

## COMPOSITION CHIMIQUE ET ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE D'HUILE ESSENTIELLE EXTRAITE DE *THYMUS GUYONII* DE NOÉ D'AFLOU - ALGÉRIE

BOULAGHMEN Faiza<sup>1\*</sup>, CHAOUIA Cherifa<sup>1</sup>, HAZZIT Mohamed<sup>2</sup>, NOUAS Mohamed<sup>3</sup> et SAIDI Fairouz<sup>1</sup>

1. Université Blida1 BP 270 Blida 09000 - Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie - Département de Biologie et Physiologie Cellulaire - Laboratoire de Biotechnologies, Environnement et Santé, Algérie
2. Ecole National des Sciences Agronomiques (ENSA) 16200 El-Harrach, Alger- - Département de Technologie des Industries Agricoles et Alimentaires - Laboratoire de chimie, Algérie
3. Institut Pasteur d'Algérie Dely Ibrahim 16000, Alger-Laboratoire de contrôle de qualité, Algérie

Reçu le 21/12/2017, Révisé le 02/06/2018, Accepté le 05/06/2018

### Résumé

**Description du sujet :** *Thymus guyonii* de Noé est une plante médicinale, aromatique et endémique de l'Algérie. Elle appartient à la famille des Lamiaceae de la classe Dicotylédones et de sous classe Asteridae. Elle est appelée Zaitra.

**Objectifs :** Notre travail consiste à étudier l'huile essentielle de *Thymus guyonii* par sa composition chimique. Evaluer l'activité biologique de l'huile essentielle telle que l'effet antimicrobien.

**Méthodes :** L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation sur les parties aériennes de la plante. Puis la composition chimique a été accomplie par chromatographie phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM). L'effet antimicrobien a été effectué sur des bactéries Gram +, Gram - et des levures. La méthode utilisée est l'aromatogramme avec détermination des concentrations minimale inhibitrice (CMI), bactéricide (CMB) et fongicide (CMF).

**Résultats :** L'huile essentielle de *Thymus guyonii* a été identifiée par CG/SM à 98,2% de sa composition totale. Le composé majoritaire est le thymol à 35,8% suivi du  $\gamma$ -Terpinène à 18,7% et le p-Cymène à 15,5%. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a révélé un diamètre d'inhibition le plus important (64,00±2,00 mm) chez *Candida albicans* et le plus faible chez *Pseudomonas aeruginosa* de 22,00 ± 0,00 mm. L'huile essentielle est bactéricide sur toutes les bactéries et fongicide sur les levures testées.

**Conclusion :** Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou a un large spectre d'action vis à vis de tous les microorganismes testés ainsi qu'un effet bactéricide et fongicide puissant.

**Mots clés :** *Thymus guyonii* ; huile essentielle ; thymol ; CG/SM ; activité antimicrobienne.

## CHEMICAL COMPOSITION AND MICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL EXTRACT FROM *THYMUS GUYONII* DE NOÉ FROM AFLOU ALGERIA

### Abstract

**Description of the subject:** *Thymus guyonii* de Noé is medicinal aromatic endemic Algerian plant. Belonging to Labiatae family of Dicotyledonous class and Asteridae under class, commonly called Zaitra.

**Objective:** Our work consists of studying *Thymus guyonii* essential oil by its chemical composition, evaluate the biological activity essential oil such as the antimicrobial effect.

**Methods:** Hydrodistilled aerial part plant essential oil was done by semi pilote and analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). Antimicrobial activity was done on Gram-, Gram+ bacterium and yeast by using aromatogram method with determination minimum inhibitory concentration (MIC), minimal bacteridal concentration (MBC) and fungicidal (MFC).

**Results:** The essential oil of *Thymus guyonii* was identified by GC / MS at 98.2% of its total composition. The major component is thymol at 35.8% followed by  $\gamma$ -Terpinene at 18.7% and p-Cymene at 15.5%. The study of the antimicrobial activity of *Thymus guyonii* essential oil showed that the most important inhibition diameter was 64.00±2.00mm at *Candida albicans* stain, the lowest one was at *Pseudomonas aeruginosa* with 22.00±0.00mm. Essential oil is bacteridal on bacteria and fungicidal on yeasts studied.

**Conclusion:** The results obtained showed that *Thymus guyonii* essential oil of Aflou has a broad-spectrum activity against all the microorganisms tested with powerful bactericidal and fungicide effect.

**Key words:** *Thymus guyonii* de Noé ; essential oil ; Thymol; GC/MS; antimicrobial activity.

\*Auteur correspondant : BOULAGHMEN Faiza, E-mail : manel.b.2008@gmail.com

## INTRODUCTION

*Thymus* appartient à la famille des Lamiacées qui compte 220 genres. Il est l'un des huit importants genres. Plusieurs espèces du thym poussent largement dans le vieux continent et la région ouest de la méditerranée qui est le centre où pousse le genre *Thymus* [1]. Parmi les 11 espèces de thym qui poussent en Algérie on trouve *Thymus guyonii* de Noé qui est une espèce rare et endémique au niveau du nord du Sahara Algérien [2]. C'est une plante à petites feuilles ovoïdes d'environ 5 mm dont le calice est glabre. Ses fleurs sont blanches et petites (5-6 mm) portées en inflorescences courtes. Ses tiges sont plus ou moins prostrées et rampantes. Son nom vernaculaire est «*zaitra*» et il est utilisé en médecine traditionnelle par les populations locales, comme expectorant, antitussif, antibroncholitique et comme puissant antimicrobien [3] et [4].

Le but de ce travail consiste en la détermination de la composition chimique, déterminer les composés majoritaires, le chémotype et les classer en groupes de familles chimiques. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* s'est faite par la mesure des zones d'inhibition (méthode qualitative) et par la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), ainsi que les Concentrations Minimales Bactéricides / Fongicides (CMB / CMF) sur milieu solide (méthode quantitative).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Matériel végétal

Les parties aériennes du thym ont été récoltées au mois de Juin 2014, au niveau des montagnes de Sidi Bouzid Aflou Wilaya de Laghouat. La région se situe à 400Km d'Alger, elle se trouve à une altitude de 1267m, une latitude 34°20'59" et une longitude 2°15'43" [5]. *Thymus guyonii* de Noé a été identifié par comparaison au spécimen déjà déposé à la maison de l'herbier (herbarium) de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El-harrach (ENSA) et l'identité de l'espèce a été confirmée par les professeurs du département de botanique de l'école précédemment citée.

### 2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée par hydrodistillation à l'aide d'un extracteur pilote «Alambic semi industriel» pendant une heure, au niveau du laboratoire des huiles essentielles (CRD SAIDAL d'El-Harrach). La quantité de 10Kg de matière végétale sèche a été utilisée avec un volume de 100 litres d'eau. La température de l'appareil est réglée à 101°±5°C, pour favoriser un maximum d'évaporation de l'eau et de l'huile essentielle sans la détruire. Cette méthode est préconisée par la pharmacopée Européenne [6]. L'huile essentielle est récoltée et pesée pour le calcul du rendement, puis conservée au frais à +4°C±1, dans un flacon ombrée et hermétiquement clos. Cette huile essentielle sera étudiée et analysée. Le rendement a été calculé selon la formule:

$R\% = (MHE/MVS) \times 100$ . MHE: masse de l'huile essentielle et MVS: masse de la matière végétale sèche. Les deux masses sont exprimées dans la même unité.

### 3. Etude de la composition chimique par chromatographie CG-FID et CG/SM

#### 3.1. Analyse par CG-FID

L'appareil utilisé est du type Hewlett-Packard 6890 GC-FID équipé d'une colonne HP5MS (5% polysiloxane), longueur: 30m, diamètre: 0,25µm avec une épaisseur du film de la phase 0,25 µm. Le programme de température était de 60°C pendant 8 min, augmentant à 2°C/min vers 280°C et maintenu à 280°C pendant 15 min. Des échantillons dilués (1/10 hexane, v/v) de 0,2 µl ont été injectés dans le mode d'injection split avec le rapport de division de 1:25. L'injection a été réalisée à 250°C. Un débit de 0,5 ml/min de gaz vecteur (N<sub>2</sub>) a été utilisé. La détection d'ionisation de flamme a été effectuée à 320°C. Les données quantitatives ont été obtenues par voie électronique à partir des pourcentages des aires.

#### 3.2. Analyse par CG-SM

L'analyse (CG-SM) a été réalisée avec un appareil informatisé Hewlett-Packard comprenant un chromatographe en phase gazeuse 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973A en utilisant la colonne apolaire HP5MS (film 30m × 0,25mm × 0,25µm épaisseur).

Les conditions pour les spectres CG-SM étaient : Helium (He) en tant que gaz vecteur à un débit de 0,5 ml/min; mode d'injection split (1:25); volume injecté 0,2 µl (1/10 dans l'hexane, v/v) ; et 250°C comme température d'injection. Le programme de température du four est décrit ci-dessus dans la section analyse par CG-FID. Un mode d'ionisation avec un impact électronique à 70eV a été utilisé sur une plage de balayage de 30 à 550 unités de masse atomique.

### 3.3. Identification des composés de l'huile essentielle

Les constituants de l'huile ont été identifiés par comparaison de leurs indices de rétention de Kovats déterminés par rapport à une série de n-alcane C<sub>7</sub>-C<sub>17</sub> avec ceux de littérature ainsi que par comparaison de leurs spectres de masse par rapport à ceux de la banque de spectres informatisée (Wiley 7N) et ceux de la littérature [7].

### 4. Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est évaluée de manière qualitative par la détermination des zones d'inhibition (mm) qui sont des zones claires autour du disque indemne de colonies. La méthode utilise des disques stériles de cellulose (diamètre : 6mm) imprégnés d'huile essentielle à tester. Ils sont déposés sur une surface gélosée stérile, fondue et coulée aseptiquement dans une boîte de Pétri où sont ensemencés les microorganismes à tester à raison de 10<sup>7</sup> à 10<sup>8</sup> germes/ml. Le milieu gélosé utilisé pour les bactéries est Muller-Hinton et celui des levures est Sabouraud. Et l'incubation se fait à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures. Cette méthode est appelée aromatochrome [6] et [8]. Les microorganismes utilisés dans notre expérimentation sont en nombre de 11 dont 09 souches bactériennes (05 Gram+ et 04 Gram-) et 02 levures. Les bactéries Gram+ testées sont *Bacillus subtilis* ATCC 9372, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Micrococcus luteus* ATCC 533 et *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Les bactéries Gram- sont *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Escherichia coli* ATCC 4157, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352 et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

*Candida albicans* ATCC 24433 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 sont les deux levures testées dans notre expérimentation. Ces microorganismes appartiennent à la collection ATCC (American type culture collection) du laboratoire de microbiologie du (CRD SAIDAL d'El Harrach). A part *Saccharomyces cerevisiae* qui est une souche non pathogène, toutes les autres souches étudiées sont pathogènes pour l'homme lui causant de nombreuses infections graves.

L'activité antimicrobienne est aussi évaluée de manière quantitative par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), concentration minimale bactéricide (CMB) et concentration minimale fongicide (CMF) sur milieu solide [9].

Pour déterminer les CMI, il s'agit d'effectuer une série de dilutions de l'huile essentielle dans le milieu gélosé solide Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures en utilisant du tween 80, les milieux de culture sont liquéfiés au bain marie (95°±2°C) puis refroidis à 40°±2°C. Les dilutions préparées sont de 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, 0,06%, 0,03% (v/v). Puis inoculer ces milieux avec les souches testées en utilisant des disques absorbants. Grâce à ces dilutions nous pouvons déterminer la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant la croissance microbienne. On poursuit l'expérimentation pour déterminer les CMB et CMF. Ensuite la plus faible concentration de l'huile essentielle, où aucune sub-croissance microbienne n'est visible est déterminée après subculture dans un milieu indemne d'huile essentielle à 37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 48h pour les levures [10].

L'estimation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est basée sur une échelle de mesure. Qui classe le pouvoir antimicrobien en fonction des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne en 5 classes [11].

- Très fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est ≥ 30mm.
- Fortement inhibitrice, lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 21-29mm.
- Modérément inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 16-20mm.

- Légèrement inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est compris entre 11-15mm.
- Peu ou non inhibitrice lorsque le diamètre de la zone d'inhibition est  $\leq 10$ mm.

### 5. Analyse statistique

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* ont été soumis à une analyse de la variance à un facteur (ANOVA1), avec un niveau de signification de 0,05 en utilisant le logiciel IBM SPSS Statistics 24.0. Chaque essai est répété trois fois. L'analyse statistique a été faite dans le but de d'évaluer l'effet de l'huile essentielle sur les microorganismes ATCC testés, faire une comparaison par rapport aux diamètres des zones d'inhibition prises comme variables.

Nous avons utilisé le test Newman-Keuls ( $S < 0,05$ ) dans ce contexte.

## RÉSULTATS

### 1. Rendement et composition chimique de l'huile essentielle

Le rendement moyen en huile essentielle est de 0,98%  $\pm$  0,01. Cette valeur est légèrement inférieure à celle rapportée par Kabouche *et al.* qui est de 2% [12]. La composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* de Noé d'Aflou, le pourcentage et modes d'identification des composés sont mentionnés dans le tableau 1 [13].

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* de Noé.

N°	Composés	Indices de Rétention	% du composé	Identification
1	3-Heptanone	886	t	IR-SM
2	Tricyclene	923	t	IR-SM
3	$\alpha$ -Thujene	927	0,3	IR-SM
4	$\alpha$ -Pinene	936	0,1	IR-SM-ET
5	Camphene	950	0,1	IR-SM-ET
6	1-Octen-3-ol	980	t	IR-SM
7	3-Octanone	985	0,1	IR-SM
8	$\beta$ -Pinene	978	0,7	IR-SM-ET
9	$\beta$ -Myrcene	989	0,4	IR-SM-ET
10	$\alpha$ -Phellandrene	1004	0,1	IR-SM-ET
11	$\delta$ -3-Carene	1011	t	IR-SM-ET
12	$\alpha$ -Terpinene	1017	0,1	IR-SM-ET
13	p-Cymene	1024	<b>15,5</b>	IR-SM-ET
14	Limonene	1030	0,2	IR-SM-ET
15	$\beta$ -Phellandrene	1030	0,1	IR-SM
16	cis- $\beta$ -Ocimene	1038	t	IR-SM
17	trans- $\beta$ Ocimene	1048	t	IR-SM
18	$\gamma$ -Terpinene	1060	<b>18,7</b>	IR-SM-ET
19	Cis Sabinene hydrate	1067	0,2	IR-SM
20	1-Nonen-3-ol	1085	t	IR-SM
21	3-Nonanone	1087	t	IR-SM
22	Terpinolene	1087	t	IR-SM-ET
23	p-Cymenene	1088	t	IR-SM
24	trans Sabinene hydrate	1098	t	IR-SM
25	Linalool	1099	4,0	IR-SM-ET
26	Camphor	1143	t	IR-SM-ET
27	Borneol	1166	1,3	IR-SM-ET
28	$\alpha$ -Terpineol	1190	0,4	IR-SM-ET
29	Thymol methyl ether	1234	<b>15,2</b>	IR-SM
30	Carvacrol methyl ether	1243	0,1	IR-SM
31	Nerol	1229	t	IR-SM
32	Thymol	1290	<b>35,8</b>	IR-SM-ET
33	Carvacrol	1300	2,2	IR-SM-ET
34	Nonyl acetate	1309	0,1	IR-SM

35	Thymol acetate	1356	t	IR-SM
36	Eugenol	1358	t	IR-SM-ET
37	$\alpha$ -Copaene	1376	t	IR-SM
38	$\beta$ -Bourbonene	1384	t	IR-SM
39	$\beta$ -Elemene	1390	t	IR-SM
40	$\beta$ -Caryophyllene	1420	1,5	IR-SM
41	trans- $\alpha$ -Bergamotene	1435	t	IR-SM
42	Aromadendrene	1441	t	IR-SM
43	cis- $\beta$ -Farnesene	1446	t	IR-SM
44	$\alpha$ -Humulene	1453	t	IR-SM
45	Alloaromadendrene	1460	t	IR-SM
46	Germacrene D	1481	t	IR-SM
47	Ledene	1486	t	IR-SM
48	Bicyclogermacrene	1494	0,2	IR-SM
49	$\beta$ -Bisabolene	1508	t	IR-SM
50	$\gamma$ -Cadinene	1513	0,1	IR-SM
51	$\delta$ -Cadinene	1523	0,10	IR-SM
52	Cadina-1,4-diene	1531	t	IR-SM
53	$\alpha$ -Muurolene	1498	t	IR-SM
54	cis- $\alpha$ -Bisabolene	1540	t	IR-SM
55	Spathulenol	1576	0,3	IR-SM
56	Caryophyllene oxide	1581	0,2	IR-SM
57	Viridiflorol	1691	t	IR-SM
58	t-Cadinol	1635	0,1	IR-SM
59	$\beta$ -Eudesmol	1650	t	IR-SM
60	$\alpha$ -Cadinol	1652	t	IR-SM
			<b>98,2</b>	
	Composés identifiées (%)			
.	Hydrocarbures monoterpéniques		<b>36,3</b>	
.	Monoterpènes oxygénés		<b>59,3</b>	
.	Hydrocarbures sesquiterpéniques		<b>1,9</b>	
.	Sesquiterpènes oxygénés		<b>0,6</b>	
.	Autres		<b>0,1</b>	

Composés classés dans l'ordre d'éluion sur la colonne HP5MS; t: trace (< 0,05%). Identification :

IR= Comparaison de l'indice de rétention calculé par rapport à ceux de la littérature ;

SM= comparaison du spectre de masse à ceux des spectres des bibliothèques informatisées (Wiley 7N ) du logiciel d'identification ainsi que ceux de la littérature ;

Et : comparaison des indices de rétention par rapport à ceux de composés purs (étalons) disponibles dans le laboratoire d'analyse. Les indices de rétention sont calculés par rapport à une série d'alcane C<sub>7</sub>-C<sub>17</sub> injectés dans les mêmes conditions que l'huile étudiée.

L'analyse de l'huile essentielle par CG/SM nous a permis l'identification 60 composés qui représentent 98,2% de la composition totale de l'huile essentielle du thym. Les molécules les plus importants sont: le Thymol à 35,8%, le  $\alpha$ -Terpinene à 18,7%, le p-Cymene à 15,5%, le Thymol méthyl ether à 15,2%, Linalool à 4% et Carvacrol à 2,2%. Le composé majoritaire de l'huile essentielle est un monoterpène oxygéné, *Thymus guyonii* de Noé d'Aflou étudié est à chémotype thymol.

## 2. Activité antimicrobienne

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et comparés avec celle de l'échelle de Mutai et al. [11]. Nous avons vu que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a fortement inhibé la croissance de toutes les bactéries et levures testées (Tableau 2). Nous avons remarqué que la zone d'inhibition la plus élevée est celle de *Candida albicans* qui est de (64,00  $\pm$  2,00 mm), ce qui est très important pour la thérapie contre les infections contre ce microorganisme pathogène pour l'homme. La plus faible valeur est celle de (22,00  $\pm$  0,00 mm), qui n'est pas négligeable pour un microorganisme très résistant à tout agent antimicrobien et antibiotique [14].

Tableau 2: Sensibilité des souches étudiées à l'huile essentielle de *Thymus guyonii* (diffusion en mm par disque  $\pm$  Standard déviation).

Souches	ATCC	Gram	Huile essentielle de <i>Thymus guyonii</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	46,00 $\pm$ 0,00
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	46,00 $\pm$ 2,00
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	32,33 $\pm$ 2,08
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	34,66 $\pm$ 1,53
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	45,00 $\pm$ 1,00
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	26,33 $\pm$ 1,53
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	31,00 $\pm$ 0,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	46,00 $\pm$ 2,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	22,00 $\pm$ 0,00
<i>Candida albicans</i>	24433	/	64,00 $\pm$ 2,00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	35,00 $\pm$ 2,08

Les valeurs des CMI mesurés concordent avec les zones d'inhibitions réalisées car la CMI est inversement proportionnelle au diamètre des zones d'inhibition (Tableau 3). La valeur la plus élevée de CMB/CMF a été observée chez

*Pseudomonas aeruginosa* et qui est de 0,5% (v/v). Par contre les valeurs les plus faibles, qui sont à 0,06% (v/v) sont notées chez *Candida albicans* et *Bacillus cereus*.

Tableau 3: Les valeurs de CMI et CMB/CMF de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* des souches microbiennes testées

Souches	Huile essentielle de <i>Thymus guyonii</i>			
	ATCC	Gram	CMI(%)	CMB(%)
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	0,06	0,125
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	0,06	0,06
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	0,125	0,125
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	0,125	0,125
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	0,06	0,125
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	0,25	0,25
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	0,125	0,125
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	0,06	0,125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	0,25	0,5
<i>Candida albicans</i>	24433	/	0,03	0,06
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	0,125	0,125

Les résultats des CMI et CMB ou CMF varient d'un microorganisme à un autre, dans certains cas elles sont égales comme nos résultats (Tableau 4). Ce qui indique une forte action bactéricide et ou fongicide. Car, lorsque le rapport CMB/CMI et ou CMF/CMI  $\geq$  4, l'huile essentielle est dite bactériostatique et ou fongistatique [15]. Mais, lorsque le rapport CMB/CMI et ou CMF/CMI  $<$  4, on dit que l'huile essentielle est bactéricide et ou fongicide. Le tableau 4 indique que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a un effet bactéricide et fongicide sur toutes les bactéries et levures testées.

Les résultats de l'analyse statistique des diamètres des zones d'inhibition comme variables, ont mis en évidence une différence significative entre les souches microbiennes testées (test Newman-Keuls et ANOVA1, S  $<$  0,05. Ce test nous a permis de classer les souches selon leur sensibilité comme suit:

*Candida albicans*  $>$  *Klebsiella pneumoniae*; *Bacillus cereus*; *Bacillus subtilis*  $>$  *Staphylococcus aureus*  $>$  *Saccharomyces cerevisiae*  $>$  *Micrococcus luteus*  $>$  *Enterococcus faecium*  $>$  *Escherichia coli*  $>$  *Bordetella bronchiseptica*  $>$  *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 4: Les rapports des CMB/CMI, CMF/CMI de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* calculés vis à vis des souches ATCC

Souches	ATCC	Gram	CMB/CMI ou CMF/CMI	Interprétation
<i>Bacillus subtilis</i>	9372	+	2,08	Bactéricide
<i>Bacillus cereus</i>	10876	+	1,00	Bactéricide
<i>Enterococcus faecium</i>	6569	+	1,00	Bactéricide
<i>Micrococcus luteus</i>	533	+	1,00	Bactéricide
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	+	2,08	Bactéricide
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	4617	-	1,00	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	4157	-	1,00	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4352	-	2,08	Bactéricide
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	-	2,00	Bactéricide
<i>Candida albicans</i>	24433	/	2,00	Fongicide
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2601	/	1,00	Fongicide

## DISCUSSION

Le rendement de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* de Noé obtenu (0,98% ± 0,01) est similaire à celui rapporté par Hazzit *et al.* qui est de 1% [16] et légèrement inférieur à celui cité par Zeghib *et al.* (1,5%) [17] et Kabouche Z *et al.* (2%) [11,18]. En effet le rendement peut être influencé par plusieurs paramètres intrinsèques (étapes de croissance et l'âge du matériel végétal) et extrinsèques de la plante comme la période et milieu de récolte, les pratiques culturales, ainsi toutes conditions pédoclimatiques, le séchage et les méthodes d'extraction) [19]. Les facteurs abiotiques ou caractéristiques physico-chimiques ont un effet sur le rendement en huile essentielle, l'humidité, la température, le temps de l'insolation et les vents qui influencent directement sur les espèces qui ont des structures histologiques de stockage superficielle comme le thym [20 ; 21 ; 22 ; 23]. Le chémotype de l'huile essentielle analysée est le Thymol qui est un Monoterpène Oxygéné Phénolique avec une teneur de 35,8%, ce qui met l'espèce étudiée dans le groupe des Thyms à Thymol. Le composant cité est suivi  $\gamma$ -Terpinène à 18,7%, le  $\rho$ -Cymène à 15,5%, le Thymol methyl ether à 15,2%, Linalool à 4% et Carvacrol à 2,2%. Le chémotype de *Thymus guyonii* rapporté par Zeghib *et al.* de M'sila [19] est Carvacrol à 55,55% suivi de Thymol à 21,18%,  $\rho$ -Cymène à 9,7% et  $\gamma$ -Terpinène à 5,7%. Le Carvacrol comme produit majoritaire est aussi observé par Kabouche *et al.* au niveau de *Thymus guyonii* de Zelfana (Ghardaia) [11], avec une valeur de 55,55% suivi du Thymol à 19,5% et  $\rho$ -Cymène à 6,25%.

Par contre le chémotype cité par Hazzit M *et al.* est le  $\rho$ -cymène à raison de 18,6% identifié dans *Thymus guyonii* de Djelfa, suivi de  $\gamma$ -Terpinène à 13,0%, Thymol à 10,9%, Thymol methyl ether à 10,7% et Carvacrol à 4,2%. En littérature l'huile essentielle de Thym est caractérisée par sa richesse en monoterpènes phénoliques, la majorité des travaux réalisés mentionnent que le chémotype des Thyms étudiés est soit Thymol ou Carvacrol [11 ; 13]. Suivi de leurs précurseurs biogénétiques qui sont  $\rho$ -Cymène et  $\gamma$ -Terpinène formant la majeure partie des huiles essentielles de Thym avec une teneur de plus de 70% [20 ; 24].

Le Thymol composant majoritaire de *Thymus de guyonii* étudié d'Aflou est retrouvé en deuxième place au niveau de *Thymus guyonii* de M'sila de même que celui de Ghardaia avec des valeurs rapprochées. Mais en troisième position au niveau de *Thymus guyonii* de Djelfa. Par contre le Carvacrol qui est composé majoritaire de *Thymus guyonii* de M'sila et Ghardaia est retrouvé avec de faibles valeurs chez *Thymus guyonii* d'Aflou et de Djelfa.

Les changements aperçus dans la composition chimique des huiles essentielles, d'une manière qualitative et quantitative, peuvent être dues à l'âge de la plante, à la période du cycle végétatif, à la partie de la plante utilisée et à certains facteurs écologiques, ou même à des facteurs génétiques [25 ; 26 ; 27 ; 28 ; 29].

Les résultats de l'activité antimicrobienne révèlent que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a inhibé la croissance de toutes les bactéries et levures testées. Parmi les bactéries Gram+, ce sont *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* qui ont montré une zone d'inhibition de croissance la plus élevée (46,00±0,00mm) et (46,00±2,00mm),

la croissance de *Staphylococcus aureus* a été fortement inhibée par l'huile essentielle avec (45,00±1,00mm). Ce résultat paraît intéressant surtout que cette bactérie est pathogène pour l'homme et qu'elle est à l'origine de dangereuses intoxications alimentaires. Notons que la valeur citée est plus élevée que celle rapportée par Kabouche *et al.* [12] chez *Thymus guyonii* de Ghardaia (30,0±1,5mm), qui a été citée comme la plus haute zone d'inhibition des souches étudiées.

Suivi de *Micrococcus luteus* et *Enterococcus faecium* avec des halos d'inhibition respectivement (34,66±1,53mm) et (32,33±2,08mm).

Parmi les bactéries Gram-, l'huile essentielle de *Thymus guyonii* a inhibé fortement la croissance de *Klebsiella pneumoniae* (qui est aussi une bactérie pathogène pour l'homme lui causant de nombreuses infections graves) avec une zone d'inhibition de (46,00±2,00mm), suivi de *Escherichia coli* (31,00±0,00mm), ensuite *Bordetella bronchiseptica* (26,33±1,53mm), puis *Pseudomonas aeruginosa* (22,00±0,00mm), qui s'est avérée la plus résistante des microorganismes étudiés, cette valeur est à prendre en considération, car cette bactérie a été citée par plusieurs auteurs, comme étant très résistante à tout agent antimicrobien et antibiotique [14]. De même qu'elle a été citée par Kabouche *et al.* [12] comme étant la plus résistante des bactéries testées avec une zone d'inhibition de (20,5±1,1mm).

Concernant les levures, c'est *Candida albicans* qui a révélé la plus puissante sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle de *Thymus guyonii* d'Aflou avec un diamètre d'inhibition de (64,00±2,00mm) supérieur à *Saccharomyces cerevisiae* (35,00±2,08mm) et à toutes les bactéries étudiées, ce qui est intéressant du fait que cette levure cause de nombreuses infections chez l'homme.

L'huile essentielle de *Thymus guyonii* a exercé une action inhibitrice importante vis-à-vis des microorganismes testés. Toutes les souches sont inhibées à des concentrations allant de 0,03 à 0,25%(v/v). La valeur CMI la plus élevée est celle de *Pseudomonas aeruginosa* et la plus faible est celle de *Candida albicans*, ce qui correspond aux zones d'inhibition car les CMI sont inversement proportionnelles aux halos d'inhibition [30].

Toutes les valeurs de CMB/CMF sont inférieures à 4, donc l'huile essentielle a révélé à la fois une excellente activité bactéricide et fongicide sur toutes les bactéries et levures testées.

Ces résultats nous confirment que l'huile essentielle testée est un puissant antimicrobien, par sa forte teneur en thymol (35,8%), qui est un composé monoterpène phénolique connu pour avoir une grande action antiseptique et antimicrobienne. A forte concentration, il est responsable d'une action bactéricide rapide car il traverse la paroi bactérienne et dénaturent les protéines. Et à faible dose il est bactériostatique [14]. D'autres travaux ont suggéré aussi que ce composé volatil est responsable de l'inactivation d'enzymes, y compris ceux impliqués dans la production d'énergie et la synthèse des constituants de structure des bactéries et levures [31 ; 32]

## CONCLUSION

L'huile essentielle extraite de *Thymus guyonii* de Noé d'Aflou (Sahara Algérien septentrional) est composée de molécules majoritaires qui sont Thymol,  $\gamma$  Terpinene, p-Cymene, Thymol methyl ether, Linalool et Carvacrol. La plante est à chémotype Thymol (35,8%). Les résultats de l'activité antimicrobienne indique que l'huile essentielle de *Thymus guyonii* possède un large spectre d'action vis à vis de toutes les bactéries et levures testées. Ainsi qu'elle est bactéricide et fongicide par sa riche composition en produits phénoliques. Ce qui favorise son utilisation dans les produits pharmaceutiques comme l'antibiotique naturel du futur.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1]. Stahl-Biskup E. and Sàez F. (2002). Thyme. *The genus Thymus*. Ed Taylor & Francis, 330p.
- [2]. Quezel P. et Santa S. (1963). *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques*. Tome II, Edition du Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, 600p.
- [3]. Barnes J., Anderson L. and Phillipson J.D. (2007). *Herbal Medecine*. Edition Pharmaceutical press Ph P, third edition, 710p.
- [4]. Bremness L. (2005). *Plantes aromatiques et médicinales*. Edition Larousse, Paris, 304p.

- [5]. **Aissaoui A. (2016).** Hydrologie et hydrogéologie du bassin versant de l'oued M'Zi. (Laghouat, Algérie) Thèse de Magister Sciences de la Terre option Hydrogéologie, Université d'Oran2 Mohamed Ben Ahmed, Faculté des Sciences de la Terre et de l'Univers, Oran, 142p.
- [6]. **Anonyme. (2008).** *Pharmacopée Européenne*, 6ème édition.
- [7]. **Hazzit M. (2008).** Etude de la composition chimique des huiles essentielles de différentes espèces de Thym et d'Origan poussant en Algérie. Thèse de Doctorat en Chimie, Université des Sciences et de Technologie Houari Boumedienne, Alger, 204p.
- [8]. **Chikhoun A. (2007).** Huiles essentielles de Thym et d'Origan. Thèse de Magister en Agronomie option Sciences Alimentaires, Institut National Agronomique El Harrach, Alger, 178p.
- [9]. **Courvalin P., Leclercq R. et Bongen E. (2012).** *Antibiogramme*. Edition ESKA, 3<sup>ème</sup> édition, Paris, 800p.
- [10]. **Mebarki N. (2010).** Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanessi* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse-antimicrobienne. Thèse de Magistère en Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques option Industrie Pharmaceutique, Université M'hamed Bougara, Faculté des Hydrocarbures et de la Chimie, Boumerdes, 185p.
- [11]. **Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D. et Roussis V. (2009).** Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 143-148.
- [12]. **Lehibili M., Chibani S., Kabouche A., Semra Z., Smati F., Abuhamdah S., Touzani R. and Kabouche Z. (2013).** Composition, antibacterial and antioxidant activity of essential oil of *Thymus guyonii* de Noé from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 5 (2): 306-310.
- [13]. **Babushok V. I., Linstrom P. J., and Zenkevich I. G. (2011).** Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 40 (4): 043101-47
- [14]. **Pibiri, M.C. (2006).** *Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles*. Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Suisse, 177p.
- [15]. **Oussou K.R. (2008).** Etude chimique et activité antidiarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée Ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*, 24 (1) : 94-103.
- [16]. **Hazzit M., Baaliouamer A., Leonor M., Faleiro M. et Graa. M. (2006).** Composition of essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17): 6314-6321.
- [17]. **Zeghib A., Kabouche A., Laggoune S., Calliste C.-A., Simon A., Bressolier P., Aouni M., Duroux J.-L. and Kabouche Z. (2017).** Antibacterial, Antiviral, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Thymus guyonii* Essential Oil. *Natural Product Communications*, 12 (10) : 1651 - 1654.
- [18]. **Ghorab H., Kabouche A. and Kabouche Z. (2014).** Comparative compositions of essential oils of *Thymus* growing in various soils and climates of North Africa. *J. Mater. Environ. Sci.* 5, (1), 298-303.
- [19]. **Hamrouni, Sellami I., Maamouri E., Chahed T., Aidi W., Kchouk M.E. and Marzouk, B. (2009).** Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana L.*). *Industrial Crop and Products*, 30: 395-402.
- [20]. **Boulaghmen F. (2012).** Extraction des huiles essentielles de l'origan. Thèse de Magistère en Biotechnologie végétales option Biologie, Université Saad Dahlab de Blida, Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires et Biologiques, Blida, 143p.
- [21]. **Lalami E.O., El-Akhal A., Ouedrhiri F., Ouazzani Chahdi W., Guemmouh F., Greche Hassane R. (2013).** Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain: *Thymus vulgaris* et *Thymus satureioidis*. *Les Technologies De Laboratoire* Vol. 8, N°31.
- [22]. **Aberchane M., Fechtal M., Chaouch A. et Bouayoune T. (2001).** Influence de la durée et de la technique d'extraction sur le rendement et la qualité des huiles essentielles du cèdre de l'Atlas (*Cedrus atlantica* Manetti). *Annales de la recherche forestière au Maroc*, 34 : 110-118.
- [23]. **Bourkhiss M., Hnach M., Bourkhiss B., Ouhssine, M., Chaouch A., Satrani, B. (2009).** Effet du séchage sur la teneur et la composition chimique des huiles essentielles de *Tetraclinis articulata* (Vahl) *Masters Agrosolution*, 20 (1) : 44-48.

- [24]. Hüsni K., Baser C. and Buchbauer G. (2010). *Handbook of essential oils : Science, Technology and Applications*, editors Taylor & Francis, USA, 975p.
- [25]. Senatore F. (1996). Influence of harvesting time on yield and composition of essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides* L.) growing wild in Campania (Southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (5): 1327-1332.
- [26]. Kokkini S., Karousou R., Dardioti A., Krigas N. and Lanaras T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry*, 44 (5): 883-886.
- [27]. Russo M., Galletti G.C., Bocchini P. and Carnacini A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inluorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (9): 3741-3746.
- [28]. Thompson J.D., Chalchat J.C., Michet A., Linhart Y.B. and Ehlerset B. (2003). Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemistry and Ecology*, 29 (4): 859-880.
- [29]. Karousou R., Karousou R., Koureas D.N. and Kokkini S. (2005). Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete, *Photochemistry*, 66 (22): 2668-2673.
- [30]. Bekhechi C., Atik-Bekkara F et Abdelouahid D.E. (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum* d'Algérie. *Phytothérapie*, 6 : 153-159.
- [31]. EL Ajjouri M., Satrani B., Ghanmi M., Aafi A., Farah A., Rahouti M., Amarti F. et Aberchane M. (2008). Activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus bleicherianus* Pomel et *Thymus capitatus* (L.) Hoffm. & Link contre les champignons de pourriture du bois d'œuvre. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 12(4) : 345-351.
- [32]. Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M. et Chaouch A. (2010). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algériensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 14(1) : 141-148.