamicine vis-à-vis *P.aerogenosae isolé.* Tandis que, *C.albicans* ATCC 10231 a montré une sensibilité dominante pour l'extrait TEGE avec une zone de 38mm par contre elle résiste au antifongique Fluconazole (Voir l'annexe B).

3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

D'après les tests de l'activité antimicrobienne sur 23 souches, les résultats obtenus ont confirmé que les extraits éthanoliques de *T.vulgaris*, de *Z.officinal* et leur association sont les plus efficaces, vis-à-vis presque toutes les souches testés. Particulièrement, *S.aureus* ATCC 43300, *S.aureus* ATCC 6538, *L.monocytogene* ATCC 15313 et *B.subtilis* ATCC6631 ont présenté une sensibilité plus élevées. Afin de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis ces souches, on a utilisé la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats sont mentionnés dans les tableaux 4.5, 4.6 et 4.7 et les figures 4.17, 4.18 et 4.19.

Tableau 4. 5 Présente les valeurs de CMI de *Z.officinale.*

Les différentes dilutions de *Z.officinale* en mg/ml												
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	T
mg/ml	10^{2}	10^{1}	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	-
St	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SF	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 4. 6 Présente les valeurs de CMI de *T.vulgaris.*

Les différentes dilutions de *T.vulgaris* (TE) en mg/ml												
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	T
mg/ml	145	14.5	1.45	1.45. 10^{-1}	1.45. 10^{-2}	1.45. 10^{-3}	1.45. 10^{-4}	1.45. 10^{-5}	1.45. 10^{-6}	1.45. 10^{-7}	1.45. 10^{-8}	-
St	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SF	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lis	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau 4. 7 Présente les valeurs de CMI de l'association de thym, et de gingembre.

Les différentes dilutions de l'association en mg/ml												
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	T
mg/ml	122.5	12.25	1.225	1.225. 10^{-1}	1.225. 10^{-2}	1.225. 10^{-3}	1.225. 10^{-4}	1.225. 10^{-5}	1.225. 10^{-6}	1.225. 10^{-7}	1.225. 10^{-8}	-
St	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SF	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lis	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

D : dilution Et T : témoin. Mg/ml : la dose.

+ : présence de croissance bactérienne. - : absence de croissance bactérienne.

St : *S.aureus* ATCC 43300. SF :*S.aureus* ATCC 6538.

Lis :*L.monocytogenes* ATCC 15313 B3 : *B.subtilis* ATCC6631

Vu que l'apparition ou l'absence de trouble n'étais pas clairement apparu dans les dilutions préparées dans les tubes (voir annexe C), on a ensemencé des boites de gélose à partir de ces dilutions pour la confirmation de la prolifération de germes ou non.

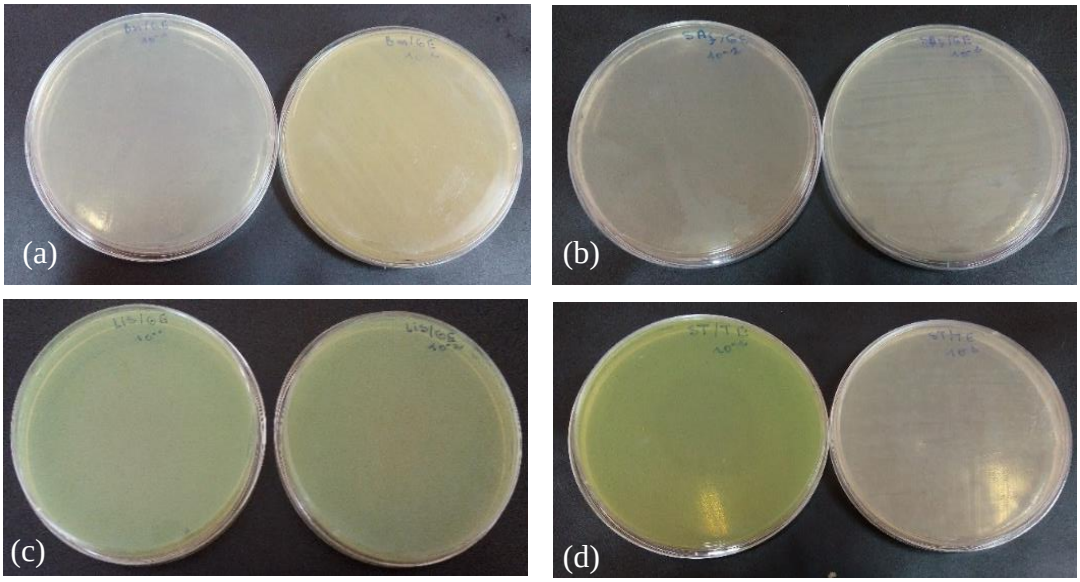


Figure 4. 17 Détermination de la CMI de l'extrait de gingembre (a)*B.subtilis* ATCC6631, (b) *S.aureus* ATCC 6538(c), *L.monocytogenes* ATCC 15313 et (d) *S.aureus* ATCC 43300.

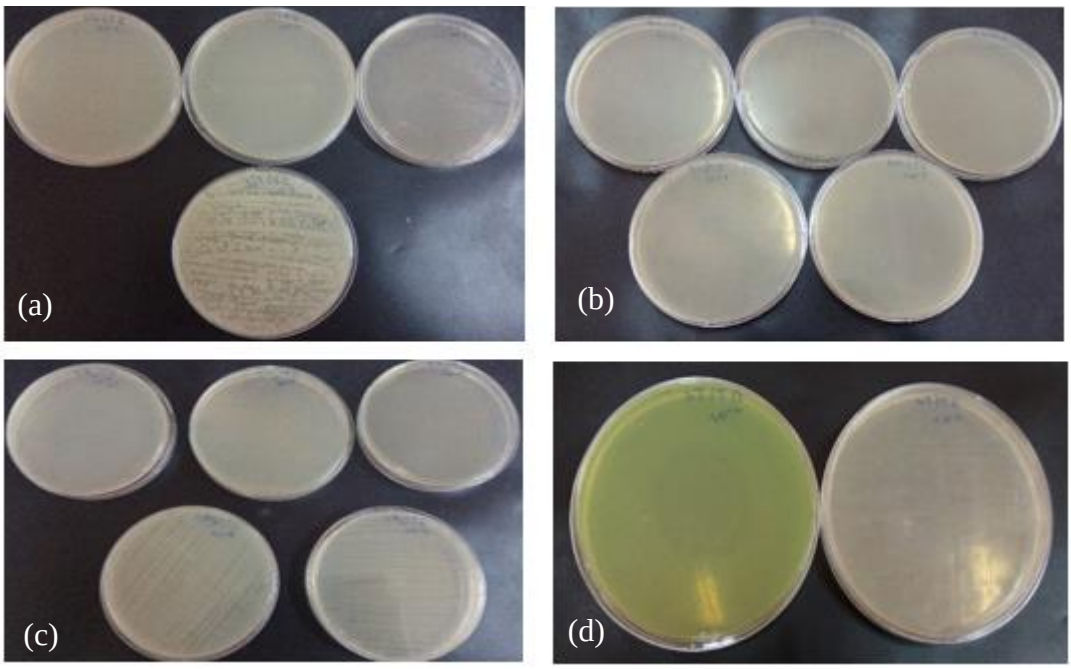


Figure 4. 18 Détermination de la CMI de l'extrait de thym (a) *L.monocytogenes* ATCC 15313, (b) *B.subtilis* ATCC6631, (c) *S.aureus* ATCC 6538, et (d) *S.aureus* ATCC 43300.

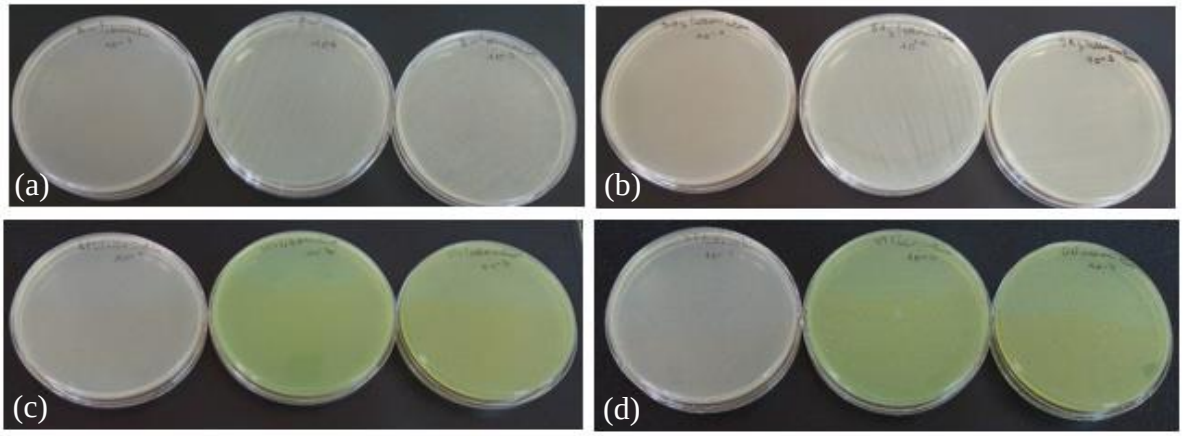


Figure 4. 19 Détermination de la CMI de l'extrait de l'association (a) *B.subtilis* ATCC6631, (b) *S.aureus* ATCC 6538, (c) *L.monocytogenes* ATCC 15313 et (d) *S.aureus* ATCC 43300.

Le tableau 4.5, 4.6 et 4.7 ont montrés les valeurs de CMI de *Z.officinale*, de *T. vulgaris* et leurs association respectivement, alors que les concentrations des dilutions D ont été calculé comme suite:

D1= poids de 1ml de l'extrait / 9ml (volume de milieu dans la 1ere dilution)

Les poids initial de chaque extraits : P_{Thym}= 1309mg, $P_{gingembre}$ = 900mg et $P_{association}$= 1104.5mg. Donc, les concentrations de la première dilution de l'extrait de gingembre, thym et celle de l'association sont 100mg/ml, 145mg/ml et 122.5mg/ml respectivement.

Les résultats obtenus montrent que la plus faible concentration minimale inhibitrice qui révélé une efficacité plus grand est de l'extrait de *T.vulgaris* 0.145mg/ml (dilution 10^{-4}) vis-à-vis de *B.subtilis* ATCC6631, suivi par une concentration de 1.145 mg/ml (dilution 10^{-3}) envers *L.monocytogene* ATCC 15313 et *S.aureus* ATCC 6538, ainsi que la souche *S.aureus* ATCC 43300 ne présente aucune sensibilité (voir tableau 4.6)

Contrairement à l'extrait éthanolique de *Z.officinale* qui a montré des valeurs de CMI plus élevé par rapport à ce de *T.vulgaris* la seule concentration minimale inhibitrice c'est 100 mg/ml marqué vis-à-vis *B.subtilis* ATCC6631 et *S.aureus* ATCC 6538, tandis que les deux autres souches *S.aureus* ATCC 43300 et *L.monocytogene* ATCC 15313 sont plus résistantes et ne montrent aucune CMI. (Voir tableau 4.5)

Et pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'extrait de l'association (TEGE), toutes les souches testées ont présenté une sensibilité avec une CMI de 122.5 mg/ml (dilution 10^{-1}), ces résultats sont illustrés dans le tableau 4,7.

Selon les résultats obtenu à partir de deux souches de *S.aureus* ATCC 6538 et *S.aureus* ATCC 43300 qui sont proches a ceux de Yakhlef G (2010) qui a testé l'extrait de thym sur deux souches de *staphylococus aureus*, une souche ne montre aucun sensibilité et l'autre souche est révèle une sensibilité de 0.312mg/ml.

La valeur de CMI obtenu de l'extrait de thym vis-à-vis *B.subtilus* présente une faible concentration (0.145mg/ml) qui a donné une meilleure efficacité par rapport au Tamerti.A *et al* (2017) qui ont trouvé que le CMI de *Bacillus subtilus* égale à 2.5 mg/ml. La valeur de CMI de l'extrait éthanolique de gingembre trouvée dans notre étude est relativement élevée (100mg/ml) par rapport à la valeur de CMI de l'extrait éthanolique et méthanolique de (0.0064 à20 mg/ml) vis-a-vis *S.aureus* et *B.sibtilus* trouvé par (Bhargava *et al*. 2012 ; Abd-Alrahman *et al*. 2013 ; Nikolić *et al*. 2014). Tandis que N Azu *et al* (2006) ne montre aucune sensibilité envers l'extrait éthanolique de *Z.officinale* au *Bacillus subtilus*. Ce qui n'est pas d'accord avec nos résultats.

4 L'évaluation de l'activité mycobacterienne

Les souches de *M. tuberculosis* sont classiquement identifiées par la morphologie des colonies sur les arêtes de gélose Lowenstein-Jensen, l'aspect de ces colonies est rugueux, beige a bords irréguliers en forme de chou-fleur. Les deux souches de *Mycobactérium tuberculosis* traitée par différents extraits : l'extrait éthanolique de gingembre (GE), extrait éthanolique de thym (TE) et leurs associations (TEGE) sont représentées dans la figure4.20.

La figure4.20 (c),4.20 (d) ne montre aucune prolifération de colonie à la surface de tubes de l'extrait éthanolique de thym (tubes 5 dans (c) et tube 4dans (d)) ce qui indique l'effet antimycobacteruim de thym. Parallèlement, l'effet inhibiteur de (TEGE) est bien apparent dans les tubes 6. D'autre part, les tubes de l'extrait éthanolique de gingembre (GE) et les témoins sans traitement ont donné des tapis bactériens (tubes3 dans (c et d). tube4 dans (c) et tube5 dans (d)). Le pouvoir antimycobacterien de *Zingiber officinale* et de *Thymus vulgaris* et de leurs constituants sur la croissance de *Mycobactérium tuberculosis* a été évalué par des différents travaux. En particulier, Hiserodt *et al.* 1998 a trouvé que le 10-gingerol présente une activité antimycobacterienne contre *Mycobacterium avium* (MIC: 25 µg/mL) et *Mycobacterium tuberculosis* (MIC: 50 µg/mL), ce qui n'est pas en accord avec nos résultats.

D'après les résultats obtenus, l'extrait éthanolique de thym a un effet antimycobacterien, et cela est confirmé par Jimenez-Arellanes *et al.* (2006) qui a évalué environ 50 espèces de plante médicinale, dont sept inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis*, et le *thymus vulgaris* est l'un d'entre eux. De plus, Vikrant Arya et *al*. (2011) l'extrait et l'huile essentielle de *thymus vulgaris* ont un effet anti-mycobacterienne grâce à la présence de un composent

phénolique qui est lutéoline. Ainsi, Botelho et *al.* (2007) and Kunle et *al*. (2003) ont trouvé que le carvacrol et lutéoline présente une activité antimicrobienne puissante sur les espèces de mycobacterium .

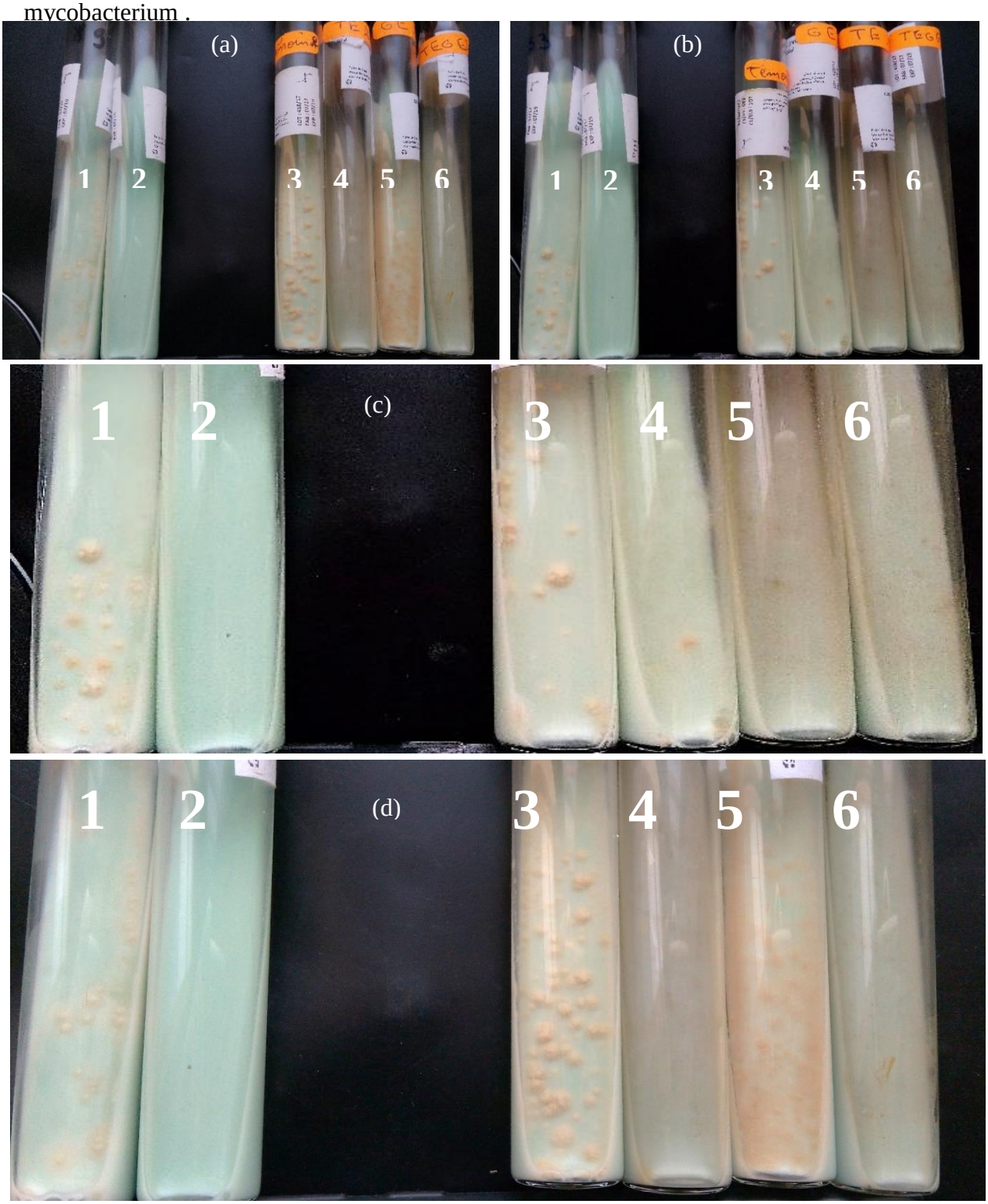


Figure 4. 20 Evaluation de l'activité antimycobacterienne. (a) ensemencement de prélèvement N°1. (d) zoom de prélèvement N°1. Tube1: prélèvement de patient. Tube2: tube non ensemencé. Tube3:Témoin. Tube4:TE. Tube5:GE. Tube6: TEGE. (b) ensemencement de prélèvement N°2. (c) zoom de prélèvement N°2. Tube1: prélèvement de patient. Tube2: tube non ensemencé. Tube3:Témoin. Tube4:GE. Tube5:TE. Tube6: TEGE.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressées à l'extraction et à la récupération des extraits de *Zingiber officinale,* de *Thymus vulgaris* et de leurs associations par une macération, à déterminer leurs composition chimique, à l'étude de l'activité antibactérienne et enfin à l'évaluation de leurs activités antimycobactériennes.

L'obtention des extraits par la macération en utilisant des solvants différents reste une méthode simple et efficace, et donne des rendements intéressants. Le calcul des rendements moyens des extraits proviennent des plantes nous a révélé des valeurs importantes pour Z.*officinale* par rapport *T.vulgaris.* Alors que le rendement des extraits d'une même plante varié selon la nature de solvant utilisé.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits ainsi que leurs mélanges a été déterminée sur 23 souches microbiennes selon la méthode de diffusion de disque. Cette technique a montré que la majorité des extraits étudiés possèdent un effet inhibiteur contre presque tous les souches testées. Ces souches ont présenté une sensibilité important à l'action des extraits surtouts à leurs associations avec des diamètres d'inhibition compris entre15-40mm. Les valeurs de la concentration minimale inhibitrice CMI obtenues varient d'un extrait à un autre, l'extrait éthanolique de *Thymus vulgaris* possède la plus petite CMI (0.145mg/ml) qui se traduit par une meilleure efficacité suivi par la valeur de l'extrait éthanolique de gingembre qui est (100mg/ml), et la plus grande valeur de CMI est celle de l'extrait de l'association (122.5 mg/ml).

D'après nos résultats, l'activité antimicrobienne a été modifié selon les solvants utilisés, l'éthanol s'est révélé être un bon solvant pour l'extraction des composés actifs antimicrobiens. Par conséquent, les extraits éthanoliques purs de gingembre, de thym et ce de leur association ont été choisis car pour étudier l'activité antimicobacterienne ces extraits possèdent la meilleure activité antimicrobienne.

Quant aux résultats enregistrés des tests de l'évaluation de l'effet antimycobactérien des extraits éthanolique de gingembre (GE), de thymus (TE) et leurs association (TEGE) montre

que les extraits TE et TEGE ont un pouvoir antimycobactérien énorme ce qui a été confirmé par l'absence totale de colonies à la surface de tubes contenant ces extraits.

Cette étude notée le pouvoir antimicrobienne et antimycobacterium des extraits provient de plantes médicinales (*Z.officiale* et *T.vulgaris*). Bien que cette étude est l'une des nombreuses études qui ont étudié l'effet antimycobacterium de certain plantes médicinale, l'originalité de notre étude c'est l'utilisation de *thymus vulgaris* d'origine de Médéa (Algérie) ce qui nous a permis de comparer les résultats avec d'autre études.

D'après nos résultats, l'association ente le gingembre et le thym a montré une potentialisation de l'effet inhibiteur contre les souches testées. Donc il est nécessaire de faire d'autres études pour voir l'effet de l'association d'autre plantes médicinales.

Perspectives

Grâce à ce mémoire est possible de reconnaître que beaucoup de travail reste encore à faire et plusieurs parties ont besoin d'être étudié.

En se basant sur cette étude, et pour bien comprendre l'activité antimicrobienne de ces plantes, il est recommandé de déterminer le mode d'action pour chaque composant et les mécanismes de l'activité antimicrobienne contre les bactéries pathogènes et les champignons.

De plus, il est important d'étudier l'activité antimycobactérienne de ces deux plantes afin de préciser les composants responsable de cet effet et pour déterminer le mode et le mécanisme d'action de ces composés sur *Mycobacterium tuberculosis*, dans le but de développer un nouveau traitement naturel sans effets secondaires et pour lutter contre les souches multi-résistances. Et enfin, il faut déterminer autres activités biologiques de *T.vulgaris* et *Z.officinale* à l'exemple de l'activité anticancéreuse et antidiabétique.

BIBELIOGRAPHIE

BIBELIOGRAPHIE

Abu-Shanab B, Adwan G, Abu-Safiya D, Jarrar N, Adwan K. (2004). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine.Turk J Biol, 28: 99-102.

Abu-Darwish, M.S., Al-Ramamneh, E.A., Kyslychenko, V.S., Karpiuk, U.V., 2012. The antimicrobial activity of essential oils and extracts of some medicinal plants grown in Ash-shoubak region—South of Jordan. Pak. J. Pharm. Sci. 25 (1), 239–246.

Andrew R. Bassett,* Charlotte Tibbit, Chris P. Ponting, and Ji-Long Liu* Mutagenesis and homologous recombination in *Drosophila* cell lines using CRISPR/Cas9.journal of Biologie Open . 2014 Jan 15; 3(1): 42–49.

Abd-Alrahman S.H., Salem-Bekhit M.M., Yakout S.M. et Elhalwagy M.A. (2013). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Various Crude Extracts of Ginger (Zingiber officinale Roscoe). Journal of Pure And Applied Microbiology. 7 : 309-316.

Akimoto, M., Iizuka, M., Kanematsu, R., Yoshida, M., Takenaga, K., 2015. Anticancer effect of ginger extractagainst pancreatic cancer cells mainly through reactive oxygen species-mediated autotic cell death.PLoS One 10 (5), e0126605.

Akoachere, J.F.T.K., Ndip, R.N., Chenwi, E.B., NDIP, L.M., Njock, T.E. and Anong, D.N. (2002) Antibacterial effect of Zingiber officinale and Garcinia kola on respiratory tract pathogens. East African Medical Journal 79: 588–592.

Ali BH, Blunden G, Tanira MO, Nemmar A. (2008). Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (Zingiber officinale Roscoe): a review of recent research. Food Chem Toxicol; 46(2): 409-20

Amari Sihem (2016). Étude phytochimique et évaluation de l'activité antibactérienne et antioxydante de deux extraits de la plante Zingiber officinale. Mémoire Master En Sciences Biologiques, 40-43 p.

Azu N, Onyeagba R. Antimicrobial Properties Of Extracts Of Allium cepa (Onions) and Zingiber officinale (Ginger) On Escherichia coli, Salmonella typhi and Bacillus subtilis. The Internet Journal of Tropical Medicine. 2007;3:1–10.

Baliga, M.S., Latheef, L., Haniadka, R., Fazal, F., Chacko, J., Arora, R., 2013. Chapter 41—ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) in the treatment and prevention of arthritis. In: Preedy, R.R.W.R. (Ed.), Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. Academic Press, San Diego, pp. 529–544.

Bakkali F,averbecck D, review MI-biological effects of essential oils – a review food and chemical toxicology; vol. 46; pp 446-475. 2008.

Bajpai VK, Al-Reza SM, Choi UK, Lee JH, Kang SC (2009) Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of Metasequioa glyptostroboides Miki ex Hu. Food Chem Toxicol 47: 1876–1883.

Blackmore CG, McNaughton PA, van Veen HW: Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. Mol Membr Biol 2001, 18:97-103.

Bouhdid S., Idaomar, M. ; Zhiri, A.; Bouhdid, D.; Skali, N. S. ; Abrini, J. (2006) Thymus essential oils: chemical composition and in vitro antioxidant and antibacterial activities. Biochimie, Substances Naturelles et environnement, Congrés Intrntional de biochimies, Agadir. 324-327.

Bhargava S., Dhabhai K., Batra A., Sharma A. et Malhotra B. (2012). Zingiber Officinale : Chemical and phytochemical screening and evaluation of its antimicrobial activities. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 4(1) : 360-364.

Braga M.E.M., Moreschi S.R.M., Meireles M.A.A. (2006). Effects of Supercritical Fluid Extraction on Curcuma longa L. and Zingiber officinale R. Starches, Carbohydrate Polymers, 63: 340-346 p

Burt S., 2004.- Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food and Microbiology. 94: 223-253.

Bruneton J, 1999, Pharmacognosie. Phytochimie, plantes médicinales. 3 ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris, 1120p.

Brown A.C., Shah C., Liu J., Pham J.T.H., Zhang J.G., Jadus M.R. 2009. Ginger's (Zingiber officinale Roscoe) Inhibition of Rat Colonic Adenocarcinoma Cells Proliferation and Angiogenesis In Vitro. Phytotherapy Research, 23, 640-645.

Chen IN, Chang CC, Ng CC, Wang CY, Shyu YT, Chang TL. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Zingiberaceous Plants in Taiwan. Plants Foods Hum Nutr. 2008;63:15–20.

Chrubasik, S., Pittler, M.H., Roufogalis, B.D., 2005, Zingiberis rhizoma: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. Phytomedicine 12, 684-701.

Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG (2000) The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca alternifolia (tea tree oil). J. Appl. Microbiol. 88: 170-175

Cilemine C.C., micales J.A., Ferge L.& young R.A (1999). Efficacy of pinosylvins against white rot and brown rot fungi. Holzforschug. 53, 491-497.

DERWICH E., BENZIANE Z. ET BOUKIR A., 2009. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of Laurus nobilis from Morocco. Aust. J. Basic et Appl. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, pp: 3818-3824.

Dimitrijevic S.I, mihajlovski K.R, antonovic D.G, Milanovic-Stevanovic M.R, mijin D.Z, A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from thymus vulgaris L. and origanum vulgare L. food chemistry; vol .104; pp 774-782. 2007

Duraffourd C., D'Hervicourt L. et Lapraz J. C. (1990) - Cahiers de phytothérapie clinique. 1. Examens de laboratoires galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2ème éd. Masson, Paris.

Dorman S.L , Deans H.J., 2002. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plants volatil oil .J. ofappel . microbial vo1.88, pp 308-316.

Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytotherapy research, 21(4), 308-323ils and various Extracts of Thymus eigii. J. Agric. Food Chem., 52, 1132 – 1137.

El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induce oxidative stress in male rats. Toxicon 57 (7–8), 984–991.
Ettehad D, Schaaf HS, Seddon JA, Cooke GS, Ford N. Treatment outcomes for children with multidrug-resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. 2012;12(6):449–456.

Ettayebi K., El Yamani J., Rossi-Hassani B. D. (2000) Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in Listeria monocytogenes and Bacillus subtilis. FEMS Microbiology Letters. 183:191-195.

Fauchère J.L et Avril J.L., 2002 bactériologie générale et médicinale. Ed. Ellipses, Paris. 365p.

Fadli M, Saad A, Sayadi S, et al. (2012) Antibacterial activity of Thymus maroccanus and Thymus broussonetii essential oils against nosocomial infection— bacteria and their synergistic potential with antibiotics.

Feng, W. and X. Zheng. 2007. Essencial oils to control *Alternaria alternate* in vitro in vivo. Food control, 18:1126-1130.

Ficker CEA, Smith ML, Susiarti SB, Leaman DJ, Arnason JCIT (2003). Inhibition of human pathogenic fungi by members of Zingiberaceae used by the Kenyah (Indonesian Borneo). J Ethnopharmacol, 85, 289–293

Gachkar L, yedgari D, rezaei M.B , Taghezadeh M, AstenahS.A, Rasooli L .chemical and biological characteristics of cuminum cyminum and Rosmarinus officinalis essential oils food chemistry; vol. 102; pp:898-904. 2007

Giamperi L, Fraternele D ,. Ricci D ., 2002, the in vitro action of essential oil on different organisms . journal of essential oil research journal of the american oil chemistry society. Vol 55. Pp 312-318.

Gherman C, Culea M, Cozar O-Comparative analysis of some active principles of herb plants by GC/MS-Talanta; 2000, Vol. 53; PP 253-262.

Gigon. F. (2012). Le gingembre, une épice contre la nausée. Phéto, 10:87-91 p.

Gull I., Saeed M., Shaukat H., Aslam S.M., Samra Z.Q. et Athar A.M. (2012). Inhibitory effects of Allium sativum and Zingiber officinale extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 11 (8) : 1-6.

Green R.J. (2004). Antioxydant activity of peanut plant tissues. Master's Thesis. Department Of Food Science. Faculty of North Carolina State University (USA).

Hanim Mohd Habib; Suzana Makpol[l]; Noor Aini Abdul Hamid; Srijit Das; Wan Zurinah Wan Ngah; Yasmin Anum Mohd Yusof., 2008.,Ginger extract (*Zingiber officinale*) has anti-cancer and anti-inflammatory effects on ethionine-induced hepatoma rats.vol.63 no.6**.**

H. Amiri, "Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus* species," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, Article ID 728065, 2012.

Hilan C, Sfeir R, Jawish D et Aitour S-Huiles essentielles de certaines plantes medicinales libanaises de la famille des Lamiaceae-Lebanese Science Journal ; 2006, Vol.7 ; N°2.

H.M. Wisam., T.K. Nahla**,.** Nahla Tariq**.** Antioxidant Activities of Thyme Extracts**.** Pakistan Journal of Nutrition.2017 **.**17(1):46.

Hosseinzadeh, S., Kukhdan, A., Hosseini, A., Armand, R., 2015. The application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: a review. Glob. J. Pharmacol. 9 (3), 260–266.

Hughes I (2002). Isoprenoid compounds and phenolic plant constituents, Elsevier, New York, N.Y. Sci. Afr. Mag. 9(56).

Hiserodt, R. D., Franzblau, S. G., & Rosen, R. T. (1998). Isolation of 6-, 8-, and 10-Gingerol from Ginger Rhizome by HPLC and Preliminary Evaluation of Inhibition of Mycobacterium a vium and Mycobacterium t uberculosis. Journal of agricultural and food chemistry, 46(7), 2504-2508.

Iserin P., Masson M., Restellini J. P., Ybert E., De Laage de Meux A., Moulard F., Zha E., De la Roque R., De la Roque O., Vican P., Deelesalle –Féat T., Biaujeaud M.,Ringuet J., Bloth J. et Botrel A. 2001. Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins. Ed Larousse. p10-12

Indu, M. N., Hatha, A. A. M., Abirosh, C., Harsha, U., & Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south-Indian spices against serotypes of Escherichia coli, Salmonella, Listeria monocytogenes and Aeromonas hydrophila. Brazilian Journal of Microbiology, 37(2), 153-158.

Jagetia GC., Baliga M.S., Venkatesh P., Ulloor J.N.;(2003).Influence of ginger rhizome (Zingiber officinaleRosc) on survival, glutathione and lipid peroxidation in mice after whole-body exposure to gamma radiation. Radiat Res, 160(5) ,584-9.

Jiménez-Arellanes A, Martinez R, Garcia R, León-Diaz R, Aluna– Herrera J, Molina –Salinas G et al. Thymus vulgaris à potentiel source of antituberculosis compound. Pharmacologyonine. 2006; (3): 569-574.

Kalemba D. & Kunicka A., 2003.- Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicianl Chemistry*. **10**: 813-829.

Kechkar M., 2008. Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. *Mémoire de magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie. 99p.

Kivilompolo, M., Hyotylainen, T., (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. J. Chromatogr. A 1145 (1–2), 155–164.

Kristina Lozˇiene, Petras R. Venskutonis, Ausˇra Sˇipailiene, Juozas Labokas (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different Thymus pulegioides L. chemotype, Food Chemistry 103.546–559.

Kuete, V. (2013). Medicinal plant research in Africa: Pharmacology and chemistry. Newnes.

Lee, K.G., Shibamoto, T., 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. J. Agric. Food Chem. 50 (17), 4947–4952.

Liu C, Bayer A, Cosgrove S, (**2011**) Clinical practice guide- lines by the infectious diseases Society of America for the treat- ment of methicillin resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children. Clin Infect Dis 52:1–38 15

Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C. N., Tang, G. Y., & Li, H. B. (2017). Antibacterial and antifungal activities of spices. International journal of molecular sciences, 18(6), 1283.

Liu Z (2011) Diterpene Glycosides as Natural Solubilizers. United States Patent Application Publication. Patent Department Taylor, Porter, Brooks & Philips. omedicine 19: 464–71.

Mata a.t, proença C, Ferreira A.R, Serralheiro M.L.M, nogueira J.M.F, araujo M.E.M, - antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portugeuse food species- food chemistry; vol. 103; pp 778-786.2007.

Mebarki Nedjoub.(2010), extraction de l'huile essentielle de *thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne.,universitè d'Ahmed Bougara Boumerdes..

Miladi, H., Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., Ammar, E., (2013). Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. Nat. Sci. 5, 729–739.

Michielin EM, Salvador AA, Riehl CA, Smânia A Jr, Smânia EF, et al. (2009) Chemical composition and antibacterial activity of Cordia verbenacea extracts obtained by different methods. Bioresource Tech 100: 6615–6623.

Mobasseri M, Mahluji S1, Attari VE, Payahoo L,Ostadrahimi A, Golzari SE. (2013). Effect of ginger (Zingiber officinale) on plasma glucose level, HbA1c and insulin sensitivity in type 2 Diabetic patients. Int J Food Sci Nutr. Sept, 64(6):682-6 p.

Mozaffari-Khosravi H1, Talaei B2, Jalali BA3, Najarzadeh A2, Mozayan MR4 (2014). The effect of ginger powder supplementation on insulin resistance and glycemie indices in patients with type 2 diabetes: a randomized, doubleblind,placebo-controlled trial. Complement Ther Med. Feb, 22(1):9-16p.

Morita H., Itokawa H., Osawa K., Saekit,, Yasuda H., Takeya K., (1998)**.** Antibacterial activity of Eucalyptus g lobulus and ginger on cariogenic bacteria and its inhibitor y effect on glucosyltransferase. *Natural Medicines* (Tokyo). 52, 32-37.

Nabavi S.M., Nabavi S.F., Alinezhad H., Zare M. and Azimi R., (2012) Biological activities of fl avonoid-rich fractions of Eryngium Caucasicum Trautv. European review for medical and pharmacological sciences, 16(l 3), 81-87.

Nadia ZAYYAD, Abdellah FARAH² et Jamila BAHHOU ., 2015, Chemical analysis and antibacterial activity of essential oils from three species of Thymus *: Thymus zygis, T. algeriensis,* and *T. bleicherianus, jornal Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Vol. 83, 2014, p. 118 – 132.*

Ncube N, Afolayan SAJ, Okoh AI (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. Afr. J. Biotechnol. 7(12): 1797-1806. Nene Y, Thapilyal L (2002). Poisoned food technique of fungicides in plant disease control (3rd eds). Oxford and IBH Publishing Company, New Delhi.

Nikolić M., Vasić S., Đurđević J., Stefanović O. et Čomić L. (2014). Antibacterial and antibiofilm activity of ginger (Zingiber Officinale (Roscoe)) ethanolic extract. Kragujevac Journal of Science. 36: 129-136.

Nkouaya Mbanjo, E., Tchoumbougnang, M., Jazet Dongmo, P., Sameza, M., Amvam Zollo, P., Menut, C., 2007. Mosquito larvicidal activity of essential oils of *Cymbopogon citratus* and *Thymus vulgaris* grown in Cameroon.

Nordmann P. (2006). L'émergence de la résistance plasmidique aux quinolones chez les entérobactéries. Pathologie Biologie. 54: 7-9

Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, F.C., Carle, R., Schnitzler, P., 2006. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. Planta Med. 72 (15), 1378–1382.

Ocana, A., Reglero, G., 2012. Effects of Thyme extract oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on cytokine production and gene expression of oxLDL-stimulated THP-1-macrophages. J. Obes. 2012, 104706.

Oussou K.R., 2009. –Etude chimique et activité biologiques des huiles essentielles de sept plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. Doctorat de l'Université de Cocody-Abidjan, 241p.

Oussalah M, caillet S, saucier L, lacroix M- antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a pseudomonas putida strain isolated from meat-meat science; vol. 73; pp 236-244. 2006.

Oussalah, M., Caillet, S., Salmiéri, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2004). Antimicrobial and antioxidante Vects of milk protein-based Wlm containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5598–5605

Park M, Bae J, Lee D-S. (2008).Antibacterial Activity of [10]-Gingerol and [12]-Gingerol isolated from Ginger Rhizome Against Periodontal Bacteria. Phytotherapy Research; 22:1446-49.

Perriot J., Underner M.2013. Complications des tuberculoses disséminées, Complications of disseminated tuberculosis. Revue des Maladies RespiratoiresVolume 30, numéro 1 pages 8-12.

Pinto E., Pinta –vas C, Salgueiro L., Gonçalves M.J , costa-de-oliveira S., Cavaleiro C., Palmeira A., Rodreiguez A and Martinez A-de oliveira J.2006– antifungal activity of the essential oil of thymus Pulegioideson Candida, Aspargillus and dermatophyte species –journal of medical microbiology; Vol. 55; pp 1367-1373..

Platel K, Srinivasan K. (2004). Digestive stimulant action of species: a myth or reality? Indian J Med Res May, 119(5):167-79 p.

Reddy, P., Kandisa, R., Varsha, P., Satyam, S., 2014. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. Med. Aromat. Plants 3, 164.

Rezatofighi, S.E., Seydabadi, A., Seyyed Nejad, S.M., 2014. Evaluating the efficacy of *Achillea millefolium* and *Thymus vulgaris* extracts against Newcastle Disease Virus *in vivo*. Jundishapur J. Microbiol. 7 (2), e9016.

Rubila S, Ranganathan TV. Evaluation of phytochemical constituents in various heat treatments of Zingiber officinale Roscoe and in vitro antioxidant assay systems. Int Res J of Biol Sci 2014; 3(11): 54-58.

Sabulal AB, Dan MB, Anil John AJa, Kurup RA, Pradeep NSC, Valsamma RKC, George V (2006). Caryophyllene-rich rhizome oil of Zingiber nimmonii from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. Phytochem, 67, 2469–2473.

Sacchati G., maietti S., Muzzoli M., Scagnialti M., Manfredini S., Radice M., Bruni R- comparative evaluation of 11 essential oil of different originas functional antioxidant, antiradicals and antimicrobials in foods- food chemistry; Vol. 91; pp 621-632.2005.

Schmitz,P., 2015. *Thymus vulgaris*. Available from: http://ecoport.org/ep?Plant=2441&entityType=PLCR**&entityDisplayCategory=full Planta Med. 73 (9), P_329.

Sfeir, J., Lefrancois, C., Baudoux, D., Derbre, S., Licznar, P., 2013. *In vitro* antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2013, 269161.

Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Ciecwierz, J., Denys, P., Kowalczyk, E., 2011. Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. Med. Chem. 7 (6), 674–689.

Singh G, Kapoor IP, Singh P, de Heluani CS, de Lampasona MP, et al. (2008) Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of Zingiber officinale. Food and Chem Toxicol 46: 3295–3302.

Soliman K.M. & Badeaa R.I. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chem. Toxicol. 40, 1669–1675.

Souza E.L., Oliveira C.E.V., Stamford T.L.M., Conceição M.L. & Gomes Neto N.J. 2013. Influence of carvacrol and thymol on the physiological attributes, entérotoxine production and surface characteristics of Staphylococcus aureus strains isolated from foods. Braz. J. Microbiol., 44 (1), 29-35.

Stahul Biskup E., Saez F. (2002) Thyme the genus thymus Taylor and Francis.331pp in Ghasemi Pirbalouti A., Rahimmalek M ., Malekpoor F., Karim A. (2011). Variation in antimicrobial activity thymol and carvacrol content of wild population of thymus *daenensis subs pdaenensis* Celak. Plants Omics Journal., 4:209-214.

Suppakul P., Miltz J., Sonneveld K. et Bigger S. W. (2003) – Antimicrobial properties of Basil and its possible application in food packaging. J.Agric. Food Chem., 51: 3197-32.

Surk K.I. & Nielsen P.V., 2003. - Antifungal activity of essential oils evalued by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. Journal Applied Microbiology; 99: 665-674.

Traoré M. C., 2006. É tude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. *Thèse de doctorat*. Université de Bamako, Mali, pp. 175p

Tabak, M. , Armon, R. , Potasman, I. , Neeman, I. (1996). Invetro inhibition of Helécobacter pylori by extracts of thyme. J. Appl. Bacteriol. 8: 667-672.

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

Tohidpour A, Sattari M, Omidbaigi R, Yadegar A, Nazemi J (2010) Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Phytomedicine. 17: 142-145.

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

Underner M , J. Perriot ., 2013. Complications des tuberculoses disséminées Complications of disseminated tuberculosis. Revue des Maladies Respiratoires Volume 30, numéro 1 pages 8-12 Doi : 10.1016.

Varga E. Anna Bardocz Györgyi Horváth Agnes Belak., 2015. Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different Thymus extracts.journal of Farmacia 63(3).

Vigo E., Cepeda A., Gualillo O., Pérez-Fernandez R, 2004, In-vitro anti-inflammatory effect of Eucalyptus globulus and Thymus vulgaris: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. J Pharm Pharmacol, 56(2), 257-263p

Vikrant Arya. Anti-Tubercular Plants. International Journal of PharmTech Research 2011; 3: 872-880.

Vila, R.; Mundina, M.; Tomi, F.; FurSan, R.; Zacchino, S.; Casanova, J.; Canigureal, S. (2002). Planta med. 68, 164-167.

Wang H and Bun TNg (2005). An antifungal protein from ginger rhizomes. Biochem Biophys Res Commun, 336, 100–104

Wang ZY, Khan WA, Bickers DR, Mukhtar H (1989) *Protection against polycyclic aromatic hydrocarbon-induced skin tumor initiation in mice by green tea polyphenols*. *Carcinogenesis* **10**: 411–415

Wang, M., Li., j.,HO., G.S ., peng , x. and Ho, C.T., (1998). Isolation and identification of antioxidative flavenoid glycosides from thyme (thymus vulgaris) journal food lipids 5, pp .

Wannissorn B, Jarikasem S, Siriwangchai T, Thubthimthed S (2005) Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia. 76: 233-236.

Wilson, P.B., 2015. Ginger (*Zingiber officinale*) as an analgesic and ergogenic aid in sport: a systemic review.J. Strength Cond. Res. 29 (10), 2980–2995.

Wilkinson J.M., 2006. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapiter VIII. pp.157-165. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. *WILEY-VCH* Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.

Yakhlef G,(2010). Etdue de l'activité biologiques des extraits des feuilles de *Thymus vulgaris* L. ET Laurus nobilis L.

Young, H.Y., Luo, Y.L., Cheng, H.Y., Hsieh, W.C., Liao, J.C., Peng, W.H., 2005. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. J. Ethnopharmacol. 96 (1–2), 207–210.

Zhou, E., Fu, Y., Wei, Z., Yu, Y., Zhang, X., Yang, Z., 2014. Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. Fitoterapia 96, 131–137.

Zohary M. and Davis P.H. (2004). In vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential.

ANNEXES

ANNEXE A

1. Les milieux de culture utilisée :

Eau physiologique :

Chlorure de sodium…….. 8.5g
Peptone……..…… 0.5g
Eau distillé…….. 1000 ml
PH……..……. 7

Gélose nutritive:

Peptone……...…..10g/l
Extrait de bœuf……5g/l
Agar…….15 g/l
Chlorure de sodium……...…….5g/l
PH…….…….. **7.1**

Gélose Muller Hinton :

Extraits de bœuf ……...…….. 2g
Hydrolysat de caséine …… ……..…….17.5 g
Amidon mais …….……1.5g
Agar ……..…….. 17g
Eau distillé ……..……..… 1L
PH ……..…….. 7.5

Gélose Hektoen:

Proteose-peptone……...……..…… 12g
Extrait de levure …….……..…… 3g
Lactose ……..……..... 12g
Saccharose ……..……..……. 12 g
Salicine …… ..……..…… 2g
Chlorure de sodium ……..…. ..5 g
Citrate de fer d'ammonium …….…….…….... 1.5g
Sel biliaire …….……..…… 9 g
Thiosulfate de sodium …….…….……..…….. 5g
Fuchsine acide ……..……..... 0.1 g
Bleu de bromothymol……..…….. 0.065g
Agar …….. 14g
Eau distillé …….……. 1 L

Gélose Chapman :

Peptone ……..……...…… 10 g
Extrait de bœuf…….1 g
Chlorure de sodium ……...……... 75 g
Mannitol ……..……. 10 g
Rouge de phénol ……..……...……. 0.025 g
Agar …….……. 15 g
Eau distillé ……...…… 1L
PH ……..……...…….. 7.4

Gélose LOWEINSTEIN-JENSEN:

Œufs entier ……..……. 625 g
Asparagines ……..……..…….. 2.25g
Fécule de pomme de terre …… 18.75g
Glycérole ……..…… 7.5 ml
Citrate de magnèsium …… 0.375 g
Verte malachite ……..…… 0.25 g
Sulfate de magnésium ……..…….. 0.15 g
Dihydrogènophosphate de potassium…….……. 1.5 g

Gélose de SABOURAUD :

Peptone …….……. 10 g
Dextrose …… 20 g
Chloramphénicol …… .…….. 0.5 g
Agar …… 15 g
Eau distillé …….…….. 1 L
PH …….……..…. 5.7

2. Définitions

Tween 80

Ou Polysorbate 80, Monolèate de sorbitane polyxyèthylène, le polysorbates 80 est un produit synthétique fabriqué à partir de sorbitol (E420),en effet est un tensioactif non ionique d'origine végétale utilisé comme un excellent solubilisant pour les huiles essentielles et a de bonnes fonctions en tant qu'agent mouillant, modificateur de viscosité, stabilisant et agent dispersant. Il est utilisé pour préparer une grande variété de produits dans les industries alimentaire, cosmétique, pharmaceutique, textile et métallurgique.

Le formol :

Le formol est un composé organique liquide, Il est principalement utilisé comme désinfectant, fixateur de tissus biologiques, ou conservateur dans les produits cosmétiques, permettant ainsi de prévenir le développement des micro-organismes (bactéries, levures et champignons). Il possède également des propriétés de durcisseur.

3. Les antibiotiques

La gentamicine :

La gentamicine est un antibiotique de la famille des aminosides, caractérisé par son action bactéricide sur des nombreuses bactéries à Gram positif et négatif. Elle est utilisée en monothérapie ou en association, son principal inconvénient est ca toxicité, Les aminosides agissent en inhibant la synthèse protéique des bactéries par fixation sur le ribosome 30S. Ce sont des antibiotiques bactéricides actifs in vitro sur divers bactéries tell que : *Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes, Bacillus spp.*

Amoxicilline :

C'est un antibiotique de la famille des bêta-lactamine, indiqué dans le traitement à des infections bactérienne à germe sensible, leur mécanisme d'action bactéricide en inhibant la transpeptidase, enzyme essentielle, présente sur la membrane cytoplasmique, qui commande la synthèse du peptidoglycane ou muréine, constituant essentiel de la paroi des bactéries à Gram négatif et à Gram positif.

Cèfazoline :

C'est un antibiotique de la famille des bêta-lactamine, c'est un bactéricides qui inhibent la production de la paroi cellulaire et sont des inhibiteurs sélectifs de la synthèse de peptidoglycanee et donc Il induit une lyse bactérienne. Elle est sensible à des divers bactéries *Escherichia coli, Klebsiella, Proteus mirabilis,les staphylosoccus aureus.*

Fluconazol :

Est un médicament antifongique apparenté à la famille des imidazolés indiqué dans le traitement des candidoses cutanéo-muqueuses, sont des inhibiteurs enzymatiques qui agissent en bloquant le site actif de l'enzyme connue sous le nom de lanostérol 14 α demethylase qui permettre chez la levure la transformation du lanostérol en ergostérol, principal stérol de la membrane fongique, Cette enzyme est essentielle chez les levures et champignons. Son inhibition provoque un arrêt de croissance, de reproduction et entraîne la mort du mycète.

ANNEXE B

Comparaison entre l'efficacité des extraits avec les antibiotiques

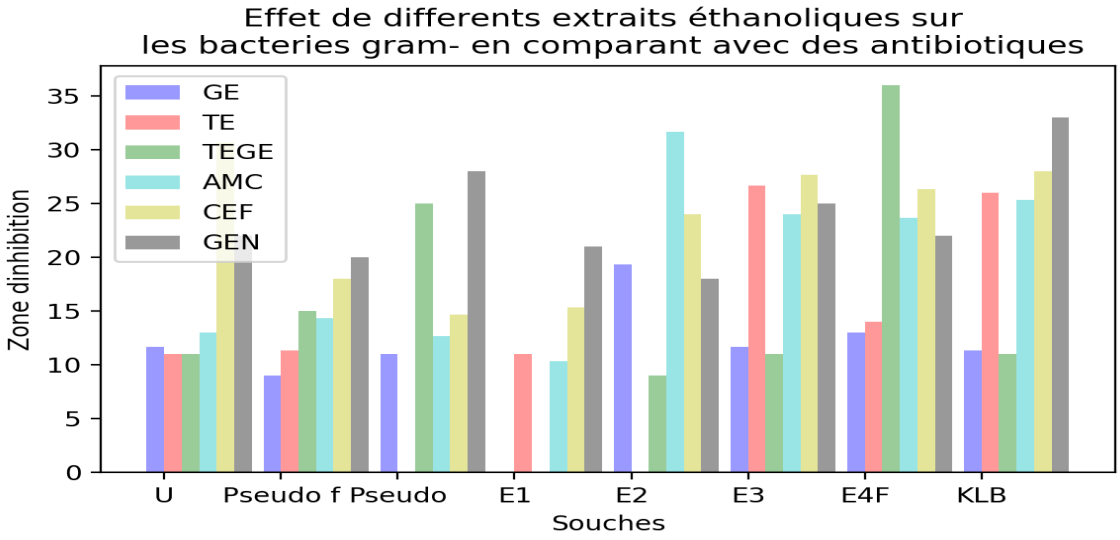


Figure 1 Effet significatif de différents extraits éthanoliques sur les bactéries gram+ en comparant avec des antibiotiques (P_{valeur}= 0.0001).

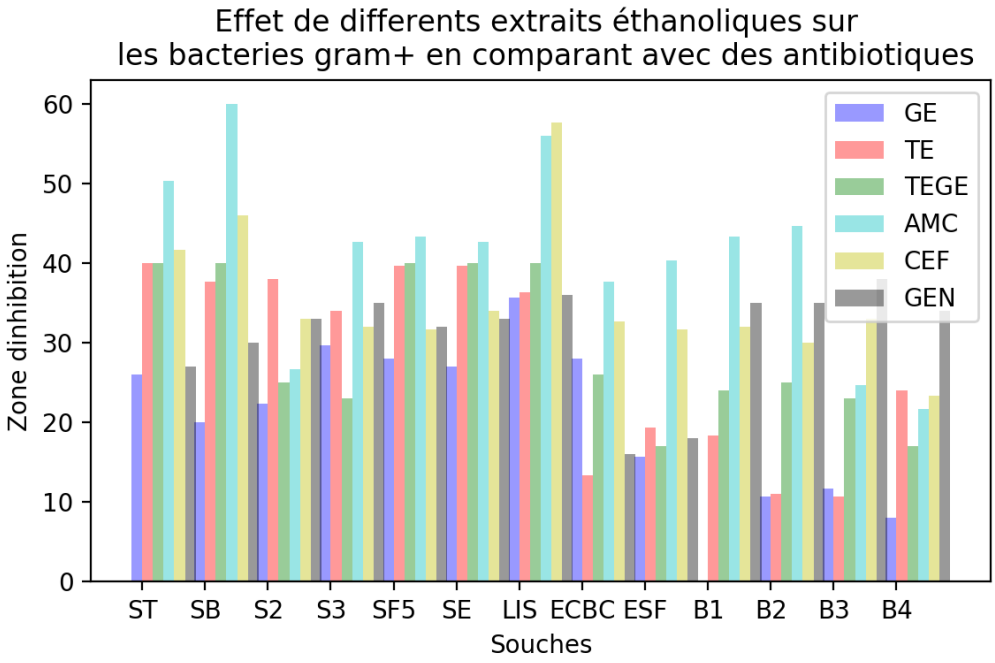


Figure 2 Effet significatif de differents extraits éthanoliques sur les bacteries gram+ en comparant avec des antibiotiques (P_{valeur}= 0.0060).

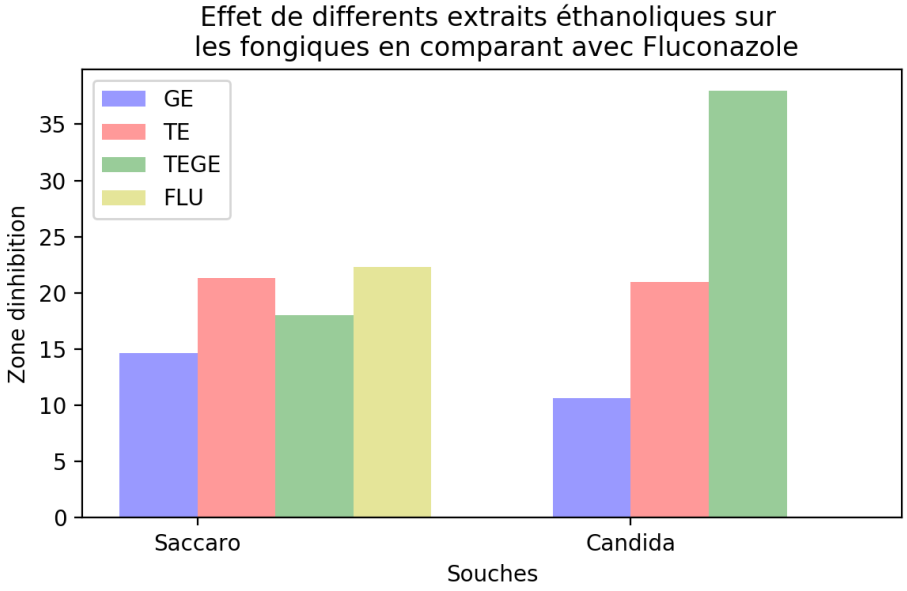


Figure 3 Effet de différents extraits éthanoliques sur les fongiques en comparant avec Fluconazole (P_{valeur}= 0.52).

ANNEXE C

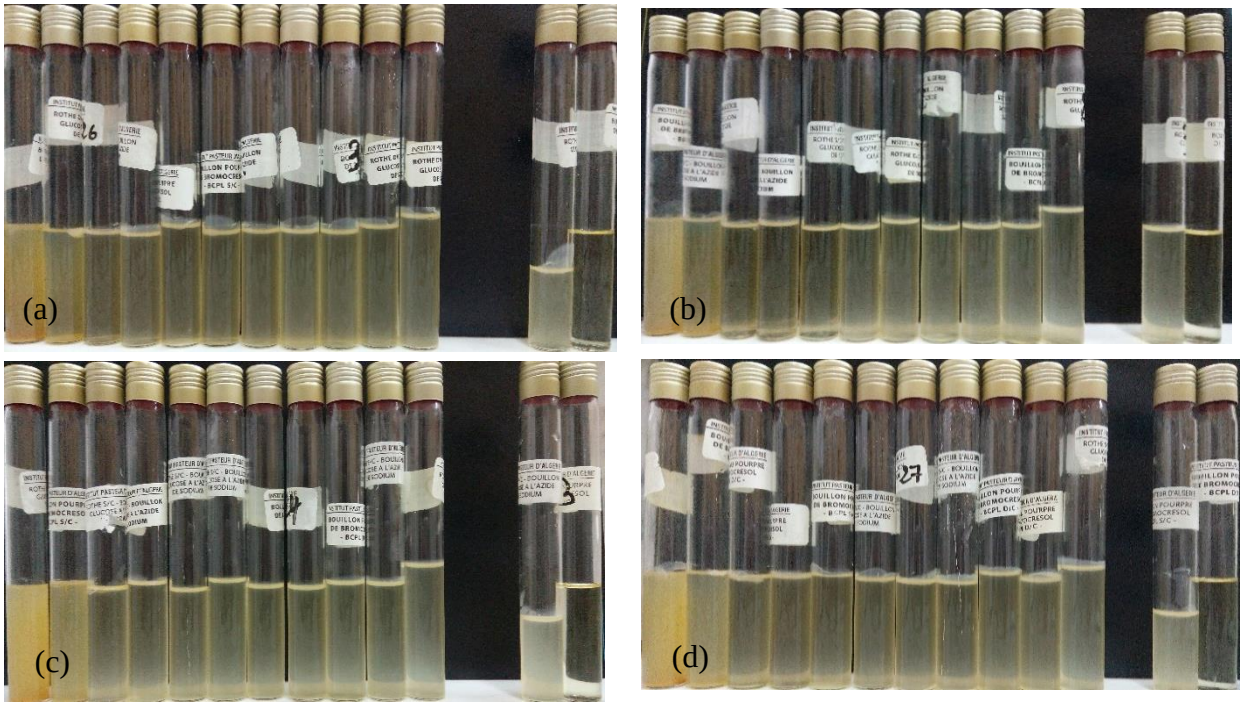


Figure c.1 les valeurs de CMI pour l'extrait ethanolique de gingembre (a) *B.subtilis* ATCC6631- (b) *S.aureus* ATCC 6538 - (c) *L.monocytogenes* ATCC 15313 (d) *S.aureus* ATCC 43300.

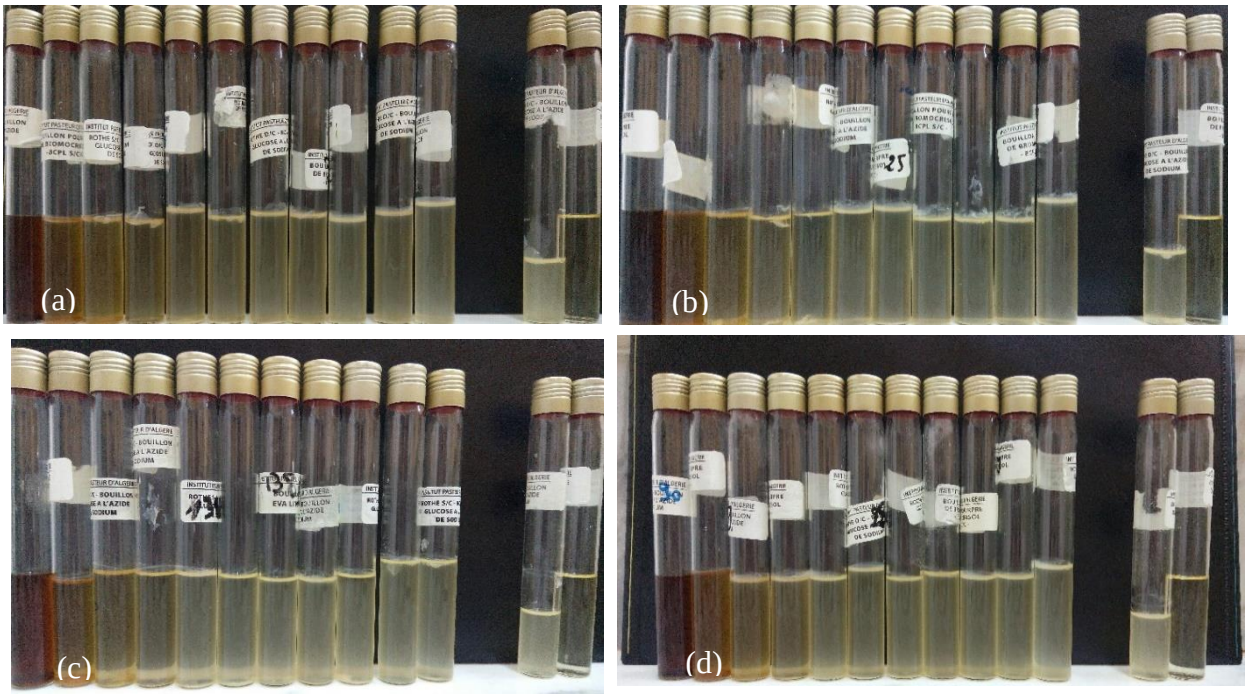


Figure c.2 les valeurs de CMI pour l'extrait ethanolique de thyme (a) *B.subtilis* ATCC6631- (b) *S.aureus* ATCC 6538 - (c) *L.monocytogenes* ATCC 15313 (d) *S.aureus* ATCC 43300.

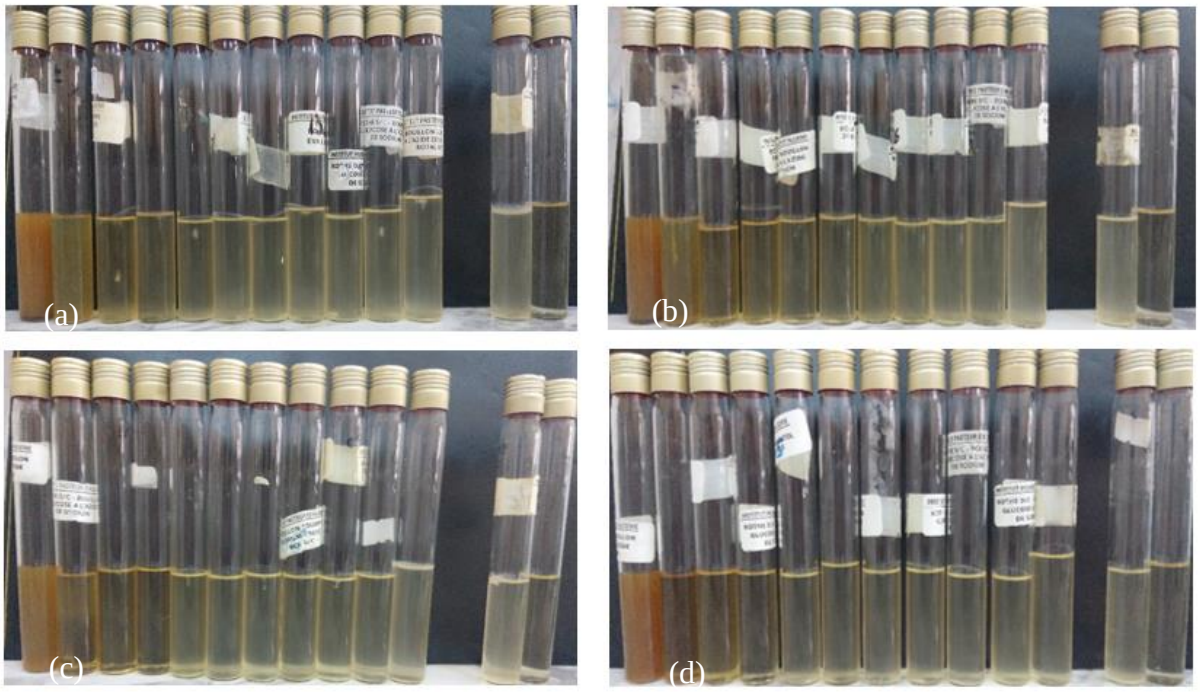


Figure c.3 les valeurs de CMI pour l'extrait ethanolique de thyme (a) *B.subtilis* ATCC6631- (b) *S.aureus* ATCC 6538 - (c) *L.monocytogenes* ATCC 15313 (d) *S.aureus* ATCC 43300.