

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saïda



كلية العلوم

Faculté des Sciences

قسم الفلاحة و علوم التغذية

Département d'agronomie et sciences de la nutrition

Mémoire de Master

En biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

Thème

N° d'Ordre

Imprégnation des phytocomposés bioactifs à l'aide d'un nanomatériau

Présenté par :

- SOUF fatima zohra
- MESSIRDI mimouna

Soutenu le : 15 juin 2026

Encadreur

Président

Examinatrice

Mr. MEBARKI Moubarek

Mr. HENNI Mustapha

Mme. BOUCHIKHI Noria

MCB Université UMTS

MCB Université UMTS

MCB Université UMTS

Année universitaire 2025/2026

Remerciements

La réalisation de ce mémoire n'aurait pas été possible sans la collaboration de plusieurs personnes et organismes qui nous ont soutenues tout au long de cette grande aventure.

C'est pour cela que ces lignes sont peut-être les plus faciles et les plus difficiles à écrire. Il paraît simple de nommer toutes les personnes qui nous ont aidées, mais il est difficile de les remercier à la hauteur de leur soutien. Nous allons néanmoins essayer.

Nous tenons tout d'abord à remercier DIEU, le Tout-Puissant et Miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience nécessaires pour accomplir ce travail.

Ce travail n'aurait pu atteindre son plein potentiel ni être réalisé sans l'aide et la supervision du Dr MEBARKI Moubarek. Nous lui exprimons notre profonde gratitude pour son encadrement dévoué et professionnel, sa présence constante, ses précieux conseils, ses efforts et surtout sa bienveillance.

Nous remercions également le Dr Othman, responsable du Laboratoire de Biochimie du Centre de Recherche en Biotechnologie, pour son accueil chaleureux et pour nous avoir permis de travailler dans son laboratoire. Nous remercions également toute son équipe, ainsi que Mmes Hajira et Halima.

Nous adressons nos sincères remerciements au Dr BOUCHIKHI pour sa précieuse contribution dans le domaine des nano revêtements.

Nous remercions également les membres du jury, M. HENNI Mustapha et Mme BOUCHIKHI Noria, qui ont aimablement accepté d'évaluer ce travail et d'y apporter leurs remarques et suggestions.

Nous remercions enfin tous nos professeurs dont l'expertise a soutenu nos recherches et contribué à la réalisation de ce travail.

Enfin, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à tous nos amis de la promotion 2021 pour leur soutien et leurs encouragements.

Nous remercions également toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.

Dédicace

Par la grâce et la faveur de **Dieu** Tout-Puissant, qui m'a accordé patience, courage et santé, j'ai pu achever ce modeste ouvrage, que je dédie à :

À celui qui se sacrifie sans cesse pour moi, ma fierté et ma joie, mon héros : **mon père**. Je sais qu'un simple merci est insuffisant pour exprimer toute ma gratitude et mon amour. Merci pour ton soutien inconditionnel, tant moral que matériel. Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu te protège.

À ma mère bien-aimée, douce, généreuse et aimante ; tu es l'incarnation de la douceur, la source de toute tendresse et un modèle de dévouement qui n'a jamais cessé de m'encourager. Aucun mot de remerciement ne saurait exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu as consentis tout au long de ma vie.

À mes grands-parents, que Dieu leur accorde une longue vie.

À mes frères, Mohammad Abd El Rahim et Mounir Habib Allah, qui m'ont toujours soutenu et encouragé durant mes études. À ma sœur, MESSIRDI Mimouna.

Et un merci spécial à mon binôme MESSIRDI Mimouna

À mes amis, MOSTEFAI Hanaa, ABD AL HAKEM Aya et ALLALI Naima, qui m'avez accompagnée tout au long de mon parcours universitaire ces cinq dernières années. Je vous souhaite un avenir rempli de joie, de bonheur et de réussite.

À mes chères amies et sœurs, BEN MCHICHE Salsabil et KHLIFI Malek. Et BEN TEYEB Teyeb et Walid. Merci pour votre aide, votre soutien, vos encouragements et votre amour.

... Ce message vous est également dédié.

À ma cousine, DERKAOUI Amina, qui m'a toujours soutenue et encouragée, qui a toujours été à mes côtés et qui m'a accompagnée durant mes études. Les mots me manquent pour exprimer combien tu comptes pour

moi. Je prie Dieu Tout-Puissant de te protéger et de t'accorder santé, longévité et bonheur.

Et quand je parle de ma merveilleuse famille, les mots me manquent. Mes oncles, mes tantes et mes cousins. Merci infiniment pour l'énergie et le bonheur que je puise en votre présence; vous trouverez ici tout mon amour. Ce message vous est dédié.

Je dédie ce travail à tous ceux qui ont contribué de quelque manière que ce soit à la réalisation de ce projet.

Fatima Zohra



Dédicace

À ma très chère mère et à mon très cher père,

Qui ont toujours été à mes côtés, m'ont soutenue, encouragée et guidée tout au long de mon parcours. Aucun mot ne saurait exprimer ma profonde gratitude pour tous leurs sacrifices et leur amour inconditionnel.

À mes très chers frères :

Amine, Yahia, Mohamed, Youcef, Yassine et Younes,

Pour leur affection, leur soutien et leurs encouragements permanents.

À mes très chères sœurs :

Amina, Hadjer, Akila, Nassima et Sadja,

Pour leur amour, leur présence et leur soutien précieux.

À ma chère binôme Fatima Zohra,

Avec qui j'ai partagé les efforts, les défis et les moments de réussite tout au long de ce travail. Je la remercie sincèrement pour sa collaboration, son sérieux, sa patience et sa précieuse amitié.

À mes chers amis et amies :

Abdelkrim, Hadjer, Chorouk, Houda, Nada, Kheira et Saloua,

Pour leur amitié sincère, leur soutien et les agréables moments partagés.

À tous mes collègues de la promotion,

Avec qui j'ai partagé des années d'études, d'efforts et de persévérance.

À tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je leur adresse mes plus sincères remerciements.

Mimouna



Liste des abréviations

Ag : Argent
ASB : Albumine Sérique Bovine
ATCC : American Type Culture Collection
C10 : Carbone 10
C15 : Carbone 15
CO₂ : Dioxyde de carbone
CTAB : Bromure de cetyltriméthylammonium
DMAPP : Dimethylallyl Pyrophosphate
DMSO : Diméthylsulfoxyde
FPP : Farnesyl Pyrophosphate
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GPP : Geranyl Pyrophosphate
HE : Huile Essentielle
HEs : Huiles Essentielles
HSV : Herpes Simplex Virus
IPP : Isopentenyl Pyrophosphate
MAE : Microwave Assisted Extraction
MAP : Microwave Assisted Process
MCM-41 : Mobil Composition of Matter No. 41
MEB : Microscopie Électronique à Balayage
MET : Microscopie Électronique en Transmission
MSN : Nanoparticules de Silice Mésoporeuse
M/v : Masse/Volume
NaOH : Hydroxyde de sodium
NPs : Nanoparticules polymériques
PBS : Phosphate Buffered Saline (solution tampon phosphate)
PH : potentiel hydrogène
PLA : Acide polylactique (Polylactic Acid)
PLGA : Poly(acide lactique-co-glycolique)

RC-37 : Cell Line RC-37

RPM : Révolutions par minute

SiO₂ : Dioxyde de silicium

TSA : Tryptic Soy Agar

TSB : Tryptic Soy Broth

UV : Ultraviolet

v/v : Volume/Volume

ZnO : Oxyde de zinc

°C : Degré Celsius

µm : Micromètre

nm : Nanomètre

mg : Milligramme

ml : Millilitre

g : Gramme

Kg : Kilogramme

Liste des tableaux

Tableau 1 : La classification de thym.....	7
Tableau 2: Principales espèces du genre <i>Thymus</i> utilisées en phytothérapie et en biotechnologie.....	8
Tableau 3: les souches bactériennes utilisent.....	43
Tableau 4 : Activité anti-inflammatoire des échantillons étudiés évaluée par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (ASB).....	55
Tableau 5 :Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre <i>Escherichia coli</i>	57
Tableau 6:Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Tableau 7:Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre <i>Bacillus subtilis</i>	61
Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre <i>Bacillus cereus</i>	63

Liste des figures

Figure 1: plante du genre <i>Thymus</i>	6
Figure 2: Répartition du genre <i>Thymus</i> dans le monde. La ligne en pointillés toutes les sections (cf. classification du genre <i>Thymus</i>) excepté la section <i>Serpyllum</i> et section <i>Hyphodromi</i> subsect.	9
Figure 3: Les conditions de culture du thym	11
Figure 4: Exemples de couples d'énantiomères et d'isomères des composants d'huiles essentielles présentant des odeurs a) différentes ou b) similaires.	14
Figure 5: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation	15
Figure 6: Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau	16
Figure 7 : Schéma de la technique d'extraction par le CO ₂ supercritique.	18
Figure 8 : Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (MicrowaveAssisted Extraction) et MAP™ (MicrowaveAssistedProcess.)	20
Figure 9: Diversité des monoterpènes	21
Figure 10: certains effets biologiques de <i>Thymus vulgaris</i>	24
Figure 11: Différentes voies de dégradation possibles des huiles essentielles.	27
Figure 12 : Comparaison de différentes tailles d'objets par rapport à l'échelle nanométrique	31
Figure 13: Représentation schématique de la structure d'une nanocapsules et d'une nanosphères.	34
Figure 14: plante du genre <i>Thymus</i>	42
Figure 15: culture de 24h d' <i>Escherichia coli</i>	43
Figure 16: culture de 24h de <i>Staphylococcus aureus</i>	44
Figure 17: culture de 24h de <i>Bacillus subtilis</i>	44
Figure 18: culture de 24h de <i>Bacillus cereus</i>	45
Figure 19: Dispositif d'hydrodistillation de Clevenger	46

Figure 20: Schéma illustrant l'adsorption de l'huile essentielle de thym dans les pores du matériau MCM41.....	48
Figure 21: Récupération de l'huile essentielle de thym à l'aide de l'appareil de Clevenger	52
Figure 22: Représentation graphique Comparaison de l'activité anti-inflammatoire des différents échantillons évalués par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (ASB).	55
Figure 23: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> évalué par la méthode de diffusion sur gélose.	57
Figure 24: Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents échantillons contre <i>Escherichia coli</i>	58
Figure 25: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> évalué par la méthode de diffusion sur gélose.....	60
Figure 26: Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents échantillons contre <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Figure 27: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis de <i>Bacillus subtilis</i> évalué par la méthode de diffusion sur gélose.	62
Figure 28: Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents échantillons contre <i>Bacillus subtilis</i>	62
Figure 29: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis de <i>Bacillus cereus</i> évalué par la méthode de diffusion sur gélose.	63
Figure 30: Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents échantillons contre <i>Bacillus cereus</i>	64

Résumé

Les huiles essentielles constituent une source importante de composés bioactifs, notamment antimicrobiens, mais leur utilisation est limitée par leur volatilité, leur instabilité et leur faible biodisponibilité. La nanoencapsulation représente une stratégie efficace pour améliorer leurs propriétés physicochimiques et biologiques. Dans ce travail, l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*), extraite par hydrodistillation avec un rendement de 3 %, a été encapsulée dans des nanoparticules de silice mésoporeuse de type MCM-41. Les résultats ont montré que l'huile essentielle libre possède une activité antibactérienne notable, avec des zones d'inhibition de 16,5 mm contre *Escherichia coli*, 47 mm contre *Staphylococcus aureus*, 25,5 mm contre *Bacillus subtilis* et 27 mm contre *Bacillus cereus*. Après nanoencapsulation, l'activité antibactérienne a été significativement améliorée, atteignant 23–26 mm contre *E. coli* et jusqu'à 36 mm contre *B. subtilis*, des valeurs comparables ou supérieures à celles de la gentamicine (≈ 25 mm). L'étude anti-inflammatoire a révélé une activité conservée après encapsulation (≈ 79 %). L'amélioration observée est attribuée à la protection des composés actifs contre l'oxydation et l'évaporation, ainsi qu'à leur libération contrôlée à partir du matériau mésoporeux. En conclusion, les nanoparticules MCM-41 constituent un système prometteur pour la stabilisation et la vectorisation des huiles essentielles, avec des applications potentielles en pharmacie, agroalimentaire et biomédecine.

Mots clés : Huile essentielle, *Thymus vulgaris*, Nanoencapsulation, MCM-41, Activité biologique.

Abstract

Essential oils represent an important source of bioactive compounds, particularly with antimicrobial properties; however, their application remains limited due to their high volatility, instability, and low bioavailability. Nanoencapsulation has emerged as an effective strategy to enhance their physicochemical and biological properties. In this study, thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil, extracted by hydrodistillation with a yield of 3%, was encapsulated into mesoporous silica nanoparticles of the MCM-41 type. The results showed that the free essential oil exhibited notable antibacterial activity, with inhibition zones of 16.5 mm against *Escherichia coli*, 47 mm against *Staphylococcus aureus*, 25.5 mm against *Bacillus subtilis*, and 27 mm against *Bacillus cereus*. After nanoencapsulation, the antibacterial activity was significantly enhanced, reaching 23–26 mm against *E. coli* and up to 36 mm against *B. subtilis*, values comparable to or even higher than those of gentamicin (≈ 25 mm). The anti-inflammatory assay revealed that the activity was preserved after encapsulation ($\approx 79\%$ inhibition). This improvement can be attributed to the protection of active compounds against oxidation and evaporation, as well as their controlled release from the mesoporous material. In conclusion, MCM-41 nanoparticles constitute a promising system for the stabilization and delivery of essential oils, with potential applications in pharmaceutical, food, and biomedical fields.

Keywords: Essential oil, *Thymus vulgaris*, Nanoencapsulation, MCM-41, Biological activity.

ملخص

تُعدّ الزيوت الأساسية مصدرًا مهمًا للمركبات الحيوية الفعالة، خاصة تلك التي تمتلك خصائص مضادة للميكروبات، إلا أن استخدامها يظل محدودًا بسبب تطايرها العالي، وعدم استقرارها الفيزيائي-الكيميائي، وضعف توافرها الحيوي. وتُعتبر تقنية التغليف النانوي استراتيجية فعّالة لتحسين هذه الخصائص.

في هذه الدراسة، تم استخراج الزيت الأساسي للزعتر (*Thymus vulgaris*) بواسطة التقطير بالبخار المائي (الهيدروستلة) بمردود بلغ 3 %، ثم تم تغليفه داخل جسيمات نانوية من السيليكا المسامية من نوع MCM-41.

أظهرت النتائج أن الزيت الأساسي الحر يمتلك نشاطًا مضادًا للبكتيريا ملحوظًا، حيث بلغت أقطار مناطق التثبيط 16.5 مم ضد *Escherichia coli*، و 47 مم ضد *Staphylococcus aureus*، و 25.5 مم ضد *Bacillus subtilis*، و 27 مم ضد *Bacillus cereus*.

وبعد التغليف النانوي، تحسن النشاط المضاد للبكتيريا بشكل ملحوظ، حيث تراوح بين 23-26 مم ضد *E. coli* ووصل إلى 36 مم ضد *B. subtilis*، وهي قيم مماثلة أو أعلى من فعالية المضاد الحيوي الجنتاميسين (≈ 25 مم).

كما أظهرت دراسة النشاط المضاد للالتهاب أن الفعالية بقيت محفوظة بعد التغليف بنسبة تقارب 79 %.

يُعزى هذا التحسن إلى حماية المركبات الفعالة من الأكسدة والتبخر، بالإضافة إلى التحكم في تحريرها التدريجي من داخل البنية المسامية للمادة النانوية.

في الختام، تُعدّ الجسيمات النانوية من نوع MCM-41 نظامًا واعدًا لتثبيت ونقل الزيوت الأساسية، مع تطبيقات محتملة في المجالات الصيدلانية، والغذائية، والطبية الحيوية.

الكلمات المفتاحية: الزيت الأساسي، الزعتر (*Thymus vulgaris*) ، التغليف النانوي، MCM-41، النشاط الحيوي.

Table des matières

I.1. Introduction	2
Partie synthèse bibliographique	
II.1. Le thym (Thymus spp.).....	6
II.1.1. Introduction générale au genre Thymus:.....	6
II.1.2. Classification botanique:.....	7
II.1.3. Principales espèces utilisées en phytothérapie	7
II.1.4. Aires géographiques, écologie et conditions de culture:	9
II.1.5. Métabolites secondaires du thym:.....	11
II.1.6. Chémotypes du thym :.....	11
II.1.7. Activités biologiques majeures	12
II.2. L'huile essentielle:	13
II.2.1. Définition d'une huile essentielle:	13
II.2.2. Répartition et localisation des huiles essentielles:	13
II.2.3. Caractéristiques et propriétés des huiles essentielles:	13
II.2.4. Technique d'extraction des huiles essentielles:	14
II.2.4.1. Hydrodistillation:.....	15
II.2.4.2. Entraînement par la vapeur d'eau:	16
II.2.4.3. Extraction par le CO ₂ :.....	17
II.2.4.4. Technique de l'extraction assistée par micro-ondes:	19
II.2.5. Composition biochimique des huiles essentielles:	21
II.2.5.1. Monoterpènes et sesquiterpènes :.....	21
II.2.6. Focus sur les molécules des HE de thym:	23
II.2.6.1. Thymol:	23
II.2.7. Les limites d'utilisation des huiles essentielles:	24
II.2.8. Activité biologique de <i>Thymus vulgaris</i> :	24
II.2.9. Problèmes d'instabilité :	26
II.3. Nanoparticules:	31
II.3.1. Définition des nanoparticules:	31
II.3.2. Classification des nanoparticules:.....	32
II.3.3. Propriétés physico-chimiques particulières (surface, réactivité) :	35

II.3.4. Nanoencapsulation des huiles essentielles	35
II.3.5. Techniques de nanoencapsulation des huiles essentielles	36
II.3.5.1. Nanoprécipitation :	36
II.3.5.2. Émulsion-polymérisation.....	36
II.3.5.3. Encapsulation lipidique :	37
II.3.5.4. Nanoémulsions ultrasoniques	37
II.3.5.5. Facteurs influençant l'efficacité d'encapsulation.....	38
II.3.5.6. Applications thérapeutiques et antimicrobiennes:.....	38
II.3.5.6.1. En médecine:	38
II.3.5.6.2. En agroalimentaire:	39
II.3.5.6.3. En biotechnologie végétale:	39

Partie Matériels et Méthodes

III.1. Matériels et Méthodes.....	41
III.1.1. Matériels biologiques et produits chimiques utilisés	41
III.1.2. Matériels:	41
III.1.2.1. Verrerie et accessoires:	41
III.1.2.2. Équipements:.....	41
III.1.2.3. Produits chimiques:.....	41
III.1.3. Matériels biologique:	42
III.1.3.1. Matériel végétal:.....	42
III.1.4. Les souches bactériennes:	42
III.1.5. Extraction de l'huile essentielle:	45
III.1.6. Synthèse des nanoparticules:	47
III.1.7. L'imprégnation adaptée à l'huile essentielle de thym:.....	47
III.1.8. Test anti-inflammatoire:	49
III.1.9. Test antimicrobien:	49

Partie Résultats et Discussion

IV.1. Résultats et Discussion	52
IV.1.1. Extraction de l'huile essentielle	52
IV.1.2. Synthèse des nanoparticules:	53

IV.1.3. Encapsulation de l'huile essentielle	53
IV.1.4. Activité anti-inflammatoire	54
IV.1.5. Activité antibactérienne	56
V.1. Conclusion et perspectives	66
VI.1. Références bibliographiques	69

PARTIE I. INTRODUCTION

I.1. Introduction

Depuis l'Antiquité, les plantes médicinales occupent une place importante dans le traitement de nombreuses maladies. Les premières traces écrites de leur utilisation remontent à plus de 5000 ans, notamment chez les Sumériens (Petrovska, 2012). Aujourd'hui encore, les plantes médicinales représentent une source essentielle de soins dans plusieurs régions du monde, particulièrement dans les pays en développement. En raison de leurs propriétés thérapeutiques variées, les produits naturels d'origine végétale suscitent un intérêt croissant comme alternatives aux composés chimiques de synthèse (Reverter et al., 2017).

Parmi ces plantes, les plantes aromatiques sont largement utilisées dans les domaines alimentaire, pharmaceutique et médicinal grâce à leur richesse en métabolites secondaires tels que les huiles essentielles, les flavonoïdes et les vitamines. Ces composés possèdent plusieurs activités biologiques, notamment des propriétés antimicrobiennes, antioxydants et antivirales (Michel, 2011).

Les huiles essentielles constituent la fraction la plus active de ces plantes et jouent un rôle important dans la conservation des aliments ainsi que dans le traitement de certaines infections.

Les huiles essentielles sont des substances odorantes complexes extraites de différentes parties des plantes telles que les feuilles, les fleurs, les graines ou les racines (Bruneton, 2009). Elles sont généralement obtenues par hydrodistillation ou entraînement à la vapeur d'eau. De nombreuses études ont démontré leur efficacité antibactérienne contre plusieurs microorganismes pathogènes (Mangalagiri et al., 2021, Gheorghita et al., 2022).

Parmi les plantes aromatiques les plus étudiées figurent le thym (*Thymus spp.*), reconnu pour sa richesse en thymol et carvacrol, deux composés responsables de son importante activité antimicrobienne.

Malgré leurs nombreux avantages, les huiles essentielles présentent certaines limites liées à leur forte volatilité, leur faible solubilité dans l'eau et leur sensibilité à l'oxydation, à la lumière et à la température, ce qui réduit leur stabilité et leur efficacité (Pavoni et al., 2020).

Afin de surmonter ces contraintes, plusieurs approches technologiques ont été développées, notamment la nanoencapsulation, qui permet de protéger les composés actifs et de contrôler leur libération (Albuquerque et al., 2022).

Dans ce contexte, les matériaux mésoporeux à base de silice, tels que le MCM-41, apparaissent comme des vecteurs prometteurs en raison de leur grande surface spécifique, de leur porosité élevée, de leur stabilité chimique et thermique, ainsi que de leur biocompatibilité. Ces propriétés confèrent à ces nanomatériaux une capacité importante de chargement et de libération contrôlée des composés actifs.

L'objectif du présent travail est d'encapsuler l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) dans des nanoparticules de silice mésoporeuse de type MCM-41 afin d'améliorer sa stabilité, de protéger ses composés bioactifs et de renforcer son activité biologique. Ce travail vise également à évaluer l'efficacité antibactérienne et anti-inflammatoire des nanoparticules chargées, en comparaison avec l'huile essentielle libre.

Ce mémoire est structuré en deux parties principales : une première partie consacrée à l'étude bibliographique portant sur le thym, les huiles essentielles et les nanotechnologies, et une seconde partie expérimentale décrivant les matériaux et méthodes utilisés, ainsi que les résultats obtenus et leur discussion.

PARTIE II. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1. Le thym (*Thymus* spp.)

II.1.1. Introduction générale au genre *Thymus*:

Le genre *Thymus*, l'un des 220 genres les plus riches en diversité au sein de la famille des labiées, réputée pour leurs huiles essentielles parfumées, trouve son foyer principal dans la partie occidentale du bassin méditerranéen (Morales, 2002) *Thymus vulgaris*, également appelé localement « Zaitra », est l'espèce la plus célèbre. Le nom « *Thymus* » provient du mot grec « *Thymos* », signifiant « parfumé », en raison de l'odeur agréable émanant de la plante. Cette espèce est un élément distinctif de la flore méditerranéenne, reconnue non seulement pour ses qualités aromatiques, mais également pour ses nombreuses propriétés médicinales (Iserin, 2001) *Thymus vulgaris* a été ainsi nommé par Carl Von Linné en 1753 et reste le nom utilisé par toutes les nomenclatures scientifiques (Belmalha et al., 2015) Les noms vernaculaires de l'espèce *Thymus vulgaris* sont les suivants:

Arabe : Zaitra

Français : thym commun, thym vulgaire, thym de jardins, farigoule et barigoule.

Allemande: Thymian, Echter Thymian, Garten thymian, Römischer thymian.

Anglais : common thym, garden thym (Teuscher et al., 2005).



Figure 1: Plante du genre *Thymus*

II.1.2. Classification botanique:

La classification de thym est présentée dans le tableau 1, (Djedir, 2018).

Tableau 1 : La classification de thym

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes (phanérogames)
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous classe	Gamopétales (Astérisées)
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Thymus
Espèce	Thymus vulgaris

II.1.3. Principales espèces utilisées en phytothérapie

Parmi les nombreuses espèces appartenant au genre *Thymus*, certaines se distinguent par leur importance particulière en phytothérapie et en biotechnologie. Le tableau 02 suivant présente les principales espèces les plus valorisées, leurs composés majeurs, leurs propriétés biologiques ainsi que leurs applications biotechnologiques (Miguel, 2010, Nickavar et al., 2005)

Tableau 2: Principales espèces du genre *Thymus* utilisées en phytothérapie et en biotechnologie

Espèce	Principaux composés	Propriétés biologiques / usages phytothérapeutiques	Applications biotechnologiques
<i>Thymus vulgaris</i> L.	Thymol, carvacrol, linalol, géraniol	Activités antiseptiques, antibactériennes, antifongiques, expectorantes, antioxydantes et anti-inflammatoires ; utilisé dans les affections respiratoires, digestives et cutanées	Culture in vitro, micropropagation, optimisation de la production d'huiles essentielles et de métabolites secondaires
<i>Thymus zygis</i> L.	Thymol, carvacrol, p-cymène, γ -terpinène	Activités antimicrobiennes, antioxydants et anti-inflammatoires ; utilisé en phytothérapie traditionnelle et dans la conservation naturelle des aliments	Extraction de molécules bioactives, formulations antimicrobiennes naturelles, bioconservation
<i>Thymus capitatus</i>	Carvacrol, thymol, p-cymène, γ -terpinène	Activités antibactériennes, antifongiques, antiseptiques, antispasmodiques et anti-inflammatoires ; utilisé contre les infections respiratoires et digestives	Production de composés bioactifs, encapsulation des huiles essentielles, conservation alimentaire, agriculture, cosmétique et pharmacie

II.1.4. Aires géographiques, écologie et conditions de culture:

A - Aires géographiques:

Le genre *Thymus* est largement distribué dans le monde (Figure 2). La région méditerranéenne peut être décrite comme le centre de spéciation du genre. Quinze espèces (dont 12 endémiques) poussent dans le nord-ouest de l'Afrique, au nord du désert du Sahara (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), dont trois seulement dans la péninsule ibérique. Deux espèces sont communes dans les montagnes d'Éthiopie (*T. serrulatus*, *T. schimperi*) et un est présent au sud-ouest des montagnes d'Arabie (*T. laevigatus*). En Grèce, 18 espèces ont été répertoriées 36, en Turquie et 17 dans la Flora Iranica. Plus à l'Est, *Thymus* se trouve dans la péninsule du Sinaï (*T. bovei* et *T. decussatus*), et dans les régions arides de l'Asie occidentale jusqu'à l'Himalaya, aux limites de la région tropicale jusqu'à l'Asie orientale et au Japon. En Chine, 11 espèces ont été répertoriées. Au nord, il est présent en Sibérie et en Europe du Nord. On sait que les populations introduites qui poussent actuellement à l'état sauvage existent dans des régions aussi éloignées que le Canada (*T. serpyllum* et *T. pulegioides*), le Chili (*T. vulgaris*) ou la Nouvelle-Zélande (*T. pulegioides* et *T. vulgaris*) (Morales, 2002).

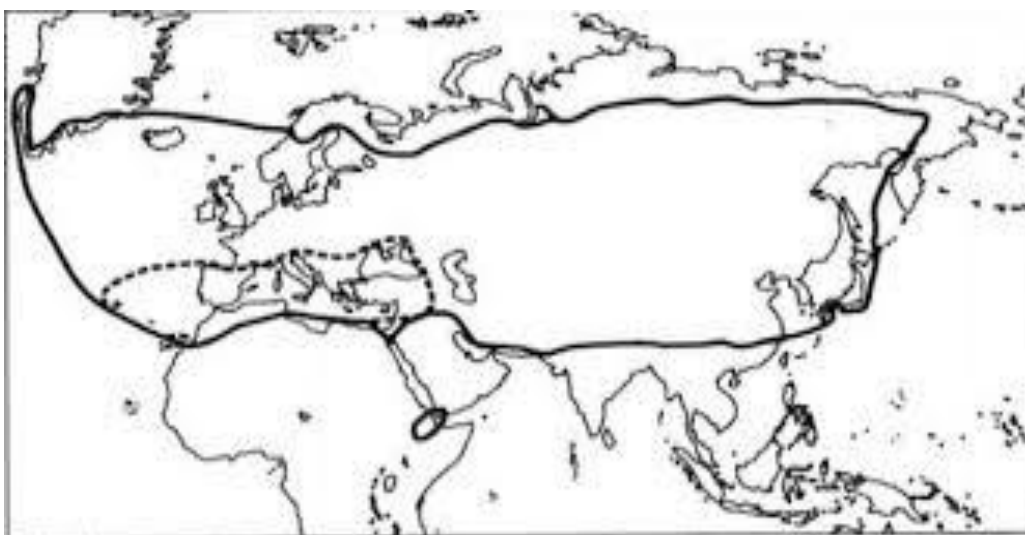


Figure 2 : Répartition du genre *Thymus* dans le monde. La ligne en pointillés toutes les sections (cf. classification du genre *Thymus*) excepté la section *Serpyllum* et section *Hyphodromi* subsect. *Serpyllastrum* (Morales, 2002).

- Le cercle noir représente la zone de distribution du genre *Thymus* dans le monde.

B- Écologie :

Selon Morales, (2002) les espèces du genre *Thymus* sont des plantes héliophiles et aiment le soleil, ce qui reflète l'écologie du genre. Les plantes de *Thymus* vivent souvent sur des roches ou des cailloux et il est très important que les sols soient bien drainés. Mais différentes espèces de *Thymus* nécessitent des substrats très différents. Ce sont des plantes très résistantes, ce qui leur permet de résister à des conditions climatiques extrêmes en matière de température et d'approvisionnement en eau. Ils n'évitent ni le froid ni l'aridité. Les poils denses et tomenteux ainsi que les feuilles aciculaires permettent à certaines espèces de supporter des conditions très sèches. La forte production d'huiles essentielles peut également être une caractéristique adaptative au climat sec, car les substances volatiles s'évaporent et produisent une atmosphère saturée autour de la plante qui rend la perte d'eau plus difficile.

C - Conditions de culture:

Le thym est une plante vivace résistante au froid qui peut supporter même les climats froids de la Sibérie dans certains cas. Elle pousse de façon industrielle dans plusieurs pays avec une grande diversité de conditions climatiques (Russie, Pologne, Suisse, Maroc, Espagne, Iran, Egypte, Afrique du Sud, etc.). Cependant les meilleurs rendements sont obtenus dans les pays au climat méditerranéen, c'est-à-dire un climat avec un soleil constant et une longue saison de croissance (Espagne, France, Maroc). La plante a besoin d'une exposition directe au soleil et préfère les climats chauds et modérément secs, les hivers doux et les étés ensoleillés. Elle s'épanouit aux endroits où une température moyenne de 20-30°C pendant le printemps et au début de l'été est monnaie courante. Une température du sol au-dessus de 18°C favorise la croissance et la régénération après la récolte (Morales, 2002, Ozguven & Tansi, 1998, Stahl-Biskup & Venskutonis, 2012).

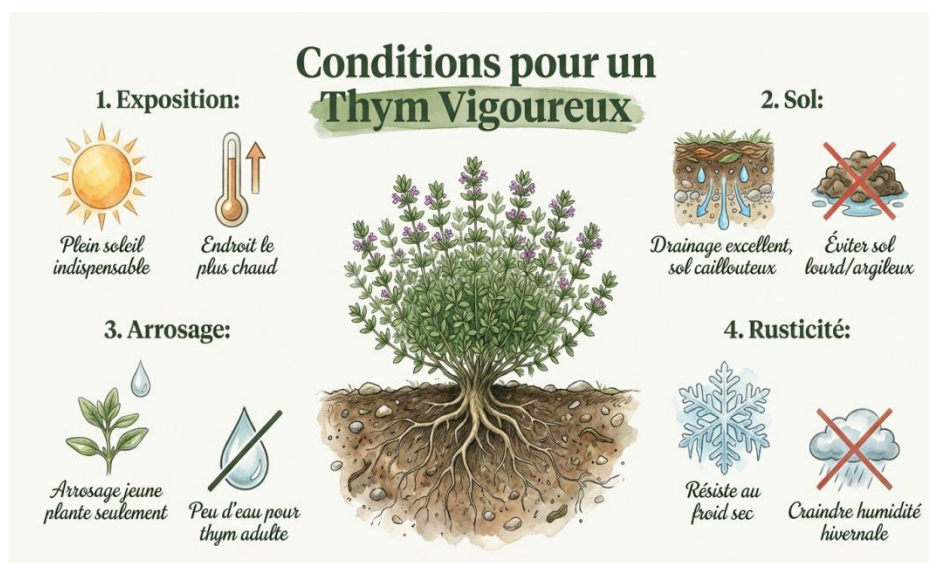


Figure 3: Les conditions de culture du thym (Stahl-Biskup & Venskutonis, 2012).

II.1.5. Métabolites secondaires du thym:

Les métabolites secondaires participent à l'adaptation écologique et aux propriétés biologiques du thym (Mohamadi, 2024). Trois grandes familles dominent :

A. Terpénoïdes :

Principalement des **monoterpènes** (thymol, carvacrol, linalol), responsables de l'arôme et des activités antimicrobiennes.

B. Composés phénoliques :

Ils contribuent fortement aux activités antioxydantes et anti-inflammatoires.

C. Flavonoïdes :

Pigments végétaux aux rôles multiples : protection UV, régulation métabolique et activités pharmacologiques (antioxydantes, antimicrobiennes).

II.1.6. Chémotypes du thym :

Thymus vulgaris présente une importante variabilité chimique (Pothier, 2001).

On distingue plusieurs chémotypes selon le composé majoritaire :

- Thymol
- Carvacrol

- Linalol
- Géraniol
- Thujanol
- α -terpinéol
- 1,8-cinéole

Cette variabilité dépend de facteurs génétiques, climatiques, édaphiques et des conditions post-récolte.

II.1.7. Activités biologiques majeures

Le thym présente des propriétés :

- antimicrobiennes (bactéries, champignons, virus),
- anti-inflammatoires (modulation des cytokines),
- antioxydantes (piégeage des radicaux libres),
- antiparasitaires et antiseptiques.

Ces activités sont principalement attribuées au thymol et au carvacrol (Saadallah et al. 2020).

Applications en biotechnologie végétale :

- culture in vitro et conservation de génotypes,
- induction de métabolites secondaires,
- standardisation d'extraits végétaux,
- développement de formulations antimicrobiennes naturelles.

II.2. L'huile essentielle:

Le terme "huile essentielle " a été inventé au 16ème siècle par le médecin suisse Parascelsus Von Hohenheim afin de désigner le composé actif d'un remède naturel (Bouhekrit, 2018). Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums (Tabti & Sali, 2016).

II.2.1. Définition d'une huile essentielle:

La définition donnée par AFNOR en 2000 est la suivante : « les huiles essentielles sont des produits obtenus à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des Citrus, soit par distillation sèche ». Les HE sont des substances d'origine végétale de composition complexe. Caractérisées par sa volatilité, huileuse et odorante, présentes dans les plantes aromatiques dans plusieurs endroits (dans les fleurs, les feuilles, les fruits, les graines, l'écorce et les racines) (Bilal, 2016).

II.2.2. Répartition et localisation des huiles essentielles:

Les huiles essentielles sont rencontrées dans diverses familles botaniques, elles sont largement répandues dans le monde végétal et se trouvent en quantité appréciable chez environ 2000 espèces réparties en 60 familles.

Ces essences se localisent dans toutes les parties vivantes de la plante, dans une même plante, ces huiles peuvent exister à la fois dans différents organes, ou la composition chimique peut varier d'un organe à un autre. Ces essences aromatiques sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante (Bouchikhi Tani, 2011).

II.2.3. Caractéristiques et propriétés des huiles essentielles:

I.4. Caractéristiques physicochimiques Les HEs sont caractérisées par la propriété d'être liquides et volatiles à température ambiante. Elles sont souvent légèrement colorées avec une forte odeur. Leur densité est généralement comprise entre 0,80 et

0,99 à 20 °C, ce qui explique qu'elles soient le plus souvent plus légères que l'eau. Elles sont très peu solubles dans l'eau mais entraînables à sa vapeur. En revanche, les HEs sont solubles dans les solvants organiques usuels et dites donc liposolubles.

Les huiles essentielles présentent un indice de réfraction généralement compris entre 1,45 et 1,60, qui varie principalement en fonction de leur teneur en monoterpènes et en composés oxygénés. Les huiles essentielles sont très sensibles à la dégradation. Un nombre important de leurs constituants existe sous forme de couples d'énantiomères ou d'isomères (Kamatou et al., 2013). Certains possèdent des odeurs différentes (Figure 4 a) alors que d'autres ont des odeurs proches et ne se distinguent que par leur seuil de perception (Figure 4 b). Ceci révèle l'importance de leur structure tridimensionnelle.

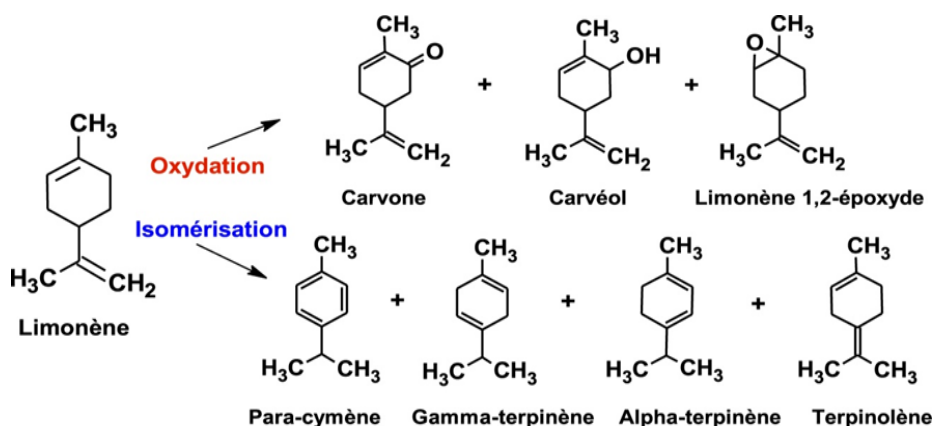


Figure 4 :Exemples de couples d'énantiomères et d'isomères des composants d'huiles essentielles présentant des odeurs a) différentes ou b) similaires.

II.2.4. Technique d'extraction des huiles essentielles:

Le mode d'extraction des huiles essentielles suit les normes AFNOR NF T 75-006 et autres, qui stipulent que seuls l'entraînement à la vapeur, les procédés mécaniques et la distillation sèche des écorces d'agrumes peuvent être utilisés pour produire des huiles essentielles. Par conséquent, nous allons d'abord passer en revue les différentes méthodes d'extraction les plus couramment utilisées. Dans la première partie, nous présenterons en détail les technologies utilisées dans l'industrie et les laboratoires, puis dans la deuxième partie, nous présenterons HEs des matières végétales. Les méthodes les plus couramment utilisées sont en détail les technologies utilisées

exclusivement dans les laboratoires. Diverses méthodes d'extraction sont utilisées commercialement pour séparer les huiles essentielles.

II.2.4.1. Hydrodistillation:

C'est la technique la plus simple et la plus courante. Il comprend l'immersion des matières premières dans l'eau puis bouillies entières. Cette opération est généralement réalisée sous pression atmosphérique. La vapeur formée est condensée par le système de réfrigération à débit d'eau. Des expériences menées jusqu'à épuisement de l'essence matricielle montrent que le temps de distillation des organes végétaux (Charik & Kadri, 2019). Ligneux est plus long que celui des plantes herbacées. Cette différence est étroitement liée à l'emplacement des systèmes de production ou de stockage de HEs, qui sont soit situés à la surface de la plante, soit à l'intérieur du tissu végétal. Ces ouvrages ont donc un impact sur le processus de distillation de l'eau, c'est-à-dire sur le mécanisme continu mis en jeu, et donc sur la durée de l'opération d'extraction. Si ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la couche cornée se brise rapidement lors de l'ébullition et les composés volatils s'évaporent immédiatement. Lorsque les H.E sont sous la peau, elles doivent d'abord diffuser dans l'épaisseur du tissu végétal puis entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur pour s'évaporer comme des sécrétions de surface (Attou, 2017).

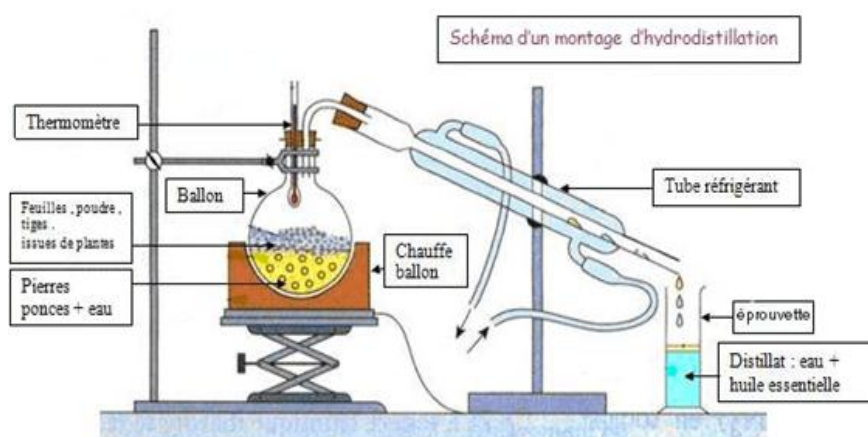


Figure 5 :Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation

II.2.4.2. Entraînement par la vapeur d'eau:

C'est le procédé le plus ancien et le plus approprié pour extraire l'essence des plantes. C'est aussi la seule méthode de distillation recommandée par la Pharmacopée française car elle minimise les modifications d'hydrolyse (en particulier les esters). Le distillateur ou distillateur est utilisé pour l'extraction quantitative et qualitative des huiles essentielles. L'ancien distillateur ne séparait pas les plantes de l'eau, ce qui faisait que les plantes cuisaient et produisaient des huiles essentielles à l'odeur de "brûlé". Dans les distillateurs récents, l'eau et 5 Chapitre I : Les méthodes d'extraction des huiles essentiels dans les plantes les plantes aromatiques sont soit séparées par une grille dans une même cuve, soit placées dans deux cuves différentes.

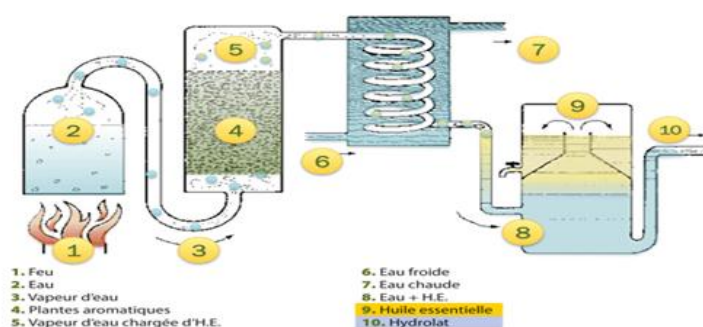


Figure 6: Montage de l'entraînement à la vapeur d'eau

II.2.4.3. Extraction par le CO₂:

L'originalité de cette technologie repose sur le solvant utilisé : le CO₂ en phase supercritique. L'extraction consiste à comprimer le dioxyde de carbone à une pression et une température supérieures à son point critique ($P = 72,8$ bars et $T = 31,1$ °C). A l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide ni gazeux, ce qui lui confère une excellente capacité d'extraction et peut être ajusté à volonté en ajustant la température de traitement. Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique et de mauvais solvants à l'état gazeux. Les avantages de ce procédé sont les suivants : Le CO₂ est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et peu coûteux ;

- En fin de cycle, la séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO₂ à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse ;

L'extraction des huiles essentielles par le CO₂ supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (Alloun, 2018). Cependant l'installation industrielle de ce procédé reste onéreuse, et l'appareillage est encore envahissant. En bref, il n'y a pas de meilleur processus que d'autres processus. Selon l'usine ou partie d'usine, chaque méthode a ses propres instructions, le contrôle d'utilisation du produit obtenu et les aspects économiques tout aussi importants. L'avantage de cette technologie est qu'elle combine les caractéristiques du gaz et du liquide lors du processus d'extraction, minimisant ainsi les processus de dégradation possibles tels que l'oxydation ou la séparation. Cela est dû à la réduction du temps d'extraction (Piochon 2008). L'extension de l'utilisation des fluides supercritiques à l'extraction liquide-liquide et à la chromatographie augmente la possibilité que ces processus soient déjà importants.

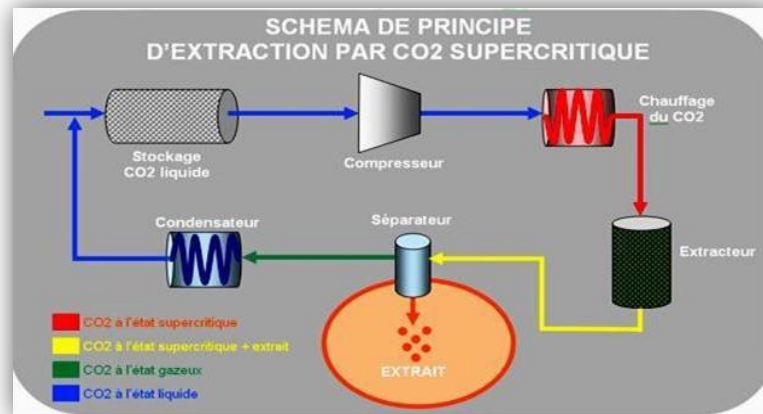


Figure 7 : Schéma de la technique d'extraction par le CO₂ supercritique.

II.2.4.4. Technique de l'extraction assistée par micro-ondes:

10 Technique de l'extraction assistée par micro-ondes : En 1986, Ganzler et al., a été le premier à proposer une technologie d'extraction Solvant auxiliaire pour micro-ondes pour analyse chromatographique. Par rapport aux méthodes traditionnelles, cette technologie peut réduire le temps d'extraction, réduisant ainsi les coûts énergétiques. En 1990, Paré et al ont déposé le premier brevet européen sur « l'extraction assistée par micro-ondes de produits naturels ». Ils proposent d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant micro-onde transparent tel que l'hexane. Par conséquent, les microondes atteindront directement les glandes et le système vasculaire de la plante. Depuis, différentes technologies d'extraction par micro-ondes ont été développées et plusieurs brevets ont été déposés : le procédé « d'hydrodistillation par microondes » est basé entièrement sur le principe d'hydrodistillation classique. Le matériel végétal est donc placé en présence d'une quantité d'eau suffisante dans un ballon disposé dans l'enceinte du four à micro-ondes. Le système de réfrigération ainsi que la partie prévue pour la récupération des essences sont situés à l'extérieur du four. Les avantages cités sont la rapidité et la similitude de la composition de l'huile par rapport à une hydrodistillation classique. Extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (MicrowaveAssisted Extraction) et MAP™ (MicrowaveAssistedProcess). Cette méthode est la plus utilisée. Si sa rapidité de mise en œuvre en fait une technique de choix pour l'extraction et plus particulièrement pour l'extraction de composés aromatiques d'origine végétale, le produit obtenu ne peut réglementairement être considéré comme une huile essentielle. De plus l'utilisation de solvant organique présente certains inconvénients : contamination du produit fini, problème pour son élimination totale. Rappelons que l'industrie agro-alimentaire applique des lois très strictes sur l'origine des produits utilisés (Bousbia, 2011).

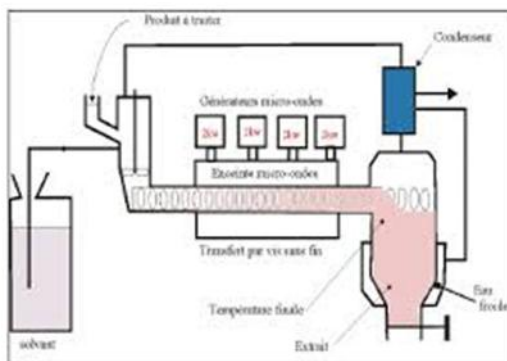


Figure 8 : Schéma d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. MAE (MicrowaveAssisted Extraction) et MAP™ (MicrowaveAssistedProcess.)

II.2.5. Composition biochimique des huiles essentielles:

II.2.5.1. Monoterpènes et sesquiterpènes :

Monoterpènes : La condensation par une liaison 1'-4 d'un IPP et d'un DMAPP aboutit à la formation du pyrophosphate de géranyle, le précurseur des monoterpènes (C₁₀). Le GPP peut subir des réactions de cyclisation et/ou de fonctionnalisation mettant en jeu diverses enzymes spécifiques et donnant naissance à un nombre remarquable de structures monoterpéniques possibles. Les monoterpènes peuvent donc être acycliques, mono-, bi- voire tricycliques et peuvent être à l'origine d'alcools, esters, phénols, cétones, lactones, aldéhydes ou encore d'oxydes. Au total, on estime à environ 1500 le nombre de monoterpènes connus, mais tous ne sont pas présents dans les huiles essentielles (Breitmaier, 2006, Besombes, 2008).

Les monoterpènes acycliques sont de structures simples dans lesquelles on visualise aisément l'assemblage « tête-queue » des unités isoprènes, comme dans le β -ocimène (Figure 9).

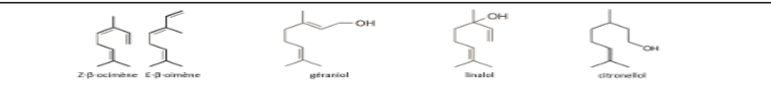
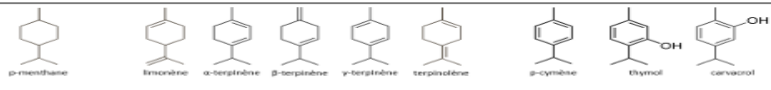
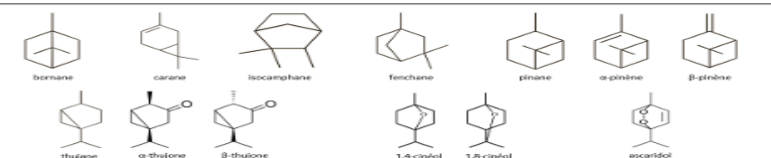
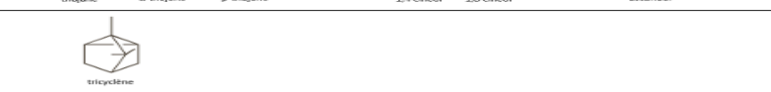
Structures acycliques	 β -ocimène, β -ocimène, géraniol, linalol, citronellol
Structures monocycliques	 p-menthane, limonène, α -terpinène, β -terpinène, γ -terpinène, terpinolène, p-cymène, thymol, carvacrol
Structures bicycliques	 isoborneol, borneol, isocamphane, fenchone, pinène, α -pinène, β -pinène, thujène, α -thujone, β -thujone, 1,4-cinéol, 1,8-cinéol, eucalyptol
Structures tricycliques	 tricyclène

Figure 9: Diversité des monoterpènes

On peut également citer dans cette catégorie des composés fréquemment rencontrés dans les huiles essentielles : géraniol, linalol ou citronellol. Les monoterpènes monocycliques sont les plus nombreux (Thormar, 2011).

Ils se forment par une réaction en plusieurs étapes mettant en jeu des monoterpénecyclases. Ils ont cependant tous un même intermédiaire de formation : le cation α -terpinyll, et tous dérivent du squelette p-menthane issu de la cyclisation de

monoterpènes acycliques réguliers. Les structures tricycliques sont rares parmi les monoterpènes. On peut citer comme exemple le tricyclène. Il existe également des monoterpènes dits irréguliers car ne dérivant pas d'une condensation 1'-4 de l'IPP et du DMAPP(Thormar, 2011,Dewick, 2002).

Sesquiterpènes : De la même manière que le GPP pour les monoterpènes, le pyrophosphate de farnésyle est le précurseur des sesquiterpènes (C₁₅). Il résulte de l'addition d'un IPP sur le pyrophosphate de géranyle (Baser & Buchbauer, 2009).Le FPP comporte trois doubles liaisons, ce qui ouvre plus de possibilités de cyclisation et plus d'opportunités de variations structurelles résultant de divers réarrangements, d'oxydations, de dégradation, etc. Les sesquiterpènes forment donc un groupe de composés structurellement diversifiés, mais dont tous les membres dérivent du FPP. Ce groupe comprend donc un nombre importants de structures différentes : plus de 120 squelettes identifiés pour plus de mille composés identifiés (Figueredo, 2007).

De nombreuses configurations sont possibles : linéaires, ramifiés, mono- bi- ou tricycliques. Les sesquiterpènes sont, en termes de fréquence, le deuxième groupe le plus présent dans les huiles essentielles après les monoterpènes (Thormar, 2011).

Parmi les sesquiterpènes acycliques, on peut citer le (E)-nérolidol présent dans plusieurs huiles essentielles commercialement importantes comme le néroli (fleurs de *Citrus aurantium* L.). Ce composé peut représenter jusqu'à 90% de certaines huiles essentielles. Le farnésol, également un sesquiterpène acyclique, est un composé important de l'huile essentielle de fleurs de rose (*Rosa x damascena* Mill.) ou du bois de santal australien (*Santalum spicatum* A.DC.). Des sesquiterpènes acycliques irréguliers (issus d'autres types d'assemblages) ont été identifiés chez des espèces du genre *Santolina* (Asteraceae). Il existe également des sesquiterpènes comportant des cycles dans leurs structures. On retrouve dans les sesquiterpènes monocycliques l' α -bisabolène et ses dérivés oxydés, l' α et le β -bisabolol présents en grande quantité dans l'huile essentielle de camomille allemande (*Matricaria recutita* L.). Cette huile essentielle est également riche en chamazulène, du groupe des azulènes (sesquiterpènes bicycliques), donnant une coloration bleue caractéristique. Le cédrène et le santalol sont des exemples de sesquiterpènes tricycliques.

II.2.6. Focus sur les molécules des HE de thym:

II.2.6.1. Thymol:

Le thymol est un monoterpène naturel dérivé phénolique de cymène et un isomère de carvacrol. Le thymol (10–64%) est l'un des principaux constituants des huiles essentielles de thym. Il est couramment utilisé dans les préparations dentaires pour réduire les bactéries productrices de mauvaises odeurs (Botelho et al., 2007). Il a également été rapporté que le thymol réduit la résistance bactérienne à certains antibiotiques tels que pénicilline (Gallucci et al., 2009). En outre, le thymol possède différentes propriétés biologiques et pharmacologiques, des propriétés telles que antimutagène, antitumoral, antioxydant, anti-inflammatoire (Bhalla et al., 2013).

III.2.2.Carvacrol:

Le carvacrol est un phénol monoterpénoïde, principalement présent dans certaines espèces de plantes telles que thym, origan, bergamote sauvage. À l'heure actuelle, le carvacrol est utilisé en faibles concentrations comme ingrédient aromatisant alimentaire et conservateur, en raison de son odeur agréable et de son activité antimicrobienne, pour la prévention de la croissance et contamination (Oussalah et al., 2007).

II.2.7. Les limites d'utilisation des huiles essentielles:

Le thym est largement utilisé dans l'alimentation et l'industrie des parfums en raison de ses propriétés aromatiques, de son pouvoir d'amélioration des saveurs et de ses qualités de conservateur alimentaire grâce à ses effets antibactériens et antioxydants. En plus de ces effets, le thym présente une gamme d'activités biologiques (Kuethe, 2017). Voici un résumé des principales activités biologiques et thérapeutiques du thym (Figure 10) et de ses principaux composants, en mettant l'accent sur ses activités antioxydantes, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antibactériennes et antifongiques. La figure 10 illustre également ces propriétés (Halat et al., 2022).

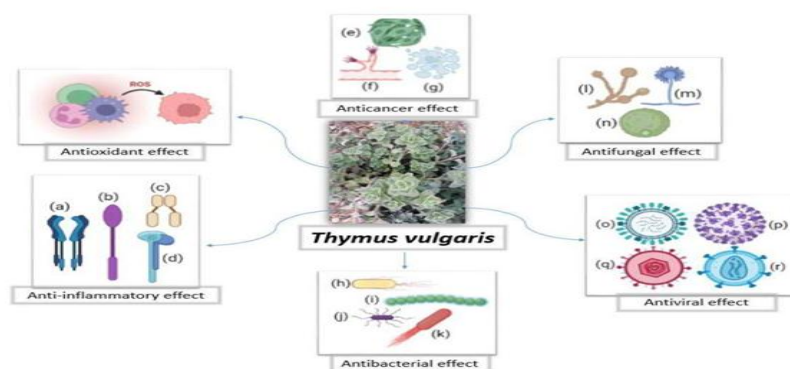


Figure 10: certains effets biologiques de *Thymus vulgaris* (Halat et al., 2022).

II.2.8. Activité biologique de *Thymus vulgaris*:

Activité antimicrobienne :

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

mélanges respectifs, ce qui suggère des effets synergiques des composants mineurs et souligne l'importance de tous les composants dans l'activité biologique des huiles essentielles (Martins, 2020).

Activité antivirale de *Thymus vulgaris*:

Des extraits de *Thymus vulgaris* ont été testés in vitro pour leur efficacité antivirale contre le virus de l'herpès simplex (HSV). Les extraits aqueux de thym ont montré une inhibition du HSV-1, du HSV-2 et d'une souche résistante à l'acyclovir du HSV-1 lorsqu'ils ont été testés sur des cellules RC-37 dans une étude de réduction de plaque. Ces résultats suggèrent que le thym peut présenter une activité antivirale contre le HSV (Hosseinzadeh et al., 2015).

Activité antifongique:

Le thym présente des propriétés antifongiques principalement attribuées aux composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol. Ces composés ont démontré des effets fongitoxiques importants dans des tests sur différents champignons (Arras & Usai, 2001). L'huile essentielle de thym a également montré une action antifongique contre *Aspergillus flavus*, induisant l'apoptose, la condensation nucléaire et la perturbation de la membrane plasmique (Borugă et al., 2014). L'huile de thym peut également réduire la formation d'aflatoxines et l'expression des gènes impliqués dans la virulence des champignons (Oliveira et al., 2020). Des combinaisons synergiques d'huiles essentielles, telles que l'huile de thym et l'huile de citronnelle, ont également été étudiées pour leur activité antifongique contre certaines espèces d'*Aspergillus* vivant dans les habitations (Hlebová et al., 2021).

IV.1.4. Activités antioxydants de *Thymus vulgaris*:

Les extraits de thym présentent des effets antioxydants, principalement attribués à leur teneur élevée en composés phénoliques. Ces composés agissent en tant que chélateurs d'ions métalliques, piègeurs de radicaux libres et inhibiteurs d'enzymes oxydatives (Yanishlieva et al., 1999). Les activités antioxydantes du thym ont été démontrées par de nombreuses études in vitro et in vivo. Par exemple, des recherches ont montré que *Thymus vulgaris* possède des propriétés antioxydantes et réductrices, principalement en raison de sa teneur élevée en phénols totaux et en

flavonoïdes. Les composés phénoliques du thym jouent un rôle essentiel dans l'adsorption et la neutralisation des radicaux libres, ainsi que la décomposition des peroxydes. Ces propriétés redox confèrent aux composés phénoliques du thym leurs effets antioxydants (Wisam et al., 2017). L'huile essentielle de thym présente des propriétés antioxydants grâce à la présence de composés tels que le thymol et le carvacrol. Ces composés aident à neutraliser les radicaux libres et à protéger les cellules contre les dommages oxydatifs.

Activité anti-inflammatoire:

Des études *in vivo* ont examiné l'efficacité anti-inflammatoire de l'huile de thym. Dans une étude sur des souris présentant un œdème de la patte induit par la carragénine, l'huile de thym a réduit l'épaisseur de la patte de manière dose-dépendante. Les résultats étaient comparables à ceux obtenus avec des médicaments anti-inflammatoires courants. L'huile de thym a également réduit les exsudats inflammatoires et les leucocytes migrateurs dans un modèle de pleurésie induite par la carragénine. Les principaux composés responsables de l'activité anti inflammatoire étaient le carvacrol et le thymol (Patil et al., 2021).

II.2.9. Problèmes d'instabilité :

Stabilité des huiles essentielles Les HEs présentent une forte instabilité vis-à-vis de divers facteurs extrinsèques et intrinsèques (Figure 11). L'éventuelle dégradation des HEs peut être facilement révélée par la mesure des indices chimiques (indice de peroxyde, indice d'acide, etc.), par la détermination de grandeurs physiques (indice de réfraction, pouvoir rotatoire, miscibilité à l'éthanol, densité, etc.) et par l'analyse chromatographique (Turek & Stintzing, 2013).

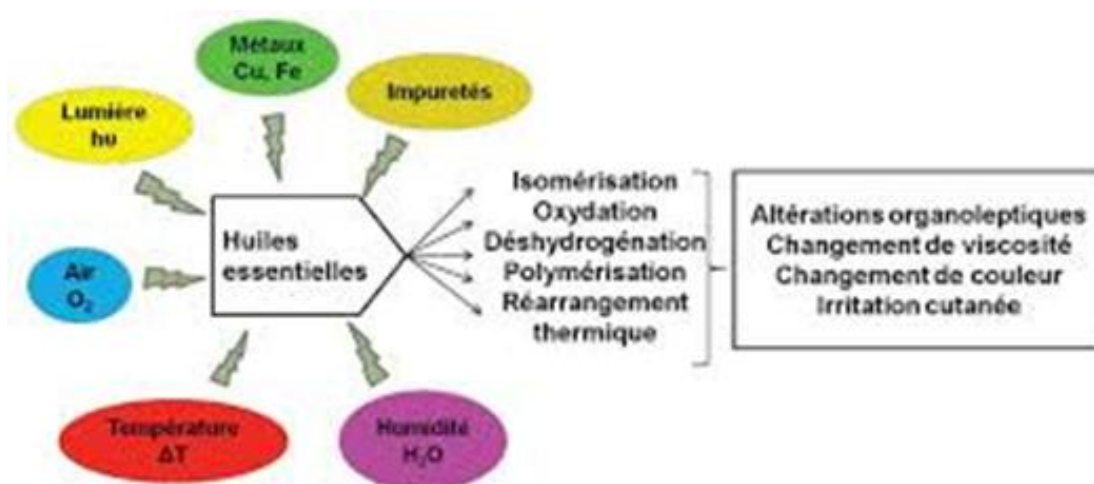


Figure 11: Différentes voies de dégradation possibles des huiles essentielles.

La conservation des HEs exige des précautions particulières. Il convient ainsi d'utiliser de petits flacons en verres teintés ou opaques pour minimiser la présence d'air et les préserver à l'abri de la lumière, l'oxygène, l'humidité et les contaminants ainsi que pour réduire l'incompatibilité qui peut exister avec certains récipients en matières plastiques. Il existe des normes spécifiques pour l'emballage, le conditionnement et le stockage des HEs (AFNOR, 1996).

Ainsi que pour le marquage des récipients les contenant (AFNOR, 1996).

Parmi les principales réactions de dégradation nous pouvons citer, entre autres, l'oxydation, l'isomérisation, la polymérisation, la racémisation, le réarrangement thermique, la volatilisation, etc. (Turek & Stintzing, 2013). En dehors de la perte ou de la modification de la structure, le problème de la dégradation subsiste dans l'altération des propriétés organoleptiques des HEs et la production de composés secondaires toxiques.

1. Effet de la lumière : Les HEs sont très sensibles à la lumière. (Misharina & Polshkov, 2005). Ont montré que l'oxydation de l'HE de fenouil était plus rapide en présence de lumière. Après deux mois à température ambiante et en présence de lumière, le trans-anéthol (composant majeur de l'HE de fenouil) a été totalement oxydé en anisaldéhyde et/ou isométries en cis-anéthol. L'isomérisation sous l'action de la lumière du trans-anéthol utilisé dans les boissons anisées, par exemple, engendre la formation du cis-anéthol. Le cis-anéthol présente une odeur désagréable de foin et une toxicité remarquable (DL50 du trans-anéthol : 900 mg /kg ; DL50 du cis-anéthol : 93 mg

/kg) (Castro et al., 2010). Il faut noter que pour des concentrations identiques, deux molécules aromatiques ne présentent pas forcément les mêmes caractéristiques olfactives, tout dépend de leur seuil de perception (déterminé par la structure et la volatilité de chacune). Par conséquent, la présence en faible quantité d'un produit de dégradation ayant un faible seuil de perception peut être suffisante pour détériorer le produit.

2. Effet de la température La température menace aussi les HEs :

Les réactions d'oxydation sous l'effet de la température peuvent être classées en 4 groupes : clivage du double liaison, formation d'époxydes, déshydrogénation et formation d'un noyau aromatique ainsi que l'oxydation des alcools en cétones et aldéhydes (McGraw et al., 1999). La dégradation de l'HE de citron à 50°C est accompagnée par une perte du géraniol, néral, β -phéllandrène et du β -caryophyllène et une augmentation du p-cymène, de l'oxyde de limonène, de l' α -terpinéol et de l'acide gérannique (Nguyen et al., 2009).

3. Effet de l'oxygène : Selon la loi de Henry, la solubilité de l'oxygène dans l'HE augmente en diminuant la température. Donc l'oxydation des HEs peut se dérouler à faible température en produisant principalement des radicaux peroxydes et des hydroperoxydes. Les peroxydes sont détectés, par exemple, dans les HEs du romarin et du pin à température ambiante alors que leur taux est plus élevé dans les HEs de lavande et du thym stockées à 5°C (Turek & Stintzing, 2012). Vu leur différence de sensibilité à l'oxygène, il convient alors de trouver les conditions optimales pour le stockage de chaque HE. La réduction de l'espace de tête dans le récipient contenant l'HE semble être insuffisante pour limiter la dégradation car des réactions de réarrangement peuvent avoir lieu même en absence de l'oxygène. Il s'avère donc important de traiter les HEs par un gaz inerte (Turek & Stintzing, 2013).

4. Effet des contaminants : Les HEs sont aussi sensibles aux contaminations provenant d'une réaction entre l'HE et le matériel d'emballage, à la présence de métaux et à l'humidité. Il a été montré que le cuivre et le fer pouvaient induire des réactions d'autooxydation suite à la présence préalable d'hydroperoxydes (Choe & Min, 2006). La dégradation peut être également induite par la présence d'autres

espèces volatiles ou d'autres HEs. Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Les HEs de laurier et de coriandre mélangées avec l'HE de fenouil, qui présente un faible pouvoir antioxydant, inhibe son oxydation (Misharina & Polshkov, 2005). Une molécule peut suivre différentes voies de dégradation et produire une large variété de produits de dégradation. La Figure I.8 montre un exemple de dégradation des constituants de l'HE de citron (Nguyen et al., 2009) à 40°C, en présence d'oxygène et d'oxyde de cuivre.

La dégradation des HEs peut aboutir à la perturbation de leurs activités pharmacologiques. Les HEs exemptes d'impuretés et de produits de dégradation ne provoquent pas de sérieux problèmes d'irritation et de sensibilisation. Par contre, la présence des produits de dégradation tels que l'oxyde de linalol issu de l'oxydation du linalol suite à son exposition à l'air, provoque des risques d'allergie dermique (Christensson et al., 2010). Les hydroperoxydes de linalol, de limonène et de cumène peuvent également provoquer des réactions allergiques.

Nécessité d'améliorer la biodisponibilité → justification de la nanoencapsulation:

Les huiles essentielles présentent de nombreuses activités biologiques, notamment des propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anti-inflammatoires. Cependant, leur utilisation reste limitée à cause de plusieurs contraintes telles que leur faible solubilité dans l'eau, leur forte volatilité, leur sensibilité à la lumière, à l'oxygène et à la chaleur ainsi que leur faible biodisponibilité. Ces facteurs entraînent une dégradation rapide des composés actifs et diminuent leur efficacité biologique (Turek & Stintzing, 2013).

Les composés hydrophobes des huiles essentielles diffusent difficilement dans les milieux biologiques aqueux, ce qui réduit leur absorption et leur stabilité. De plus, les réactions d'oxydation et d'évaporation provoquent une perte importante des molécules actives au cours du stockage et de l'utilisation (Baser & Buchbauer, 2009).

Afin d'améliorer leurs propriétés physicochimiques et biologiques, plusieurs techniques ont été développées, parmi lesquelles la nanoencapsulation. Cette

approche consiste à incorporer les molécules actives dans des systèmes nanométriques capables de protéger les huiles essentielles contre les facteurs de dégradation et d'assurer une libération contrôlée des composés bioactifs (Halat et al., 2022).

La nanoencapsulation améliore également la biodisponibilité et l'activité antimicrobienne des huiles essentielles grâce à une meilleure pénétration cellulaire et une augmentation de la surface de contact avec les microorganismes. Les nanoparticules permettent aussi de réduire la volatilité et d'augmenter la stabilité des substances encapsulées (Rudramurthy et al., 2016).

II.3. Nanoparticules:

II.3.1. Définition des nanoparticules:

Une nanoparticule fait référence à une minuscule particule dont la taille varie de 1 à 100 nanomètres. Ces particules sont si petites qu'elles ne peuvent pas être détectées à l'œil nu, elles sont plus petites que les objets de la vie courante, mais plus grandes que les atomes ou les molécules ce qui les rend soumises à des lois différentes de celles de la physique classique. Selon la définition fournie par la Commission européenne, au moins la moitié des particules dans la distribution de taille numérique doivent avoir une taille de 100 nm ou moins. En fait, la plupart des nanoparticules ne sont constituées que de quelques centaines d'atomes, ce qui met en évidence leur échelle incroyablement petite et leurs caractéristiques uniques. (TWI, n.d.).

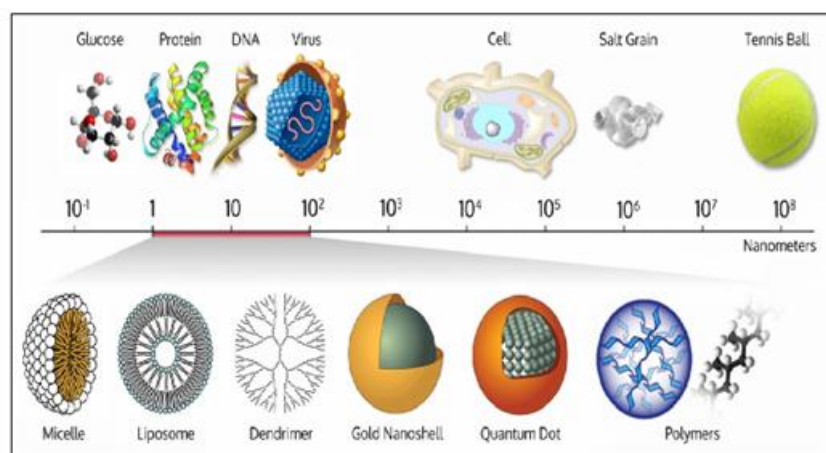


Figure 12 : Comparaison de différentes tailles d'objets par rapport à l'échelle nanométrique (Wichlab, 2017).

II.3.2. Classification des nanoparticules:

La classification des nanoparticules est une étape cruciale pour comprendre leurs propriétés et leurs applications potentielles. Il existe plusieurs façons de catégoriser les nanoparticules, chacune avec ses avantages et ses limites (Ijaz et al., 2020, Ealia & Saravanakumar, 2017).

1. Nanoparticules polymériques: Les NPs à base de polymères sont composées de polymères naturels ou synthétiques, ce qui en fait un choix populaire en tant que systèmes colloïdaux. Ils offrent plusieurs avantages par rapport à d'autres options de nanovecteurs comme les liposomes, les micelles. Ils sont très stables dans les fluides biologiques, ont une grande variété de polymères parmi lesquels choisir et peuvent être facilement modifiées afin de contrôler la libération de la substance piégée en réponse à certains stimuli (Patravale et al., 2012).

Les NPs polymériques ont été largement étudiées ces derniers temps en raison de leurs caractéristiques uniques, résultant de leur petite taille. Ils offrent de nombreux avantages en tant que vecteurs de médicaments, tels que la capacité de contrôler la libération de médicaments, de protéger les molécules actives de leur environnement, d'améliorer la biodisponibilité et d'améliorer les résultats thérapeutiques, les nanoparticules polymériques se sont révélées très prometteuses dans l'administration ciblée de médicaments pour le traitement de diverses maladies (Rai et al., 2015).

2. Dendrimères: Les dendrimères sont des nanostructures bien définies, stables et homogènes qui ont une structure tridimensionnelle et hautement ramifiée, ce qui permet des capacités fonctionnelles élevées. Les groupes fonctionnels qui peuvent être attachés aux branches globulaires ou semi-globulaires des dendrimères comprennent les glucides, les peptides et les groupes de silicium, entre autres (Gagliardi et al., 2021).

3. Nanoliposomes : Les liposomes sont des vésicules, de taille nano ou micro, constituées d'une bicouche phospholipidique entourant un compartiment aqueux central. Ces vésicules utilisées pour administrer des médicaments, les médicaments

hydrosoluble étant contenus dans le noyau et les médicaments hydrophobes étant piégés dans la couche lipidique (Zielińska et al., 2020).

4. Les nanocapsules et les nanosphères:

4.1.Nanosphères : les nanosphères polymériques, sont des particules solides d'un diamètre compris entre 100 et 200 nm qui peuvent être utilisées pour transporter des médicaments en les dissolvant, en les piégeant, en les encapsulant, en les liant chimiquement ou en les adsorbant sur une matrice polymère. Bien que la petite taille des nanosphères puissent ralentir leur élimination du corps, elles sont toujours éliminées par le système réticulo-endothélial (RES) et séquestrées dans des organes comme le foie et la rate en raison de leur surface hydrophobe. Afin de prolonger leur circulation, les surfaces des nanoparticules doivent être modifiées pour éviter la clairance par le RES (Letchford & Burt, 2007).

4.2.Nanocapsules : Les nanocapsules sont des systèmes vésiculaires de taille nanométrique avec une structure noyau-coquille, dans lesquels le médicament est confiné dans un réservoir ou une cavité entourée d'une membrane ou d'un revêtement polymère. La cavité peut contenir le médicament sous forme liquide ou solide, ou sous forme de dispersion moléculaire, et peut être lipophile ou hydrophobe selon le procédé de préparation et les matériaux utilisés. Les nanocapsules peuvent également porter la substance active sur leurs surfaces ou à l'intérieur de la membrane polymérique (Mora-Huertas et al., 2010).

On peut donc déduire que la principale distinction entre les nanocapsules et les nanosphères réside dans leur structure. En termes de taille, les nanocapsules comme les nanosphères ont des dimensions de l'ordre du nanomètre, typiquement entre 100 et 200 nm .

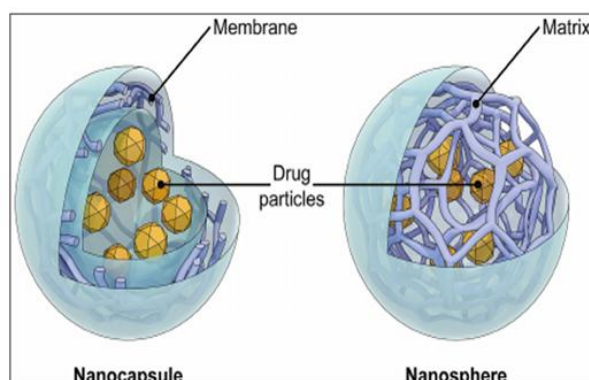


Figure 13: Représentation schématique de la structure d'une nanocapsules et d'une nanosphères (ResearchGate, n.d.).

5. Nanoparticules inorganiques:

Les nanoparticules inorganiques sont un type de nanoparticules qui ne sont pas constituées de carbone. Elles sont généralement classées en deux grandes catégories : les nanoparticules à base de métal et celles à base d'oxydes métalliques.

Les nanoparticules à base de métal peuvent être synthétisées à partir de divers métaux tels que l'aluminium, l'argent et l'or. En revanche, les nanoparticules à base d'oxydes métalliques sont obtenues à partir de composés oxydés et sont développées afin d'améliorer ou de modifier les propriétés physico-chimiques de leurs homologues métalliques. Ces nanoparticules présentent généralement une réactivité et une efficacité supérieures à celles des formes métalliques classiques (Ijaz et al., 2020, Ealia & Saravanakumar, 2017).

Exemples importants de nanoparticules inorganiques utilisées en biotechnologie incluent les nanoparticules de silice (SiO_2), d'argent (Ag) et d'oxyde de zinc (ZnO). Elles sont largement étudiées en raison de leurs propriétés antimicrobiennes et de leurs applications dans les systèmes de délivrance des composés bioactifs (Prabhu & Poulouse, 2012, Sirelkhatim et al., 2015, Izzi et al., 2023).

II.3.3. Propriétés physico-chimiques particulières (surface, réactivité) :

Les nanoparticules présentent une surface spécifique très élevée en raison de leur taille nanométrique, ce qui augmente considérablement le rapport surface/volume. Cette caractéristique améliore les interactions avec les molécules biologiques et favorise l'adsorption des composés bioactifs tels que les huiles essentielles et les extraits végétaux (Khan et al., 2021).

La grande surface des nanoparticules leur confère une forte capacité d'adsorption des molécules actives. Cette propriété est particulièrement importante dans les systèmes d'encapsulation, où les phytoconstitués bioactifs peuvent être fixés à la surface ou incorporés dans la matrice nanostructure pour assurer une meilleure stabilité et efficacité (Singh & Kumar, 2023).

La réactivité élevée des nanoparticules est due à la présence d'un grand nombre d'atomes situés à la surface avec des liaisons non saturées. Cette énergie de surface élevée leur confère une grande réactivité chimique et biologique, ce qui améliore leur interaction avec les systèmes cellulaires et les composés bioactifs (Jain et al., 2022).

Grâce à leurs propriétés physico-chimiques particulières, les nanoparticules permettent d'améliorer la stabilité, la biodisponibilité et l'activité biologique des composés encapsulés. Elles renforcent notamment les activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits végétaux et des huiles essentielles (López et al., 2024).

II.3.4. Nanoencapsulation des huiles essentielles

Objectifs de la nanoencapsulation:

Les huiles essentielles présentent un fort potentiel antimicrobien et antioxydant, mais leur utilisation est limitée par leur volatilité, leur instabilité physico chimique et leur faible solubilité aqueuse. La nanoencapsulation constitue une approche innovante permettant de surmonter ces contraintes (McClements, 2012).

Les principaux objectifs sont:

- **Amélioration de la stabilité** : la nanoencapsulation protège les composés volatils contre l'oxydation, la lumière, la chaleur et l'humidité.
- **Réduction de la volatilité** : l'enfermement des molécules aromatiques dans une matrice nanométrique limite leur évaporation rapide.
- **Libération contrôlée** : les nanovecteurs permettent une diffusion progressive et ciblée des principes actifs.
- **Augmentation de l'efficacité antimicrobienne** : la taille nanométrique favorise l'interaction avec les membranes microbiennes, améliorant la biodisponibilité et l'activité biologique.

Ces avantages rendent la nanoencapsulation particulièrement attractive pour les applications en biotechnologie végétale, agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

II.3.5. Techniques de nanoencapsulation des huiles essentielles

II.3.5.1. Nanoprécipitation :

La nanoprécipitation repose sur la diffusion rapide d'un solvant organique contenant le polymère et l'huile essentielle dans une phase aqueuse miscible, entraînant la formation spontanée de nanoparticules (Fessi et al., 1989).

- Polymères couramment utilisés : PLA, PLGA, chitosane
- Avantages : méthode simple, faible consommation énergétique, taille homogène
- Inconvénients : rendement d'encapsulation variable selon la polarité de l'HE

Cette technique est largement utilisée pour encapsuler des HE de thym, d'origan et de cannelle.

II.3.5.2. Émulsion-polymérisation

Cette méthode consiste à former une émulsion huile dans eau, suivie d'une polymérisation in situ autour des gouttelettes d'huile essentielle (McClements, 2012).

- Polymères : polyalkylcyanoacrylates, polyméthacrylates

- Avantages : forte protection des HE, bonne stabilité colloïdale
- Limites : présence possible de résidus de monomères, conditions de synthèse plus complexes

Elle est surtout utilisée dans des applications pharmaceutiques et antimicrobiennes ciblées.

II.3.5.3. Encapsulation lipidique :

a) Liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques. Ils peuvent encapsuler des composés lipophiles comme les HE dans la membrane lipidique (Müller et al., 2002).

- Avantages : biocompatibilité, faible toxicité
- Inconvénients : stabilité limitée, coût élevé

b) SLN (Solid Lipid Nanoparticles)

c) Les nanoparticules lipidiques solides sont formées à partir de lipides solides à température ambiante (Müller et al., 2006).

Avantages : bonne stabilité, protection efficace des HE

Limites : capacité de chargement parfois faible

d) NLC (Nanostructured Lipid Carriers)

e) Les NLC combinent lipides solides et liquides, améliorant la capacité d'encapsulation et la libération contrôlée (Liao et al., 2021).

Avantages : rendement élevé, meilleure stabilité que les SLN

II.3.5.4. Nanoémulsions ultrasoniques

Les nanoémulsions sont obtenues par sonication haute énergie, produisant des gouttelettes d'huile de taille inférieure à 200 nm (Salvia-Trujillo et al., 2015).

- Avantages : simplicité, excellente dispersion aqueuse
- Inconvénients : stabilité dépendante des tensioactifs

Les nanoémulsions d'HE de thym ont montré une activité antimicrobienne supérieure à celle des huiles libres.

II.3.5.5. Facteurs influençant l'efficacité d'encapsulation

Selon Liao et al (2021) l'efficacité de la nanoencapsulation dépend de plusieurs paramètres:

- Nature chimique de l'huile essentielle (polarité, composition).
- Type de matrice (polymérique ou lipidique).
- Rapport huile/matrice.
- Méthode de préparation (énergie, température, temps).
- Taille des nanoparticules et charge de surface (zêta potentiel).

Une optimisation fine de ces paramètres est essentielle pour maximiser la stabilité et l'activité biologique des HE encapsulées.

II.3.5.6. Applications thérapeutiques et antimicrobiennes:

Les huiles essentielles et les phytocomposés bioactifs présentent des propriétés antimicrobiennes importantes contre un large spectre de micro-organismes pathogènes. Toutefois, leur utilisation directe est limitée en raison de leur faible stabilité, leur volatilité et leur sensibilité à l'oxydation. Dans ce contexte, la nanoencapsulation apparaît comme une stratégie efficace pour améliorer leur efficacité biologique et leur stabilité (Reverter et al., 2017, Donsì & Ferrari, 2016).

II.3.5.6.1. En médecine:

En médecine, les systèmes nanoencapsulés sont utilisés pour des applications topiques, antifongiques et désinfectantes. Ils permettent une meilleure diffusion des agents actifs dans les tissus et réduisent leur toxicité. Les huiles essentielles nanoencapsulées sont également étudiées pour le traitement des infections cutanées et comme alternatives naturelles aux agents antimicrobiens synthétiques (Rudramurthy et al., 2016, Zielińska et al., 2020).

II.3.5.6.2. En agroalimentaire:

Dans l'industrie agroalimentaire, les nanoparticules contenant des huiles essentielles sont utilisées pour la conservation des aliments et le développement d'emballages actifs. Ces systèmes permettent de limiter la croissance microbienne et d'augmenter la durée de conservation des produits alimentaires tout en réduisant l'utilisation de conservateurs chimiques (Liao et al., 2021, Donsi & Ferrari, 2016).

II.3.5.6.3. En biotechnologie végétale:

En biotechnologie végétale, les nanomatériaux chargés en composés bioactifs sont utilisés pour la protection des plantes contre les agents pathogènes. Ils contribuent à améliorer la résistance des cultures agricoles et à réduire l'utilisation de pesticides chimiques, favorisant ainsi une agriculture plus durable (Pavoni et al., 2020, Albuquerque et al., 2022).

PARTIE III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Matériels et Méthodes

Dans ce chapitre, nous présentons la partie pratique, qui décrit les différentes techniques expérimentales utilisées dans le cadre de ce projet, mené au laboratoire de l'Université Dr. Moulay Tahar de Saïda.

III.1.1. Matériels biologiques et produits chimiques utilisés

III.1.2. Matériels:

III.1.2.1. Verrerie et accessoires:

Les manipulations expérimentales ont été réalisées à l'aide du matériel courant de laboratoire, comprenant des béchers, erlenmeyers, éprouvettes graduées, tubes à essai, tubes Eppendorf (1,5–2 mL), pipettes Pasteur, pipettes automatiques, capsules de pesée, ainsi que du matériel de culture microbiologique (boîtes de Pétri, écouvillons stériles, anse de platine).

III.1.2.2. Équipements:

Les principales analyses et expériences ont été effectuées à l'aide des équipements suivants :

- balance analytique et de précision,
- Hydrodistillateur de type Clevenger,
- agitateur magnétique avec plaque chauffante,
- centrifugeuse,
- spectrophotomètre UV-Visible,
- pH-mètre,
- étuve, autoclave et hotte microbiologique.

III.1.2.3. Produits chimiques:

Les réactifs utilisés incluaient la silice mésoporeuse (SiO_2), le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), l'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH), le chlorure de sodium (NaCl), le Tween 80, ainsi que divers solvants et solutions telles que l'eau

distillée et le tampon PBS. La gentamicine a été utilisée comme contrôle positif dans les tests microbiologiques.

III.1.3. Matériels biologique:

III.1.3.1. Matériel végétal:

Le matériel végétal utilisé est constitué des parties aériennes (feuilles et tiges) de *Thymus vulgaris*, récoltées dans la région de Saïda (Algérie). Les échantillons ont été séchés à l'air libre à l'abri de la lumière, puis conservés dans des conditions appropriées jusqu'à leur utilisation.



Figure 14: Plante du genre *Thymus*

III.1.4. Les souches bactériennes:

Les quatre souches bactériennes ont été utilisées, avec leurs gram et référence.

Tableau 3: les souches bactériennes utilisent

Nom de souche	Gram	Référence de la souche
<i>Escherichia coli</i>	Gram –	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	ATCC 25923
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram +	ATCC 6633
<i>Bacillus cereus</i>	Gram +	ATCC 11778

1. *Escherichia coli*:

Bactérie Gram négatif, en forme de bacille, appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Elle est naturellement présente dans la flore intestinale de l'homme et des animaux. Certaines souches sont pathogènes et peuvent provoquer des infections digestives et urinaires. Elle est largement utilisée comme modèle en microbiologie. Sa membrane externe lui confère une certaine résistance aux agents antibactériens.

Figure 15: **culture** de 24h d'*Escherichia coli*

2. *Staphylococcus aureus*:

Bactérie Gram positif, de forme cocci, souvent regroupée en amas (grappes). Elle est présente sur la peau et les muqueuses humaines. C'est un pathogène opportuniste responsable d'infections cutanées, respiratoires et

parfois graves. Elle produit plusieurs toxines et facteurs de virulence. Elle est connue pour sa capacité à développer des résistances aux antibiotiques.

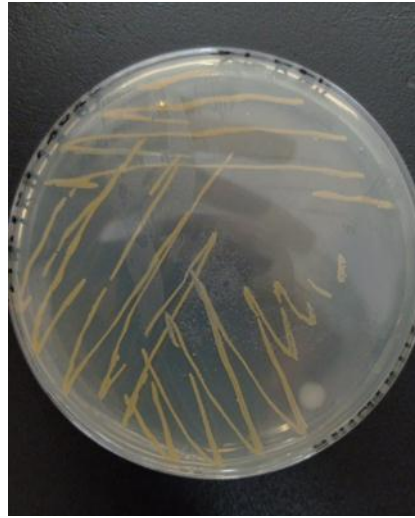


Figure 16 : culture de 24h de *Staphylococcus aureus*

3. Bacillus subtilis:

Bactérie Gram positif, en forme de bacille, capable de former des spores résistantes. Elle est largement répandue dans le sol et l'environnement. Généralement non pathogène, elle est utilisée comme modèle en recherche scientifique. Elle joue un rôle important dans la production d'enzymes et de composés biologiques. Sa capacité de sporulation lui permet de survivre dans des conditions défavorables.



Figure 17: culture de 24h de *Bacillus subtilis*

4. Bacillus cereus:

Bactérie Gram positif, en forme de bacille, également sporulante. Elle est présente dans le sol, les aliments et l'environnement. C'est une bactérie pathogène responsable d'intoxications alimentaires. Elle produit des toxines provoquant des troubles digestifs. Sa résistance environnementale est liée à la formation de spores.



Figure 18: culture de 24h de *Bacillus cereus*

III.1.5. Extraction de l'huile essentielle:

L'extraction de l'huile essentielle de thym a été réalisée par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger, largement utilisé pour l'isolement des composés volatils à partir de matrices végétales. Cent grammes de feuilles de thym ont été introduits dans un ballon en verre d'un litre contenant 500 mL d'eau distillée, en veillant à maintenir un volume suffisant pour éviter tout débordement lors de l'ébullition. Le système a été chauffé jusqu'à ébullition pendant environ 2 h 30, permettant l'entraînement des composés volatils par la vapeur d'eau.

La vapeur formée, chargée en composés aromatiques, est condensée au niveau du réfrigérant puis recueillie dans le tube gradué du dispositif de Clevenger. En raison de l'immiscibilité entre l'eau et les composés terpéniques, ainsi que de leur différence de densité, le distillat se sépare naturellement en deux phases distinctes : une phase aqueuse correspondant à l'hydrolat et une phase organique contenant l'huile essentielle.

Après séparation, l'huile essentielle est récupérée avec précaution afin de limiter toute perte de composés volatils. Elle est ensuite conservée à 4 °C dans des tubes Eppendorf opaques et hermétiquement fermés, à l'abri de la lumière et de la chaleur, afin de préserver sa stabilité chimique et d'éviter toute dégradation oxydative (Clevenger, 1928, Stahl-Biskup & Sáez, 2002, Tisserand & Young, 2014, Bounatirou et al., 2007).

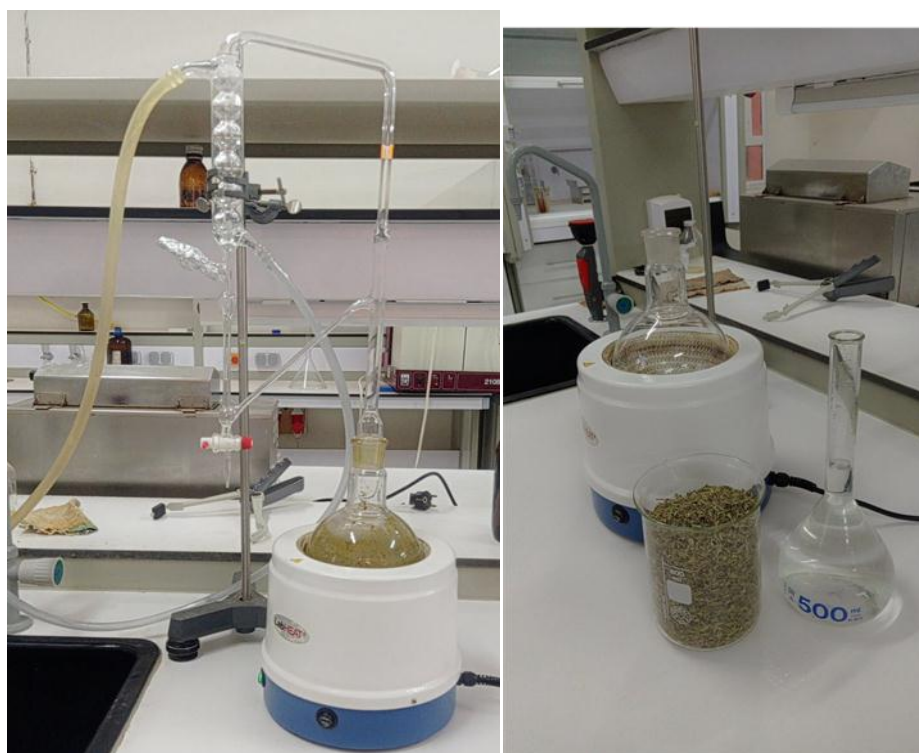


Figure 19: Dispositif d'hydrodistillation de Clevenger.

Détermination du rendement en l'HE:

Après l'extraction et la récupération de l'huile essentielle du thym, le rendement est évalué à l'aide de la formule suivante : le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids du matériel végétal utilisé (Morales, 2002).

$$R = m/m_0 \times 100$$

R : rendement en huile essentielle (%).

m : masse en gramme de l'huile essentielle.

m_o: masse en gramme de la matière végétale sèche.

Le rendement en huile essentielle de thym obtenu est de 2,7 %, calculé à partir d'un volume de 3 ml extrait à partir de 100 g de matière végétale.

III.1.6. Synthèse des nanoparticules:

Les nanoparticules de silice mésoporeuse de type MCM-41 ont été synthétisées en utilisant le surnageant issu du verre usagé comme source de silice, obtenu par fusion alcaline.

Dans un premier temps, 0,867 g de bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) ont été dissous dans 15 mL d'eau déminéralisée, suivis de l'ajout de 0,75 g d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH). Ensuite, 40 mL du surnageant ont été incorporés au mélange sous agitation à température ambiante pendant 1 heure afin d'assurer l'homogénéisation.

Le mélange réactionnel a été transféré dans un autoclave en téflon et soumis à un traitement hydrothermal à 100 °C pendant 48 heures. Après refroidissement, le solide obtenu a été récupéré par filtration, lavé à l'eau déminéralisée puis séché.

Enfin, le matériau a été calciné à 550 °C pendant 12 heures, avec une vitesse de chauffage de 3 °C/min, afin d'éliminer l'agent structurant organique (CTAB) et d'obtenir des nanoparticules de silice mésoporeuse de type MCM-41 caractérisées par une structure poreuse ordonnée (Beck et al., 1992, Kresge et al., 1992).

III.1.7. L'imprégnation adaptée à l'huile essentielle de thym:

Le matériau mésoporeux MCM-41 a été utilisé comme support pour l'encapsulation de l'huile essentielle de thym, principalement composée de thymol et de carvacrol. Ces composés phénoliques, hydrophobes et volatils, présentent une forte affinité pour la surface siliceuse du matériau.

Avant l'imprégnation, le MCM-41 a été activé par chauffage à une température comprise entre 110 et 120 °C pendant 4 à 5 heures afin d'éliminer l'humidité résiduelle

présente dans les pores. Après refroidissement dans un dessiccateur, le matériau a été utilisé pour l'étape de chargement.

L'imprégnation a été réalisée par adsorption directe de l'huile essentielle pure sur le support mésoporeux. L'huile essentielle de thym a été ajoutée progressivement au MCM-41 sous agitation douce à température ambiante. Le mélange a ensuite été maintenu sous agitation pendant 24 heures afin de favoriser la diffusion des molécules actives et leur adsorption à l'intérieur des pores du matériau.

À l'issue du chargement, le matériau a été placé dans un dessiccateur pendant 3 heures afin de permettre la stabilisation du système et de limiter la présence d'huile libre à la surface du support. Le matériau obtenu a ensuite été conservé dans des flacons ambrés hermétiquement fermés, à une température comprise entre 4 et 8 °C, à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à son utilisation (Zhao et al., 1998 ; Kresge et al., 1992).

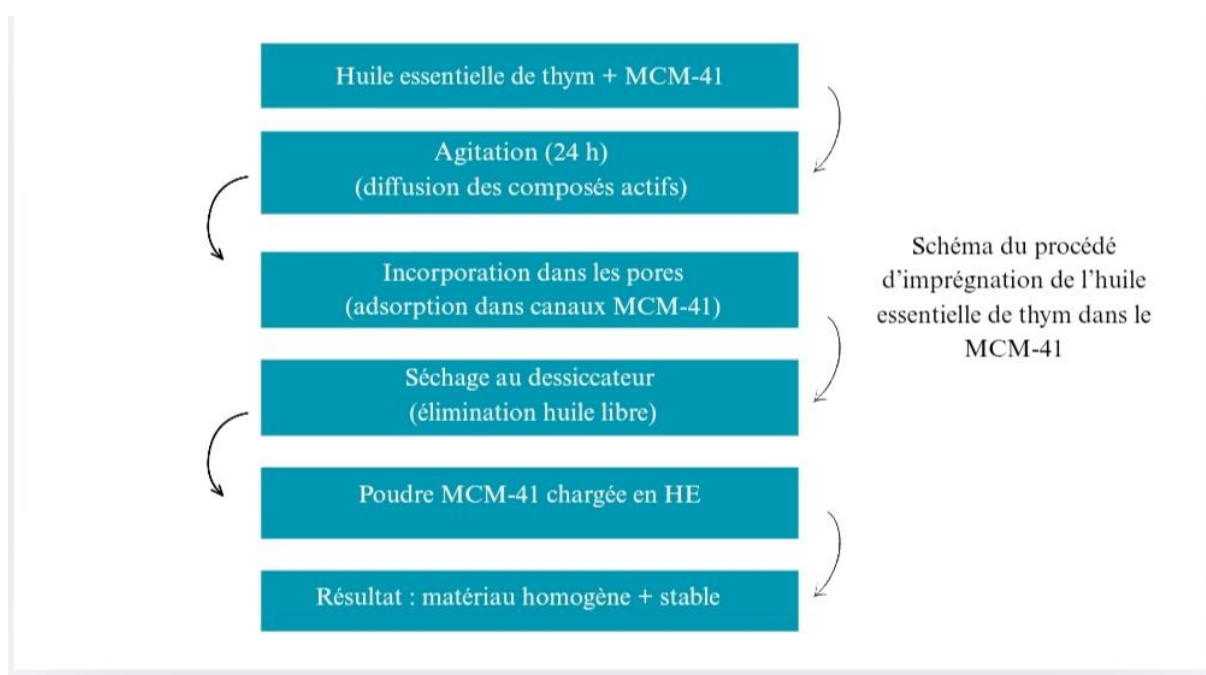


Figure 20: Schéma illustrant l'adsorption de l'huile essentielle de thym dans les pores du matériau MCM₄₁.

III.1.8. Test anti-inflammatoire:

Le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (ASB) a été utilisé afin d'évaluer l'activité anti-inflammatoire des échantillons étudiés. Ces échantillons comprennent deux supports mésoporeux de type MCM-41 (MCM-41 1.6 et MCM-41 1.8), chacun évalué sous forme chargée en huile essentielle de thym ainsi que sous forme non chargée servant de contrôle, en plus de l'huile essentielle de thym sous forme libre. L'ibuprofène a été utilisé comme témoin positif, tandis que l'eau distillée a servi de témoin négatif. Une solution d'ASB à 5 % (m/v) a été préparée dans un tampon phosphate salin (PBS, pH 6,4). Le mélange réactionnel final (2,85 mL) était composé de 450 µL de solution d'ASB, 1 400 µL de PBS et 1 000 µL de l'échantillon ou du témoin. Les mélanges ont été incubés à 37 °C pendant 15 minutes, puis chauffés à 70 °C pendant 5 minutes afin d'induire la dénaturation des protéines. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Grant et al., 1970, Sakat et al., 2010).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation a été calculé selon la formule :

$$\% \text{ Inhibition} = ((A \text{ contrôle} - A \text{ échantillon}) / A \text{ contrôle}) \times 100.$$

III.1.9. Test antimicrobien:

Les souches bactériennes utilisées étaient *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* et *Escherichia coli*. Les bactéries ont été ensemencées sur milieu Mueller-Hinton Agar (MHA) puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h afin d'obtenir des colonies fraîches.

Préparation de l'inoculum bactérien

Après incubation, plusieurs colonies fraîches de chaque souche ont été prélevées puis transférées dans des tubes contenant 5 mL de NaCl stérile (0,9 %) afin d'obtenir une suspension bactérienne homogène.

Préparation des échantillons

Les échantillons testés comprenaient l'huile essentielle de thym, les matériaux MCM-41 1.8 et 1.6 chargés et non chargés, l'eau distillée comme contrôle négatif ainsi que la gentamicine comme contrôle positif. L'huile essentielle de thym a été diluée dans de l'eau distillée stérile contenant du Tween 80 afin d'assurer une bonne homogénéisation.

Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement des boîtes contenant le milieu MHA a été réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne afin d'assurer une répartition homogène des bactéries sur toute la surface de la gélose. Après ensemencement, des disques stériles imprégnés des différents échantillons ont été déposés délicatement sur la surface du milieu.

Incubation et lecture des résultats

Les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 18 à 24 h. Après incubation, l'activité antimicrobienne a été évaluée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des disques exprimés en millimètres (CLSI, 2020, Balouiri et al., 2016).

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. Résultats et Discussion

IV.1.1. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction de l'huile essentielle de thym (*Thymus vulgaris*) par hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger a permis d'obtenir 3 ml d'huile essentielle à partir de 100 g de matière végétale, soit un rendement de 3 %.

L'huile obtenue se présente sous forme d'un liquide de couleur jaune pâle, caractérisé par une odeur aromatique intense typique du thym.



Figure 21: Récupération de l'huile essentielle de thym à l'aide de l'appareil de Clevenger

Ce rendement est en accord avec les données de la littérature, qui rapportent des valeurs comprises entre 1 % et 3 % selon l'origine géographique, les conditions climatiques et les paramètres d'extraction. Ainsi, le rendement obtenu peut être considéré comme satisfaisant, reflétant la richesse du matériel végétal en composés volatils, notamment le thymol et le carvacrol (MOHAMADI Ines 2024).

L'étude réalisée par Hicham Boughendjioua et Samah Djeddi ,2018 sur *Thymus numidicus* en Algérie a rapporté un rendement de 1,1 % obtenu par hydrodistillation. De même, Elizabete Aparecida Ruzza Jakiemiu et collaborateurs ont obtenu un rendement maximal de 1,86 % après 3 heures d'hydrodistillation de *Thymus vulgaris*. Certaines études ont également

rapporté des rendements proches de 2,3 à 2,6 mL/100 g de matière végétale pour le thym soumis à une hydrodistillation de 120 min.

Ainsi, le rendement obtenu dans notre étude (3 %) peut être attribué à la qualité de la matière végétale utilisée, aux conditions expérimentales adoptées ainsi qu'à la richesse du thym en composés aromatiques volatils tels que le thymol et le carvacrol (Stahl-Biskup & Sáez, 2002).

IV.1.2. Synthèse des nanoparticules:

La synthèse hydrothermale réalisée à partir du surnageant issu du verre usagé a permis l'obtention d'un matériau siliceux de type MCM-41 sous forme d'une fine poudre blanche après calcination. Le traitement thermique effectué à 550 °C a conduit à l'élimination complète du tensioactif CTAB, favorisant ainsi la formation d'une structure mésoporeuse ordonnée.

Le matériau obtenu présente une texture homogène ainsi qu'une morphologie caractéristique des silices mésoporeuse. La formation de cette structure est attribuée à l'organisation micellaire du CTAB, qui agit comme agent structurant lors de la synthèse. Après calcination, les pores deviennent accessibles, permettant l'obtention d'une silice présentant une surface spécifique élevée et une porosité importante, propriétés particulièrement recherchées pour les applications de chargement et de libération d'huiles essentielles.

La synthèse réalisée à partir du verre recyclé confirme également la possibilité de valoriser ce déchet comme source alternative de silice pour la préparation de nanoparticules mésoporeuses de type MCM-41 (Zhao et al., 1998, Beck et al., 1992).

IV.1.3. Encapsulation de l'huile essentielle

L'incorporation de l'huile essentielle dans les nanoparticules MCM-41 a été réalisée avec succès par adsorption.

La diffusion des molécules bioactives dans les pores (2–3 nm) a permis :

- une fixation efficace de l'huile essentielle,
- une réduction de sa volatilité,
- une protection contre les facteurs de dégradation (oxydation, lumière).

Ce processus constitue une étape essentielle pour améliorer la stabilité et la biodisponibilité des composés actifs.

IV.1.4. Activité anti-inflammatoire

Les résultats du test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (ASB) présenter dans le tableau 5 et figure 21 montrent que :

- l'huile essentielle de thym présente une activité anti-inflammatoire élevée (~295 %),
- les nanoparticules MCM-41 chargées conservent une activité importante ($\approx 79\%$),
- les matériaux non chargés présentent une activité modérée.

Ces résultats indiquent que la nanoencapsulation permet de préserver l'activité biologique de l'huile essentielle.

Cependant, certaines valeurs élevées (notamment pour l'huile essentielle et l'ibuprofène) pourraient être influencées par des interférences spectrophotométrique liées à la coloration des échantillons, ce qui nécessite une interprétation prudente.

Tableau 4 : Activité anti-inflammatoire des échantillons étudiés évaluée par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (ASB)

Échantillon	Inhibition %
1.6	79%
1.8	78.1%
1.6H	78.9%
1.8H	79.2%
Hydrolat	99.125%
Eau distille	79.75%
Huile essentiel	295%
Ibuprofène	275.125%

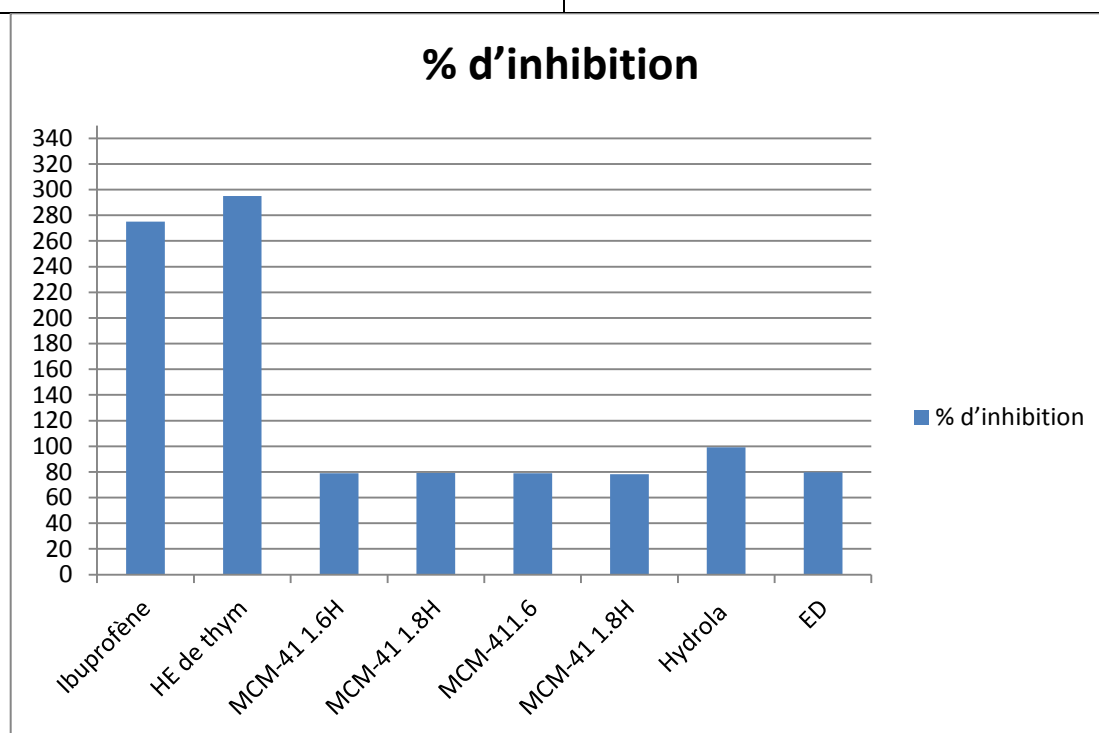


Figure 22: Représentation graphique Comparaison de l'activité anti-inflammatoire des différents échantillons évalués par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (ASB).

Les résultats présentés dans l'histogramme montrent que tous les échantillons étudiés possèdent une activité anti-inflammatoire importante, avec des pourcentages d'inhibition relativement proches les uns des autres. L'huile essentielle de thym présente une activité élevée, comparable à celle de l'ibuprofène utilisé comme témoin positif, ce qui peut être attribué à la présence de composés phénoliques bioactifs tels que le thymol et le carvacrol. Les matériaux MCM-41 chargés en huile essentielle conservent également une activité anti-inflammatoire élevée, indiquant que l'encapsulation permet de préserver l'efficacité biologique de l'huile essentielle. Le matériau MCM-41(1.8) chargé présente le pourcentage d'inhibition le plus élevé parmi les supports mésoporeux, suggérant une meilleure capacité de chargement et de libération des composés actifs. En revanche, les matériaux MCM-41 non chargés montrent une activité plus modérée, probablement liée à des interactions physiques entre la surface siliceuse et les protéines. Les résultats obtenus doivent toutefois être interprétés avec prudence, car l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire a été réalisée par une méthode spectrophotométrique à 660 nm. De plus, les valeurs élevées observées pour l'huile essentielle de thym et l'ibuprofène peuvent être influencées par la couleur des échantillons utilisés. En effet, l'huile essentielle présentait une coloration jaunâtre tandis que la solution d'ibuprofène avait une légère coloration rosée, ce qui peut provoquer des interférences lors du passage de la lumière et influencer les valeurs d'absorbance enregistrées. Ainsi, une partie des résultats obtenus peut être liée à ces interférences expérimentales et non uniquement à l'activité anti-inflammatoire réelle des échantillons. Dans l'ensemble, ces résultats confirment l'intérêt de l'immobilisation de l'huile essentielle de thym dans une matrice mésoporeuse de type MCM-41 afin d'améliorer sa stabilité tout en maintenant son activité anti-inflammatoire.

IV.1.5. Activité antibactérienne

IV.1.5.1. Effet sur *Escherichia coli*

Les résultats de l'activité antibactérienne des différents échantillons testés contre *Escherichia coli* sont présentés dans le tableau 5 ainsi que dans l'histogramme

correspondant (figure 24). Les images des boîtes de Pétri (figure 23) illustrent également les halos d'inhibition observés autour des différents disques testés.

Tableau 5: Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre *Escherichia coli*.

N° de puits	Échantillon	Zone d'inhibition (mm)
1	Huile essentielle de thym	16,5
2	Hydrolat	00
3	MCM-41 chargé (1.6)	23
4	MCM-41 chargé (1.8)	26
5	Eau distillée (ED)	00
6	Gentamicine	25
7	MCM-41 non chargé (1.6)	00
8	MCM-41 non chargé (1.8)	00

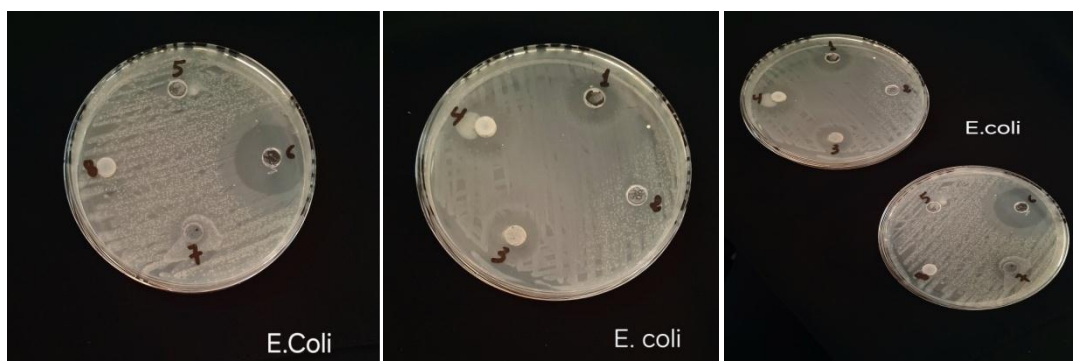


Figure 23: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis d'*Escherichia coli* évalué par la méthode de diffusion sur gélose.

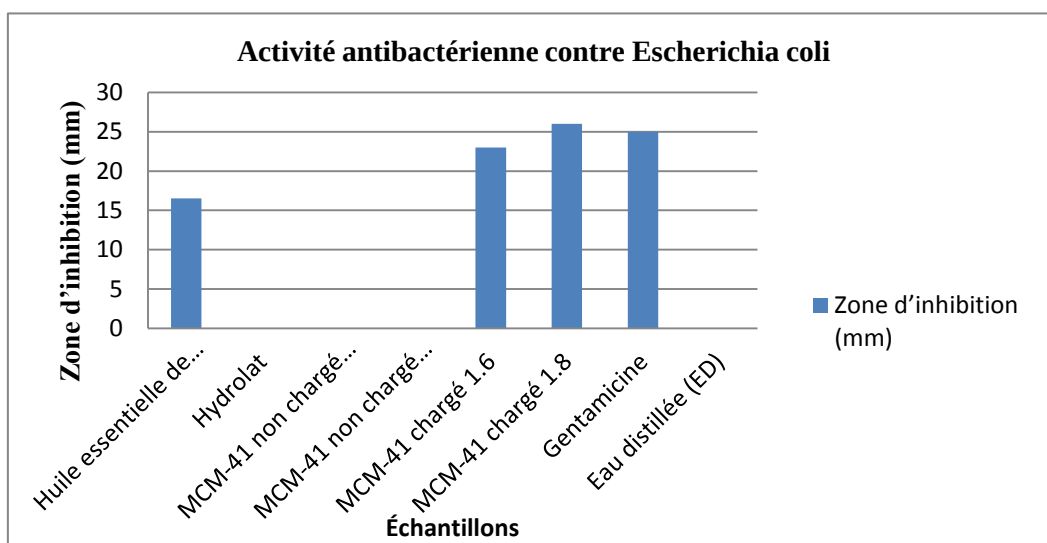


Figure 24: Représentation graphique de l'activité antibactérienne.

Les résultats montrent que l'huile essentielle de thym possède une activité antibactérienne contre *E. coli* avec une zone d'inhibition de 16,5 mm, comme illustré dans le tableau 5 et les figures 23 et 24. Cette activité est liée à la présence de composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol, connus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

L'hydrolat, les matériaux MCM-41 non chargés ainsi que l'eau distillée n'ont montré aucune activité antibactérienne, ce qui indique que l'effet inhibiteur observé est lié à la présence des composés actifs de l'huile essentielle et non au support mésoporeux lui-même.

En revanche, les nanoparticules MCM-41 chargées ont présenté une activité plus importante avec des zones d'inhibition de 23 mm et 26 mm, supérieures à celle de l'huile essentielle libre et comparable à celle de la gentamicine (25 mm). Cette amélioration peut être attribuée à l'encapsulation de l'huile essentielle dans les pores du MCM-41, qui protège les composés bioactifs contre l'oxydation et l'évaporation tout en assurant une libération progressive et prolongée.

Les images des boîtes de Pétri (figure 23) et le diagramme en barres (figure 24) confirment l'amélioration de l'activité antibactérienne après encapsulation. Cette

augmentation peut être expliquée par la protection des composés actifs contre l'oxydation et l'évaporation ainsi que par leur libération progressive à partir des pores du MCM-41.

Malgré la résistance naturelle d'*E. Coli* en tant que bactérie Gram négatif, les nanoparticules chargées ont montré une forte efficacité inhibitrice. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Burt qui ont rapporté que les huiles essentielles riches en thymol et carvacrol présentent une activité antimicrobienne importante (Burt, 2004).

5.2. Effet sur *Staphylococcus aureus*

L'activité antibactérienne des différents échantillons vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* a été évaluée et les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 6. Une représentation graphique de ces données est présentée dans la figure 26, tandis que la figure 25 montre les images des boîtes de Pétri illustrant les zones d'inhibition observées autour des disques testés.

Tableau 6: Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre *Staphylococcus aureus*.

N° de puits	Échantillon	Zone d'inhibition (mm)
1	Huile essentielle de thym	47
2	Hydrolat	00
3	MCM-41 chargé (1.6)	24
4	MCM-41 chargé (1.8)	21
5	Eau distillée (ED)	00
6	Gentamicine	25
7	MCM-41 non chargé 1.6	00
8	MCM-41 non chargé 1.8	00



Figure 25: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* évalué par la méthode de diffusion sur gélose.

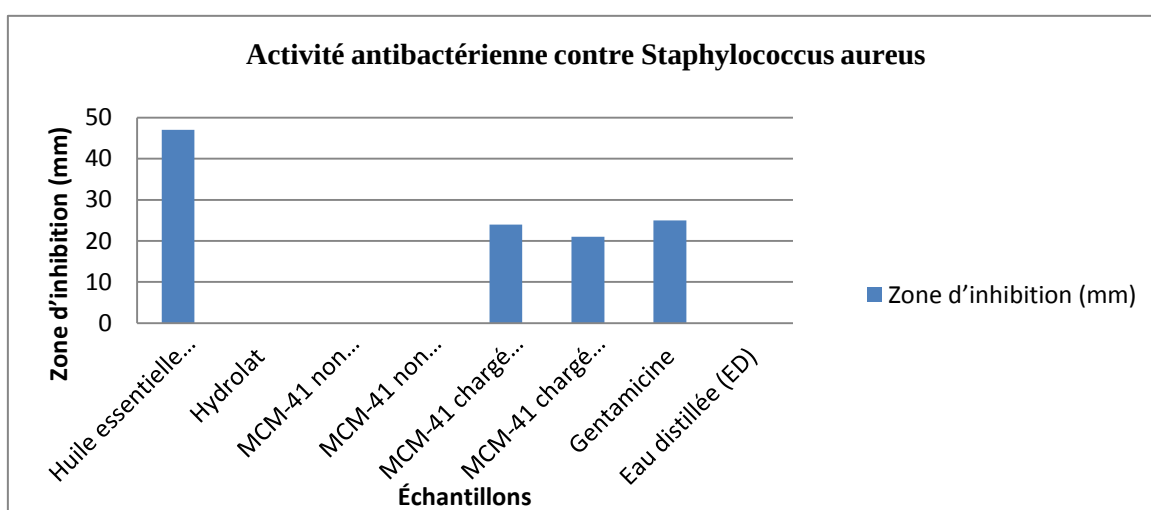


Figure 26: Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents échantillons contre *Staphylococcus aureus*

Les résultats obtenus révèlent une activité antibactérienne marquée de l'huile essentielle de thym vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, avec un diamètre de zone d'inhibition atteignant 47 mm, comme indiqué dans le tableau 6 et illustré par les figures 25 et 26. Cette efficacité peut être attribuée à la richesse de l'huile essentielle en composés phénoliques, notamment le thymol et le carvacrol, reconnus pour leur puissant pouvoir antimicrobien.

En revanche, aucun effet inhibiteur n'a été observé pour l'hydrolat, l'eau distillée ainsi que les matériaux MCM-41 non chargés. Les nanoparticules de MCM-41 chargées en huile essentielle ont cependant montré une activité antibactérienne significative, avec des diamètres d'inhibition de 24 mm et 21 mm. Ces valeurs restent comparables à celle

obtenue avec l'antibiotique de référence, la gentamicine (25 mm), comme le montrent le tableau 6 et la figure 26.

Les observations réalisées sur les boîtes de Pétri figure 25 ainsi que la représentation graphique des résultats figure 26 mettent en évidence l'efficacité remarquable de l'huile essentielle de thym contre *Staphylococcus aureus* et démontrent l'intérêt de son incorporation dans la matrice mésoporeuse MCM-41. La légère diminution de l'activité observée après encapsulation pourrait être liée à une libération graduelle des composés actifs à partir des pores du support. Néanmoins, cette stratégie permet de préserver les molécules bioactives en améliorant leur stabilité et en limitant leur dégradation par oxydation ou évaporation.

Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Burt (2004), qui a souligné l'importante activité antibactérienne des huiles essentielles riches en thymol et en carvacrol à l'encontre des bactéries à Gram positif.

5.3. Effet sur *Bacillus subtilis*

L'analyse des résultats sur l'activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* révèle des différences notables entre les échantillons en termes de zones d'inhibition, comme indiqué dans le tableau 7 et les figures 27 et 28.

Tableau 7: Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre *Bacillus subtilis*.

N° de puits	Échantillon	Zone d'inhibition (mm)
1	Huile essentielle de thym	25,5
2	Hydrolat	00
3	MCM-41 chargé (1.6)	36
4	MCM-41 chargé (1.8)	22,5
5	Eau distillée (ED)	00
6	Gentamicine	25
7	MCM-41 non chargé (1.6)	00
8	MCM-41 non chargé (1.8)	00

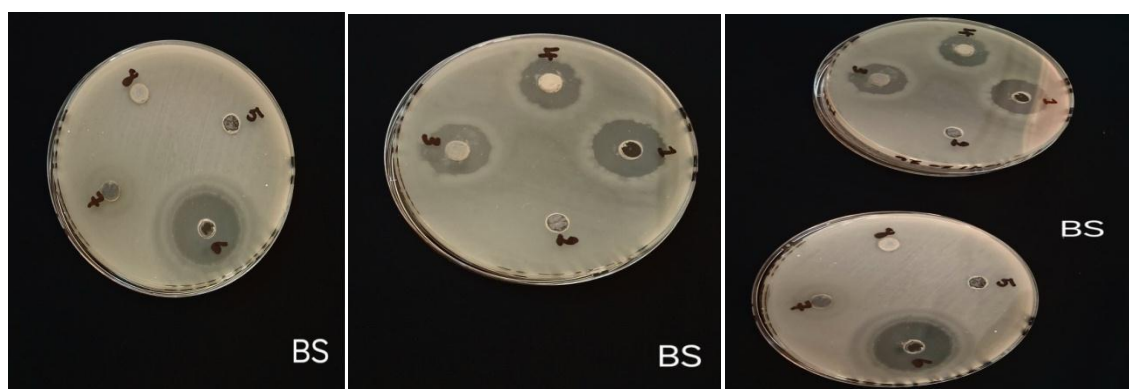


Figure 27: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis de *Bacillus subtilis* évalué par la méthode de diffusion sur gélose.

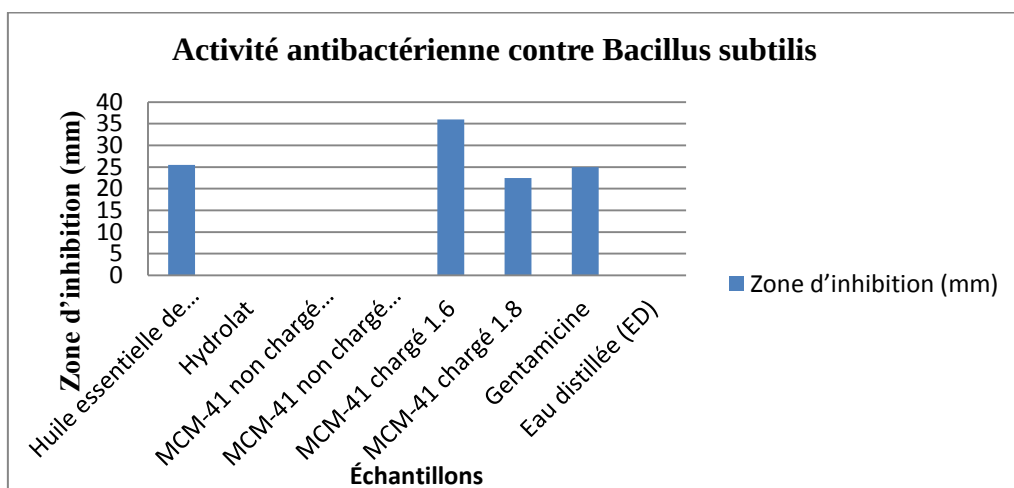


Figure 28: Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents échantillons contre *Bacillus subtilis*.

Les résultats montrent que l'huile essentielle de thym présente une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* avec un diamètre d'inhibition de 25,5 mm, due à la présence de composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol.

Les matériaux MCM-41 non chargés, l'hydrolat et l'eau distillée n'ont montré aucune activité. En revanche, les nanoparticules MCM-41 chargées ont présenté une activité importante, notamment le matériau 1.6 avec un diamètre de 36 mm, supérieur à celui de la gentamicine (25 mm).

Les résultats des boîtes de Pétri et du diagramme confirment l'amélioration de l'activité après encapsulation, expliquée par la protection des composés actifs et leur libération progressive. La sensibilité de *Bacillus subtilis* s'explique par sa nature Gram positive. Ces résultats concordent avec ceux de Burt (2004) concernant l'efficacité des huiles essentielles riches en thymol et carvacrol contre les bactéries Gram positives.

5.4. Effet sur *Bacillus cereus*

Tableau 8 : Diamètres des zones d'inhibition des différents échantillons testés contre *Bacillus cereus*.

N° de puits	Échantillon	Zone d'inhibition (mm)
1	Huile essentielle de thym	27
2	Hydrolat	00
3	MCM-41 chargé (1.6)	25,5
4	MCM-41 chargé (1.8)	23,5
5	Eau distillée (ED)	00
6	Gentamicine	00
7	MCM-41 non chargé (1.6)	25
8	MCM-41 non chargé (1.8)	00

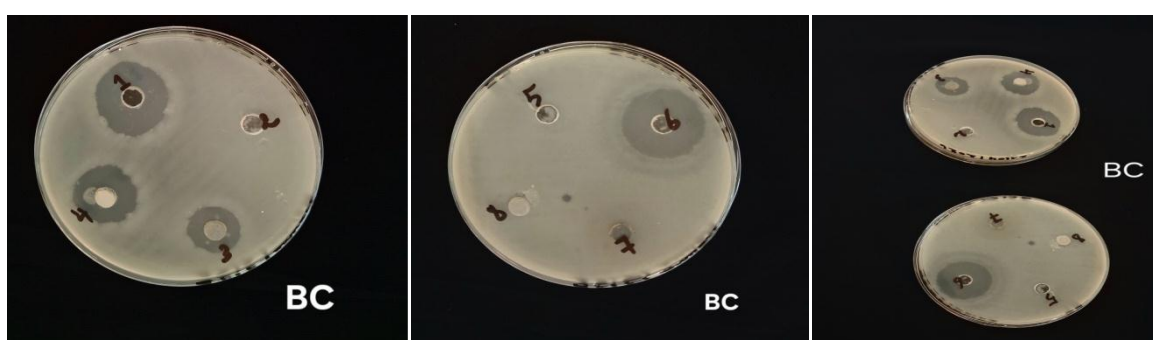


Figure 29: Effet antibactérien des différents échantillons vis-à-vis de *Bacillus cereus* évalué par la méthode de diffusion sur gélose.

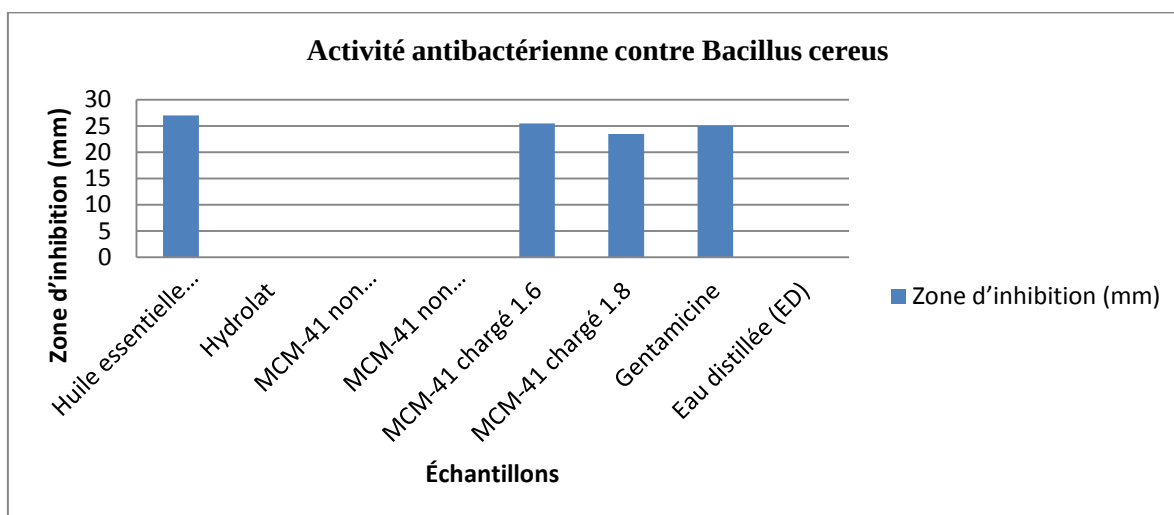


Figure 30: Représentation graphique de l'activité antibactérienne des différents échantillons contre *Bacillus cereus*.

Les résultats indiquent que l'huile essentielle de thym exerce une activité antibactérienne significative contre *Bacillus cereus*, avec une zone d'inhibition de 27 mm, comme présenté dans le tableau 8 et la figure 29. Cette activité est attribuée à la présence de composés phénoliques tels que le thymol et le carvacrol, reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes.

En revanche, l'hydrolat, les matériaux MCM-41 non chargés ainsi que l'eau distillée n'ont montré aucune activité antibactérienne. À l'opposé, les nanoparticules MCM-41 chargées ont révélé une activité notable, avec des zones d'inhibition de 25,5 mm et 23,5 mm, proches de celle de la gentamicine (25 mm), comme illustré dans le tableau 8 et la figure 30.

L'analyse des boîtes de Pétri et du diagramme en barres confirme l'efficacité de l'huile essentielle ainsi que l'intérêt de la nanoencapsulation. La légère diminution de l'activité après encapsulation peut s'expliquer par la libération progressive des composés actifs à partir des pores du matériau MCM-41.

La sensibilité élevée de *Bacillus cereus* s'explique par sa nature Gram positive, qui facilite la pénétration des composés actifs. Par ailleurs, la nanoencapsulation contribue à améliorer la stabilité des molécules bioactives et à protéger l'huile essentielle contre l'oxydation et l'évaporation.

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

V.1. Conclusion et perspectives

Les huiles essentielles représentent une source naturelle importante de composés bioactifs possédant diverses propriétés thérapeutiques, notamment des activités antimicrobiennes. Cependant, leur utilisation reste limitée en raison de leur volatilité élevée, de leur faible stabilité physicochimique et de leur sensibilité à l'oxydation et aux facteurs environnementaux. Dans ce contexte, la nanoencapsulation apparaît comme une approche innovante permettant d'améliorer la stabilité et l'efficacité biologique des huiles essentielles.

Le présent travail a porté sur l'encapsulation de l'huile essentielle de thym dans des nanoparticules de silice mésoporeuse MCM-41 ainsi que sur l'évaluation de son activité anti-inflammatoire et antibactérienne contre différentes souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus*.

Les résultats obtenus ont montré que l'huile essentielle de thym possède une activité anti-inflammatoire et antibactérienne importante grâce à la présence de composés phénoliques bioactifs tels que le thymol et le carvacrol. Les nanoparticules MCM-41 chargées ont également présenté une efficacité antibactérienne remarquable, parfois proche ou supérieure à celle de la gentamicine selon la souche bactérienne étudiée.

Les résultats obtenus mettent ainsi en évidence le potentiel prometteur des nanoparticules mésoporeuses MCM-41 comme système efficace de transport et de libération contrôlée des huiles essentielles naturelles. Cette approche pourrait constituer une alternative intéressante aux agents antimicrobiens conventionnels face à l'augmentation de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Malgré les résultats encourageants obtenus dans cette étude, des recherches complémentaires restent nécessaires afin d'approfondir la caractérisation physicochimique des nanoparticules, d'évaluer leur stabilité, leur biodisponibilité ainsi que leur éventuelle toxicité. Des études in vivo et

des applications dans les domaines pharmaceutique, biomédical, agroalimentaire et cosmétique pourraient également être envisagées afin de valoriser davantage ces systèmes nano encapsulation.

En somme, la nanoencapsulation des huiles essentielles à l'aide de matériaux mésoporeux représente une approche innovante et prometteuse, capable de surmonter les limitations des huiles essentielles libres et de renforcer leur potentiel d'application dans les domaines biomédical, agroalimentaire et environnemental.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIES

VI.1. Références bibliographiques

AFNOR. (1996a). NF T 75-001: Norme relative à l'emballage, au conditionnement et au stockage des huiles essentielles.

AFNOR. (1996b). NF T 75-002: Norme relative au marquage des récipients contenant des huiles essentielles.

Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2022). Nanoencapsulation techniques for essential oils and their applications. *Foods*, 11(3), 345.

Alloun, K. (2018). Document académique. École Nationale Supérieure Agronomique, El Harrach, Alger.

Arras, G., & Usai, M. (2001). Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1025–1029.

Bassolé, H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989–4006.

Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2009). *Handbook of essential oils: Science, technology and applications*. CRC Press.

Beck, J. S., et al. (1992). A new family of mesoporous molecular sieves. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834–10843.

Belmalha, S., El Idrissi, M., Amechrouq, A., & Echchgadda, G. (2015). Chemical characterization of Moroccan thyme species. *Global Journal of Pure and Applied Chemistry Research*, 3(2).

Besombes, C. (2008). Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle.

Bhalla, Y., Gupta, V. K., & Jaitak, V. (2013). Anticancer activity of essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3643–3653.

- Bilal, G. M. (2016). Thèse de doctorat, Université de Ouargla.
- Botelho, M. A., et al. (2007). Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* oil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(3), 349–356.
- Bouchikhi Tani, Z. (2011). Thèse de doctorat, Université de Tlemcen.
- Bouhekrit, M. (2018). Thèse de doctorat, Université de Sétif.
- Boughendjioua, H., & Djeddi, S. (2018). Quality Attributes of the Thyme (*Thymus numidicus* Poiret.) Essential Oil. *Journal of Plant Sciences*, 6(1), 12–15.
- Bounatirou, S., et al. (2007). Tunisian *Thymus capitatus* oils. *Food Chemistry*, 105(1), 146–155.
- Bousbia, N. (2011). Thèse de doctorat, Université d'Avignon.
- Bravo Cadena, M., et al. (2018). Nanoencapsulation using silica nanoparticles. *Frontiers in Chemistry*, 6, 173.
- Breitmaier, E. (2006). *Terpenes: Flavors, fragrances, pharmaca*. Wiley.
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie*. Tec & Doc.
- Burt, S. (2004). Essential oils antibacterial properties. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
- Castro, H. T., et al. (2010). Anethole reactions. *Molecules*, 15(7), 5012–5030.
- Charik, S., & Kadri, Y. (2019). Mémoire de master, Université de M'sila.
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Lipid oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science*, 5(4), 169–186.
- Christensson, J. B., et al. (2010). Linalool sensitization. *Contact Dermatitis*, 62(1), 32–41.
-

- Clevenger, J. F. (1928). Volatile oil apparatus. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 17(4), 346–349.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). Antimicrobial susceptibility testing.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products*. Wiley.
- Djedir, S. (2018). Mémoire universitaire.
- Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Nanoemulsions. *Journal of Biotechnology*, 233, 106–120.
- Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. (2017). Nanoparticles review. *IOP Conference Series*.
- Fessi, H., et al. (1989). Nanocapsule formation. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1–R4.
- Figueredo, G. (2007). Thèse de doctorat.
- Gagliardi, A., et al. (2021). Polymeric nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 601626.
- Gallucci, M. N., et al. (2009). Antimicrobial terpenes. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(6), 348–354.
- Gheorghita, D., et al. (2022). Essential oils antibacterial activity. *Molecules*, 27(12), 3854.
- Grant, N. H., et al. (1970). Protein stabilization. *Biochemical Pharmacology*, 19(3), 715–722.
- Halat, D. H., et al. (2022). Thyme biological properties. *Nutrients*, 14(10).
- Hlebová, M., et al. (2021). Antifungal essential oils. *Journal of Environmental Science and Health A*, 56(12), 1335–1346.
- Hosseinzadeh, S., et al. (2015). *Thymus vulgaris* review. *International Journal of Clinical Medicine*, 6(9).
- Ijaz, I., et al. (2020). Nanoparticles review. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(3), 223–245.
-

- Iserin, P. (2001). *Plantes médicinales*. Larousse.
- Izzi, M., Sportelli, M. C., Torsi, L., Picca, R. A., & Cioffi, N. (2023) Synthesis and antimicrobial applications of ZnO nanostructures: A review. *ACS Applied Nano Materials*, 6(13), 10881–10902.
- Jain, R., et al. (2022). Nanoparticle interactions. *Drug Discovery Today*, 27(2), 103454.
- Kamatou, G. P. P., et al. (2013). Menthol properties. *Phytochemistry*, 96, 15–25.
- Khan, I., et al. (2021). Nanoparticles properties. *Nanomaterials*, 11(3), 745.
- Kresge, C. T., et al. (1992). Mesoporous sieves. *Nature*, 359, 710–712.
- Kuete, V. (2017). *Medicinal spices from Africa*. Elsevier.
- Letchford, K., & Burt, H. (2007). Nanoparticle classification. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 65(3), 259–269.
- Liao, W., et al. (2021). Nanoencapsulation oils. *Applied Sciences*, 11(13), 5778.
- López, M., et al. (2024). Nanoparticles antimicrobial activity. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 91.
- MICHEL, T. (2011) *Huiles essentielles et composés aromatiques : propriétés biologiques et applications*. Lavoisier.
- MIGUEL, M. G. (2010) Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15, 9252–9287.
- MISHARINA, T. A., & POLSHKOV, A. N. (2005) Antioxidant properties of essential oils. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41(6), 610–618.
- Mohamadi, i. (2024) Étude des métabolites secondaires du thym et leurs activités biologiques. Mémoire universitaire.
-

- Mora-Huertas, C. E., et al. (2010) Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1–2), 113–142.
- Morales, r. (2002) l’histoire, la botanique et la taxonomie du genre *Thymus*. In *Thyme: The genus Thymus*. Taylor & Francis.
- Müller, r. H., et al. (2002) Solid lipid nanoparticles in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, S131–S155.
- Müller, r. H., ET AL. (2006) Oral bioavailability of cyclosporine using SLN. *International Journal of Pharmaceutics*, 317, 82–89.
- Nickavar, B., ET AL. (2005) Analysis of essential oils of *Thymus* species. *Food Chemistry*, 90, 609–611.
- Nguyen, H., ET AL. (2009) Effect of oxidative deterioration on lemon oil. *Food Chemistry*, 112(2), 388–393.
- Oliveira, r. C., et al. (2020) Antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil. *Food Chemistry*, 315, 126096.
- Oussalah, m., et al. (2007) Inhibitory effects of essential oils on pathogenic bacteria. *Food Control*, 18(5), 414–420.
- Ozguven, m., & tansi, s. (1998) Drug yield and essential oil of *Thymus vulgaris*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 22, 537–542.
- Patil, S. M., ET AL. (2021) Ethnopharmacology and phytochemistry of *Thymus vulgaris*. *Heliyon*, 7(5), e07054.
- Patravale, v., et al. (2012) Nanoparticles as drug carriers. Woodhead Publishing.
- Petrovska, b.B. (2012) Historical review of medicinal plants’ usage. *Pharmacognosy Reviews*, 6(11), 1–5.
- Pothier, j. (2001) Les chémotypes de *Thymus vulgaris*. *Phytothérapie*, 3, 22–28.
-

Prabhu, s., & poulose, e. K. (2012) Silver nanoparticles antimicrobial action. *International Nano Letters*, 2(1), 32.

(Rai, m., et al.(2015) Nanotechnology in infectious diseases. Academic Press.

Reverter, m., et al. (2017) Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sasal, P., Saulnier, D., & Caruso, D. (2017). Moving towards more sustainable aquaculture practices: A review on the potential of plant products in fish disease prevention and treatment. *Aquaculture*, 479, 603–615.

Rudramurthy, g. R., et al. (2016) Nanoparticles against pathogenic microbes. *Molecules*, 21(7), 836.

Saadallah, et al. (2020) Saade, S., Brien, C., Pailles, Y., Berger, B., Shahid, M., Russell, J., Waugh, R., Negrão, S., & Tester, M. (2020)

Sakat, s., et al. (2010)Antioxidant activity of medicinal plants. *International Journal of Pharmacy*, 2(1), 146–155.

Salvia-trujillo, l., et al. (2015)Nanoemulsions antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, 43, 547–556.

Singh, r., & kumar, p. (2023) High surface nanomaterials biomedical applications. *Materials*, 16(5), 1876.

Sirelkhatim, a., et al. (2015) ZnO nanoparticles antibacterial activity. *Nano-Micro Letters*, 7(3), 219–242.

Stahl-biskup, e., & sáez, f. (2002) *Thyme: The genus Thymus*. Taylor & Francis.

Stahl-biskup, e., & venskutonis, r. P. (2012) Stahl-Biskup, E., & Venskutonis, R. P. (2012). *Thyme: The genus Thymus*. CRC Press.

Tabti, m., & sali, f. Z. (2016)Antimicrobial activity of essential oils. Master thesis.

Teuscher, e., et al. (2005) Aromatic plants and essential oils. Tec & Doc.

- Thormar, h. (2011) *Lipids and essential oils antimicrobial agents*. Wiley.
- Tisserand, r., & young, r. (2014) *Essential oil safety*. Churchill Livingstone.
- Turek, c., & stintzing, f. C. (2013) Essential oils stability. *Comprehensive Reviews in Food Science*, 12(1), 40–53
- Vallet-regi, m., et al. (2001) MCM-41 drug delivery system. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308–311.
- Wichlab. (2017) *Nanometer scale comparison: Nanoparticle size comparison and nanotechnology chart ruler*.
- Wisam, S. U., et al. (2017) Antioxidant activities of thyme extracts. *Pakistan Journal of Nutrition*, 17(1), 46–50.
- Yanishlieva, n. V., et al. (1999) Antioxidant activity of thymol and carvacrol. *Food Chemistry*, 64(1), 59–66.
- Zhao, d., et al. (1998) Mesoporous silica structures. *JACS*, 120(24), 6024–6036.
- Zielinska, a., et al. (2020) Polymeric nanoparticles review. *Molecules*, 25(16).

VII. PARTIE ANNEXES

Annexe 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de thym

Cette annexe présente les principaux composés identifiés dans l'huile essentielle de thym ainsi que leurs pourcentages relatifs déterminés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS).

Annexe 2 : Préparation des milieux de culture

Description des protocoles de préparation des milieux de culture utilisés pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des différents échantillons.

Annexe 3 : Données expérimentales de l'activité antibactérienne

Tableaux regroupant les diamètres des zones d'inhibition obtenus pour les différentes souches bactériennes étudiées :

- Escherichia coli
- Staphylococcus aureus
- Bacillus subtilis
- Bacillus cereus

Annexe 4 : Calcul du rendement d'extraction de l'huile essentielle

Formule utilisée :

Rendement (%) = (Masse de l'huile essentielle obtenue / Masse de la matière végétale utilisée) × 100

Avec les calculs détaillés correspondant aux essais réalisés.

Annexe 5 : Photographies des essais expérimentaux

Photographies illustrant :

- Le dispositif d'hydrodistillation de type Clevenger.
- Les nanoparticules de silice mésoporeuse MCM-41.

- Les essais d'encapsulation.
- Les boîtes de Pétri utilisées pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Annexe 6 : Abréviations utilisées

HE : Huile essentielle

MCM-41: Mobil Composition of Matter No. 41

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

ASB : Albumine Sérique Bovine

ATCC : American Type Culture Collection