

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
جامعة عمار تلججي الأغواط
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT
كلية العلوم
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme Master LMD

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologique

Option : Microbiologie fondamentale et Appliquée

THÈME :

**Evaluation de l'activité antibactérienne de combinaison d'huiles
essentielles essais sur le *clou de girofle* et le *thym*.**

Présenté par :

M^{elle} BOUZIDI Imane

M^{elle} ELHOUITI Dhia Kounouz

Soutenu le 26 juin 2023 devant le jury composé de :

Présidente	Mme ALLAL Farida	MCA, Université Laghouat,
Examinatrice	Mme ABDESSELAM Amira	MAA, Université Laghouat,
Encadrante	Mme BENCHIKH Imen	MCA, Université Laghouat,
Co-encadrant	Mr KOUADRI Youcef	MCB, Université Laghouat,

Dédicace

Je dédie humblement ce modeste travail

*À **ALLAH** le tout puissant qui m'a guidé dans le bon chemin.*

*A l'âme de ma mère « **Rabía** », que dieu la garde dans son paradis.*

*A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père « **Mohamed** ».*

A mes frères et sœurs Mehdi, Maya et Saïda pour leur soutien.

A ma chère binôme, Imane pour sa entente et sa sympathie.

A ma chère cousine Fatiha qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A mes grands pères.

A mes chères amies Sarah, Khaola, Nour el Imane et Maroua, Pour leurs encouragements et pour les bons moments qu'on a vécus ensemble.

Kounouz

Dédicace

Je dédie ce Modest travail

Tout d'abord, louange à « ALLAH » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes.

A mes chers parents mon père « Ahmed » et ma mère « Khadidja » pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.

A mes frères Djeloul et Taher.

A mes sœurs Fatima Zohra, Hadjer et Malika.

A ma nièce Yasmine et mon neveu Ahmed

A ma chère binôme et cousine kounouz pour son soutien moral et leur patience tout au long de ce travail

A ma chère cousine Fatiha pour son indéfectible soutien et sa patience infinie

A mes chères amies Yousra et Yasmine pour leurs aides et supports dans les moments difficiles.

A toutes ma famille.

Imane

Remerciements

*Avant tout, Nous tenons tout d'abord à remercier **ALLAH**, le tout puissant, qui nous a donné le courage et la volonté pour accomplir ce travail.*

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements aux personnes qui nous apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.

*Nos vifs remerciements à notre Encadrante **Mme BENCHIKH Imen** pour sa confiance en notre travail, sa patience et les nombreux conseils qu'ils nous prodigués.*

*Nos vifs remerciements vont également à **Mme ALLAL Farida** enseignante à l'université **Ammar Thelidji** de **Laghouat** pour avoir accepter de présider ce travail*

*Nos vifs remerciements vont également à **Mme ABDESSELAM Amira** enseignante à l'université **Ammar Thelidji** de **Laghouat** pour avoir accepter d'examiner ce travail*

*Finalement nous tenons à remercie l'université de **Laghouat**, notamment La faculté de Biologie.*

Elhouiti Kounouz § Bouzidi Imane

Résumé

L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité microbienne. Les huiles essentielles des plantes aromatiques sont souvent utilisées dans la médecine populaire pour le traitement des infections. Dans le cadre de ce travail, on s'est intéressé pour tester l'activité antibactérienne de deux plantes aromatiques de Blida et Mascara (*Thymus vulgaris* الزعيرة, *Syzygium aromaticum* القرنفل) sur des bactéries pathogènes pour l'homme. Cette activité a été mise en évidence par la méthode de l'aromatogramme vis-à-vis des trois souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). Les résultats de l'aromatogramme montrent que la croissance de ces trois bactéries étudiées est fortement inhibée par l'huile essentiel de *Thymus vulgaris* et de *Syzygium aromaticum* avec des diamètres des zones d'inhibition compris entre 5,61 et 45.84 mm. Ces plantes peuvent être valorisées comme sources de nouveaux agents antibactériens qui peuvent être utilisées dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire.

Mots clés : Huiles essentielles, plantes aromatiques, l'activité antibactérienne, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, l'aromatogramme.

ملخص

تعد زيادة المقاومة البكتيرية للمضادات الحيوية مشكلة عالمية خطيرة دفعت البحث إلى تحديد الجزيئات الحيوية الجديدة ذات النشاط الميكروبي الواسع. في هذا العمل ، قمنا باختبار النشاط المضاد للبكتيريا لنبتتين عطريتين من البلدة و معسكر على البكتيريا المسببة للأمراض البشرية. تم توضيح هذا النشاط من خلال طريقة **l'aromatogramme** ضد ثلاث سلالات بكتيرية **Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa**

أظهرت نتائج **l'aromatogramme** أن نمو هذه البكتيريا الثلاثة التي تمت دراستها قد تم تثبيطه بشدة بواسطة الزيت العطري من **Thymus vulgaris** و **Syzygium aromaticum** بأقطار من مناطق التثبيط تتراوح بين 5.61 و 45.84 ملم. يمكن تقييم هذه النباتات كمصادر لعوامل جديدة مضادة للجراثيم يمكن استخدامها في مجالات الأدوية والأغذية الزراعية.

الكلمات المفتاحية: زيوت عطرية ، نباتات عطرية ، نشاط مضاد للجراثيم, *Syzygium aromaticum*, *l'aromatogramme, Thymus vulgaris*.

Abstract

The increasing resistance of bacteria to antibiotics is a serious global problem that has directed research for the identification of new biomolecules with broad microbial activity. The essential oils of aromatic plants are often used in folk medicine for the treatment of infections. As part of this work, we were interested in testing the antibacterial activity of two aromatic plants from Algeria (*Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*) on pathogenic bacteria for humans. This activity was demonstrated by the aromatogram method against the three bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*). The results of the aromatogram show that the growth of these three bacteria studied is strongly inhibited by the essential oil of *Thymus vulgaris* and *Syzygium aromaticum* with diameters of the zones of inhibition ranging between 5.61 and 45.84 mm. These plants can be valued as sources of new antibacterial agents which can be used in the pharmaceutical and agri-food fields.

Key words: Essential oils, aromatic plants, antibacterial activity, *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum*, the aromatogram.

Sommaire

	Page
Dédicace	I
Remerciement	III
RESUME (en Français)	IV
RESUME (en Arabe)	V
RESUME (en Anglais)	VI
Sommaire	VII
Liste des tableaux	XI
Liste des figures	XII
Liste des abbreviations	XIII
Introduction	1

Chapitre I : Etude Bibliographique

1. Généralités sur les plantes médicinales et la phytothérapie	3
1.1. Phytothérapie	3
1.2. Plantes médicinales	3
2. Plantes utilisées dans notre étude	3
2.1. <i>Thymus vulgaris</i>	3
2.2. <i>Clou de girofle</i>	4
3. Définition des huiles essentielles	4
3.1. L'huile essentielle de <i>clou de girofle</i>	5
3.1.1. Activités biologiques du <i>clou de girofle</i>	5

3.1.1.1. Activité antibactérienne	5
3.1.1.2. Activité antifongique	6
3.1.1.3. Activité anti-inflammatoire et analgésique	6
3.1.1.4. Activité anticancéreuse	7
3.1.1.5. Activité antivirale	7
3.2. L'huile essentielle de <i>Thym</i>	7
3.2.1. Activités biologiques de thym	8
3.2.1.1. Activité antibactérienne	8
3.2.1.2. Activité antifongique	9
3.2.1.3. Activité antivirale	9
3.2.1.4. Activité antidiabétique	9
3.2.1.5. Activité anticancéreuse	10
4. Mécanisme d'action des huiles essentielle	10
5. Méthodes d'extractions des huiles essentielles	11
6. Généralité sur les Microorganismes testés	12
6.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
6.2. <i>Escherichia coli</i>	12
6.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12

Chapitre II : Matériel et méthode

1. Lieu d'étude	15
2. Matériels	15

2.1. Matériel végétal	15
2.2. Instruments	15
2.3. Souches bactériennes testées	16
2.4. Milieux de culture	17
3. Méthode	17
3.1.Extraction des huiles essentielles par l’hydro-distillation	17
3.1.1.Caractérisation des huiles essentielles	18
3.2. Coloration de gram	18
3.3. Préparation des milieux de culture	19
3.4. Préparation des pré-cultures	20
3.5.Préparation des disques d’aromatogramme	20
3.6.Evaluation de l'activité antibactérienne	21
3.7. Préparation des dilutions de l’HE	21
3.8. Préparation des suspensions bactériennes	23
3.8.1. Pour les souches ATCC	23
3.8.2. Pour les souches hospitalières	24
3.9. Ensemencement	24
3.10. Dépôt des disques d’aromatogramme	25
4. Expression des résultats	25
 Chapitre III : résultat et discussion	
1. Activité antibactérienne des huiles essentielles	28

1.1 <i>Thymus vulgaris</i>	30
1.2 <i>Syzygium aromaticum</i>	30
2. Mélange des HEs	32
Conclusion	35
Références	
Annexes	

Titre	Page
Figure1 : Thymus vulgaris.	4
Figure 2 : Boutons floraux et fleurs de giroflier.	4
Figure 3 : Principaux constituants d'huile essentielle de Syzygium aromaticum.	5
Figure 4 : Mécanismes d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne.	11
Figure 5 : les huiles essentielles de régions de Blida.	15
Figure 6 : les huiles essentielles de régions de Mascara.	15
Figure 7 : Montage d'extraction par la technique d'hydro-distillation.	17
Figure 8 : Les étapes de coloration de gram.	19
Figure 9 : La préparation de Gélose Mueller-Hinton agar	19
Figure 10 : La préparation de Bouillon Mueller-Hinton	20
Figure 11 : Préparation des disques d'aromatogramme.	20
Figure 12 : Principe de la diffusion de disque	21
Figure 13 : Méthode de dilutions des HE (Méthode 1).	22
Figure 14 : les différentes dilutions de l'HE (Méthode 2).	23
Figure 15 : Les étapes de préparation des suspensions microbiennes.	24
Figure 16 : Ensemencement des souches microbiennes.	24
Figure 17 : dépôt des disques.	25
Figure 18 : dépôt des différentes dilutions de l'HE.	25

Titre	Page
Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de <i>T. vulgaris</i>	7
Tableau 2 : instruments utilisés pour les essais biologiques.	15
Tableau 3 : Origine des souches utilisées dans le test d'activité antibactérienne.	16
Tableau 4 : transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés [44].	26
Tableau 5 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles sur les souches ATCC.	31
Tableau 6 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles sur les souches hospitaliers.	32
Tableau 7 : Résultats de l'aromatogramme de mélange des huiles essentielles sur les souches hospitaliers.	32

ATCC :	A merican T ype C ulture C ollection.
ATP :	A dénosine T riphosphate.
°C :	D egré C elsius.
CCM :	C hromatographie sur C ouche M ince.
DMSO :	D iméthylsulfoxyde.
E.coli :	E scherichia C oli.
HE :	H uile E ssentiel.
HSV :	H erpes S implex V irus.
Lab Vet-Lagh :	L aboratoire V étérinaire du la wilaya de L aghout.
MH :	M ueller H inton.
Nm :	n anomètre.
OMS :	O rganisation M ondiale de la S ante.
P.aeruginosa :	P seudomonas a eruginosa.
S.aureus :	S taphylococcus a ureus.
S.aromaticum :	S yzygium a romaticum.
T.vulgaris :	T hymus v ulgaris.
UV :	U ltra V iolet.
VHC :	V irus de l' H épatite C .
VIH :	V irus de l' I mmunodéficienc e H umaine

Introduction

Introduction

L'Algérie est dotée d'un patrimoine floristique très diversifié, notamment dans le domaine des plantes aromatiques et médicinales. Ce patrimoine floristique d'intérêt biomédical a poussé les chercheurs à explorer ces ressources sur le plan phytochimique et pharmacologique [1].

Les plantes médicinales et aromatiques constituent une source importante de molécules bioactives qui pourraient être exploitées dans la thérapie des maladies infectieuses [2]. Ces constituants sont classés en deux types de métabolisme primaire et secondaire. Les métabolites secondaires sont des produits à structures chimiques souvent complexes, très dispersés selon les espèces [3].

L'utilisation abusive des antibiotiques conduit dans la très grande majorité des cas à la sélection de populations microbiennes résistantes. Cette résistance est due à des mutations chromosomiques ou à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques mobiles (plasmides, phages... etc). Ces résistances ont conduit à chercher de nouveaux agents antimicrobiens possédant une efficacité plus importante que les drogues synthétiques [4].

Actuellement, la recherche s'oriente vers des alternatives moins coûteuses et moins dangereuses pour la lutte des bactéries multirésistantes, pour la plupart le choix s'est porté sur l'utilisation des huiles essentielles ; celles-ci, sont des molécules naturellement présentes dans différentes parties des plantes et obtenues par diverses méthodes d'extraction, elles possèdent un nombre de molécules naturelles complexes dont le pouvoir biologique est puissant contre la propagation de différents agents microbiens notamment les bactéries, virus et mycètes [5].

Les huiles essentielles, principes actifs issus du métabolisme secondaire des plantes médicinales, ont été utilisées depuis l'antiquité et sont largement employées de nos jours, pour leurs propriétés biologiques (antimicrobienne, antioxydant, analgésique, anti-inflammatoire, anti-cancérigène, antiparasitaire, anti-insecticide), [6] et leurs applications dans de multiples et diverses industries : alimentation, cosmétique, parfumerie et pharmacie [7].

Ce travail a pour objectif l'évaluation de l'activité antibactérienne de ces huiles de deux plantes médicinales : le thym (*thymus vulgaris*) et le giroflier (*Syzygium aromaticum*) vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes de type Gram positif : *Staphylococcus aureus* et à Gram négatif *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Cette étude comporte trois parties:

La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique décrivant des généralités sur la plante étudiée, et les huiles essentielles. La seconde décrit la partie expérimentale, avec une présentation de matériel et méthodes utilisés. La troisième est consacrée aux résultats et à la discussion. De même, notre travail s'achève par une conclusion et des perspectives.

Chapitre I :
Etude
Bibliographique

1. Généralités sur les plantes médicinales et la phytothérapie

1.1. Phytothérapie

La phytothérapie est une médecine naturelle basée sur l'utilisation des plantes et de leurs extraits. Le mot phytothérapie vient du grec phyton qui veut dire plantes et therapeia qui veut dire soigner. Elle est considérée par l'OMS comme une médecine conventionnelle. Dans la phytothérapie, on utilise les principes actifs des plantes pour prévenir ou soigner certaines problématiques [8].

1.2. Plantes médicinales

Les plantes médicinales sont des plantes dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses», cette partie peut consister en racine, écorce, feuille, fleur, fruit ou graine [9]. Elle contient, au niveau de ses organes, un ou plusieurs principes actifs utilisables à des fins thérapeutiques. En fait il s'agit d'une plante qui est utilisée pour prévenir, soigner ou soulager divers maux. Les plantes médicinales sont de drogues végétales dont au moins une partie possède des propriétés médicamenteuses [10].

L'efficacité des plantes médicinales est douée à cause de métabolites secondaires ou des principes actifs : les composés phénoliques, les alcaloïdes et les huiles essentielles [11].

2. Plantes utilisées dans notre étude

2.1. *Thymus vulgaris*

Le nom *Thymus* vient probablement du latin "*Thymus*" qui signifie « parfumer » ou du grec "*Thymos*" qui signifie « courage ou force ». Le *thym* est une plante condimentaire qui appartient à la famille des Lamiaceae.

Thymus vulgaris est le *thym* des garrigues ou des jardins, qui poussent spontanément sur les coteaux arides du Méditerranée. C'est un sous-arbrisseau de 30 à 50 cm de hauteur, touffu, aux tiges très ligneuses, aux feuilles petites, sessiles [12]. Le genre *thymus* comprend plus de cinquante espèces. Le thym est l'une des plantes pourvues de plus nombreuses propriétés. On l'utilise sous forme d'infusion ou sous forme d'huile essentielle. C'est l'une des plantes aromatiques les plus employées en thérapeutiques depuis les temps les plus anciens [13].

Classification

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Espèce	<i>Thymus vulgaris</i>



Figure 1 : *Thymus vulgaris* [13].

2.2. Clou de girofle

Le Giroflier ou *Girofle* est une espèce de plantes de la famille des Myrtaceae et du genre *Syzygium*. C'est un arbre petit à moyen, au feuillage persistant et dense, originaire des petites îles volcaniques de l'archipel en Indonésie [14]. Le fruit est une baie appelée (antofle) allongée de 2,5 à 3 cm de long sur 1.3 à 1.5 cm de large, de couleur rouge foncé à maturité. Le *clou de girofle* a un aspect caractéristique brun foncé, à saveur chaude, brûlante, légèrement amère et fortement aromatique [15].

Classification

Règne	Plantae
Sous-règne	viridaeplantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Syzygium</i>
Espèce	<i>Syzygium aromaticum</i>



Figure 2 : Boutons floraux et fleurs de giroflier [15].

3. Définition des huiles essentielles

Selon la Commission de la Pharmacopée Européenne : une huile essentielle est un produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière

première végétale botaniquement définie, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. L'huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition » [16].

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présentent ses composés de se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante et au fait qu'elles soient inflammables [17].

3.1. L'huile essentielle de *clou de girofle*

Syzygium aromaticum représente l'une des principales sources végétales de composés phénoliques, tels que les flavonoïdes, les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques et hydroxyphényl propènes, ainsi que les terpénoïdes [18], [19].

L'eugénol (1) est le composé principalement responsable de l'arôme du *clou de girofle* et constitue 72 à 90% de l'huile essentielle de *girofle* [20]. Les autres constituants courants de l'huile essentielle comprennent l'acétate d'eugényle (2), le β -caryophyllène (3), le salicylate de méthyle (4), le pinène (5), la vanilline (6) et l' α -humulène (7) [21]. (Figure 3)

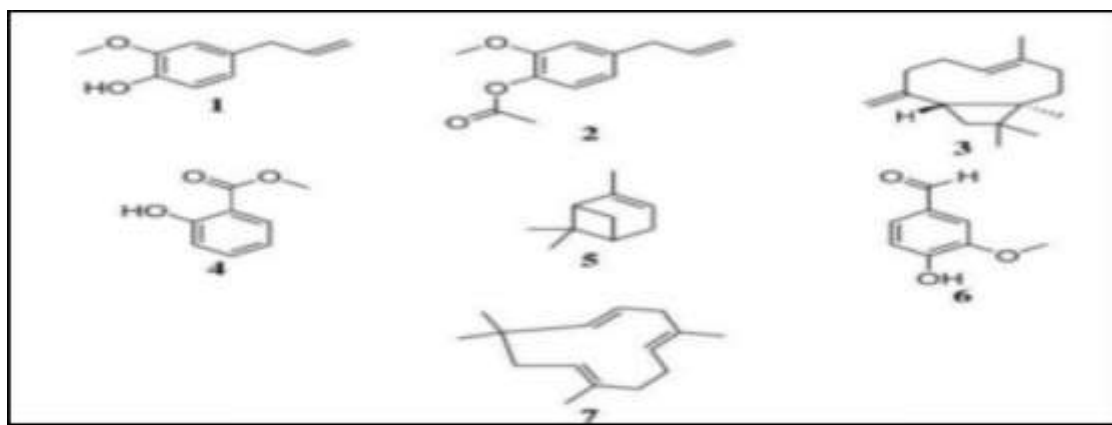


Figure 3 : Principaux constituants d'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* [22].

3.1.1. Activités biologiques du *clou de girofle*

3.1.1.1. Activité antibactérienne

Le *girofle* est composé de 70 % à 90 % d'eugénol et de plus de 15 % d'huile essentielle. Il est composé antiseptique, antibactérien, antifongique et possédant entre 9 à

15 % d'acétate d'eugénol, qui se caractérise par des propriétés antibactériennes. Les solutions ayant de hautes concentrations en eugénol ont un effet bactéricide du au groupement phénol. L'eugénol provoque une lyse bactérienne chez plusieurs souches. Elle est plus importante pour les bactéries à Gram négatif. Le groupe hydroxyle du phénol interagit avec la membrane cellulaire provoquant une fuite des composés cytoplasmiques. Cette réaction induit aussi une modification de structure des acides gras et des phospholipides et une perturbation de la synthèse du matériel génétique. Comme pour les composés phénoliques, le site d'action des terpènes est la membrane cellulaire. Ils la traversent par diffusion provoquant un gonflement et une inhibition des enzymes respiratoires. Chez *Escherichia coli* surtout la présence de l'eugénol dans le cytoplasme bactérien augmente la concentration des acides gras saturés et baisse celle des acides gras insaturés. Il se produit alors une altération de la morphologie bactérienne. L'eugénol inhibe l'action de plusieurs protéines ou composés bactériens. On cite des facteurs de virulence comme la pyocine, la violacéine, l'élastase [23].

3.1.1.2. Activité antifongique

L'huile essentielle de *clou de girofle* possède une puissante activité antifongique contre les pathogènes fongiques opportunistes, comme le *Candida albicans*, le *Cryptococcus neoformans* ou l'*Aspergillus fumigatus*. Elle a été particulièrement efficace sur un modèle expérimental de vaginite murine sur un modèle animal.

Candida albicans est l'agent pathogène causal le plus fréquemment isolé de la candidose. L'eugénol (le principal composant phénolique de l'huile essentielle de *clou de girofle*) possède une activité antifongique importante pendant le temps d'adhérence initial et selon la concentration de ce monoterpène. Ce mono terpène a donc un potentiel thérapeutique important pour les infections à candidose [23].

3.1.1.3. Activité anti-inflammatoire et analgésique

Les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques de l'eugénol sont dues à l'action sur des récepteurs et sur les antigènes responsables de l'inflammation. Pour le volet anti-inflammatoire, l'eugénol agit directement en détruisant les germes pathogènes, il agit sur les cytokines et les cellules immunitaires en modifiant la réaction inflammatoire ce qui diminue indirectement la douleur. Aussi l'eugénol agit sur les récepteurs cellulaires et nerveux ce qui diminue directement la douleur [23].

3.1.1.4. Activité anticancéreuse

L'eugénol, possède un rôle dans la prévention de plusieurs cancers, dont le cancer du foie. *Syzygium aromaticum* inhibe la prolifération cellulaire et diminue le stress oxydatif, ce qui exerce un effet protecteur sur la cirrhose du foie prédisposé au cancer.

Dai et al., 2013, ont tenté une expérience sur 86 modèles de plantes issues de la médecine chinoise, dont l'eugénol qui a exhibé qu'il été l'inhibiteur le plus puissant. *Syzygium aromaticum* possède le pouvoir de régresser l'expression des gènes autophagiques responsables du mécanisme de l'autophagie. Ce dernier est impliqué dans diverses maladies telles que : les maladies cardiovasculaires, les cancers, les infections virales, VHC, VIH [24].

3.1.1.5. Activité antivirale

Les propriétés antivirales de l'HE de *clou de girofle* sont souvent mentionnées dans les livres d'aromathérapie. Cependant les études qui prouvent son efficacité et ses mécanismes d'action sont peu nombreuses. Quelques études mentionnent tout de même l'efficacité du clou contre l'Herpes Simplex Virus (HSV), comme celle menée in vitro par **TRAGOOLPUA Y et JATISATIENR A**. Dans cette étude, le *S.aromaticum* inhibe deux types de HSV : le HSV-1 et le HSV-2 grâce à son principe actif, l'eugénol [25].

3.2. L'huile essentielle de *Thym*

Thymus vulgaris renferme une huile volatile de couleur pâle, jaune ou rouge, avec une odeur riche, et aromatique et un goût persistant, corsé et épicé.

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est composée d'une quantité très variable en phénols dont le thymol et le carvacrol en sont les majeurs constituants. Elle contient également d'autres composants minoritaires comme présentés dans le tableau (1) [26].

Tableau 1 : Composition chimique de l'huile essentielle de *T. vulgaris* [26].

Espèce	Familles	Composition
Thymus vulgaris	Phénols (20-80%)	Thymol (30-70%)
		Carvacrol (3-15%)

	Alcools	Linalool (4- 6.5%)
		α -terpinéol (7,8 – 8,9 %)
	Monoterpènes hydrocarbonés	p-cymène (15-20%)
		γ -terpinène (5 – 10%)
		Bonéole, camphre, limonène, myrcène, β - pinène, trans sabinène hydrate, terpinène-4-ol (0,5- 1,5 %)
	Sesquiterpènes hydrocarbonés	B-caryophyllène (1-3%)

3.2.1. Activités biologiques de thym

3.2.1.1. Activité antibactérienne

Un grand nombre d'huiles essentielles de *Thymus*, d'extraits et de leurs composés isolés ont été étudiés pour l'activité antimicrobienne. Ces produits présentent un intérêt particulier, car aucune résistance ou adaptation bactérienne n'a été décrite, et des effets secondaires faibles ou insignifiants ont été constatés à la fois pour les huiles essentielles et les extraits entiers.

Plusieurs scientifiques attribuent l'activité antimicrobienne d'espèces du genre *Thymus* à la forte concentration de carvacrol dans son huile essentielle. Il a des propriétés biocides qui entraînent des perturbations de la membrane bactérienne.

De plus, il peut traverser les membranes cellulaires, atteindre l'intérieur de la cellule et interagir avec les sites intracellulaires vitaux pour les activités antibactériennes.

Le thymol a également une activité antimicrobienne en raison de sa structure phénolique, et a montré une activité antibactérienne contre certaines souches

bactériennes dont *Aeromonas hydrophila* et *Staphylococcus aureus*. Cette activité antibactérienne est causée par l'inhibition de la croissance, la production de lactate et par la diminution de l'absorption cellulaire du glucose [27].

3.2.1.2. Activité antifongique

La plupart des espèces de *thym* possèdent une grande quantité de monoterpènes phénoliques ce qui révèle leurs effets fongicides en raison de la présence des composés phénoliques tels que le thymol comme composant principal qui pourraient perturber la membrane cellulaire fongique. Une autre classe de composant qui semble montrer une activité antimicrobienne est les hydrocarbures terpéniques (γ -terpinène).

L'huile essentielle de *T.vulgaris* est considérée comme un antifongique efficace et pourrait être utilisé pour le traitement de la mucormycose en raison de son interférence avec l'ergostérol provoquant une perturbation de la membrane des champignons et la perte de contenu intracellulaire. Aussi, il inhibe la germination des sporangiospores et le développement de mycélium. L'huile essentielle de *thym*, riche en thymol et autres substances antifongiques, utilisées pour désinfecter les murs moisissés dans les habitations à faible concentration [27].

3.2.1.3. Activité antivirale

Silke Nolkemper et ses collaborateurs, ont mené une expérience avec des extraits aqueux d'espèces de la famille des Lamiacées examinés pour leur activité antivirale contre le virus Herpès simplex (HSV). L'extrait du *thym* (*Thymus vulgaris*) a montré une activité inhibitrice contre l'herpès virus simplex type 1 (HSV-1), type 2 (HSV-2).

L'activité antivirale des huiles essentielles est mal connue. Il existe des rapports sur l'activité de certaines huiles sur les virus. Cependant, ses mécanismes n'ont pas été entièrement décrits. En 2011, **Saderi et Abbasi** ont observé que l'huile de *thym* est potentiellement efficace contre les adénovirus [27].

3.2.1.4. Activité antidiabétique

Plusieurs chercheurs ont suggéré d'utiliser les plantes pour leurs différents effets biologiques contre le diabète.

L'extrait aqueux de *thym* a révélé un effet anti-hyperglycémiant chez les lapins rendu diabétiques par l'alloxan (un composé organique rassemble structuralement le glucose, il

cause le diabète alloxanique). En raison de la capacité de la plante à stimuler l'élimination du glucose de la circulation, à réduire la libération de glucagon ou l'augmentation de la sécrétion de l'insuline.

L'huile de *thym* est riche en substances actives comme les composés phénoliques et flavonoïdes, en particulier le carvacrol et le thymol. Ce qui explique que l'effet hypoglycémique dû à l'action du thymol ou du carvacrol qui limite l'insuline [27].

3.2.1.5. Activité anticancéreuse

De nombreuses études ont montré qu'un grand nombre de terpénoïdes et de composés aromatiques contenus dans les huiles essentielles ont des activités anticancéreuses importantes.

L'huile essentielle de *thym* a des effets cytotoxiques in vitro contre les cellules humaines de l'adénocarcinome ovarien qui sont résistantes aux agents chimiothérapeutiques ainsi qu'un effet anti tumoral significatif chez la souris, en raison des composants biologiques actifs du *thym* comme le carvacrol et le thymol.

Ce multi composant de produits naturels est efficace pour prévenir le développement de la tumeur chez la souris et donc retarder la mortalité animale. Le mécanisme des actions cytotoxiques du thym peut être dû à sa nature lipophile, provoquant l'accumulation de composés volatils de plante dans la membrane cellulaire conduisant une augmentation de sa perméabilité, provoquant par la suite une fuite de métabolites et des enzymes [27].

4. Mécanisme d'action des huiles essentielle

Les huiles essentielles ont un spectre d'action très large, Leur activité antibactérienne est principalement fonction de leur composition chimique, et de la nature de leurs composés volatils majeurs.

D'une manière générale leur action se déroule en trois phases:

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieure de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie [28].

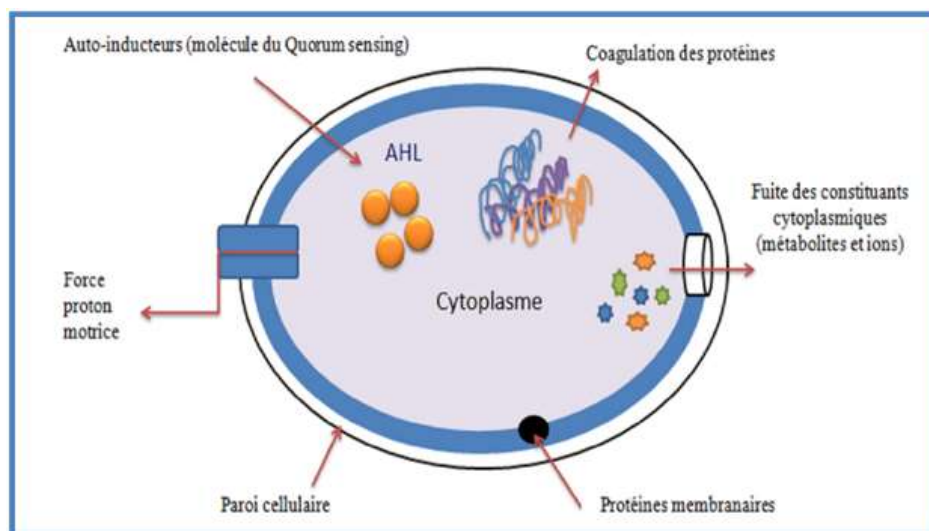


Figure 4 : Mécanismes d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne [29].

5. Méthodes d'extractions des huiles essentielles

Plusieurs méthodes sont connues pour extraire les essences aromatiques des végétaux. Les principales méthodes d'extraction sont basées sur l'entraînement à la vapeur d'eau, l'expression, la solubilité et la volatilité. Chacune d'elles donne une image différente de la composition de l'huile essentielle du produit. Le choix de la méthode la mieux adaptée à l'extraction de l'huile essentielle d'un végétal se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait [30].

Les principales méthodes d'extraction sont:

- La distillation à vapeur saturée
- Entraînement à la vapeur d'eau
- L'hydro diffusion
- L'expression à froid
- Extractions par solvants
- Hydro distillation
- Extractions par les corps gras
- Extractions par micro- ondes

Les étapes de l'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quelque soit le type d'extraction utilisé. Il est nécessaire dans un premier

temps d'extraire de la matière végétale les molécules aromatiques constituant l'huile essentielle, puis dans un second temps de séparer ces molécules du milieu par distillation [31].

La distillation est la technique la plus utilisée pour l'extraction des HEs et elle reste sans doute la plus rentable et efficace [32].

6. Généralité sur les Microorganismes testés

6.1. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à grouper en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin.

Staphylococcus aureus est un germe aérobie - anaérobie facultatif .Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales. Ainsi, il possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de *staphylocoques*.

Cette bactérie est très répandue chez l'Homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'Homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains ayant la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides. Il développe rapidement des résistances aux antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glyco-peptides [33].

6.2. *Escherichia coli*

Le genre *Escherichia*, nommé d'après le pédiatre allemand **Theodor Escherich**, est composé de bacilles Gram-négatifs anaérobies facultatifs appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. L'espèce de type genre *Escherichia coli* est largement distribuée, où il s'agit du principal anaérobie facultatif habitant dans le gros intestin des humains et des animaux à sang chaud. Bien que la plupart des souches d'*E.coli* vivent sans danger dans le côlon et provoquent rarement des maladies chez les individus sains, un certain nombre de souches pathogènes peuvent provoquer des maladies intestinales et extra-intestinales chez les individus sains et immunodéprimés [34].

6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa, autrement connu sous le nom de bacille pyocyanique, c'est une bactérie gram-négative. Les bacilles sont fins, droits et très mobiles grâce à un flagelle polaire : ciliature monotriche, dépourvus de spores et de capsules. Ils apparaissent la plupart du temps isolés ou en diplobacilles.

Elle peut, dans certaines conditions, être pathogène. Très résistante, elle est avec d'autres bactéries à gram-négatif de plus en plus souvent responsable d'infections nosocomiales. C'est l'une des bactéries les plus difficiles à traiter cliniquement [35].

Chapitre II :
Matériel et
Méthode

1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biologie ; du département de Biologie, faculté des sciences université Amar Telidji Laghouat.

2. Matériels

2.1. Matériel végétal

Notre étude portera sur deux plantes aromatiques : le *thymus vulgaris* et le giroflier (*Syzygium aromaticum*) qui sont riches en huiles essentielles. Ces huiles ont été achetées à partir de deux régions Blida et Mascara (**Figure 5**). Le choix de ces derniers est basé sur l'utilisation en médecine traditionnelle pour le traitement du plusieurs maladies humaines ainsi que sur leur disponibilité locale.



Figure 5 : les huiles essentielles de régions de Blida. (Original., 2023).



Figure 6: les huiles essentielles de régions de Mascara. (Original., 2023).

2.2.Instruments

Les moyens utilisés pour les essais biologiques sont mentionnés dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2 : instruments utilisés pour les essais biologiques.

Consommables	Equipements et appareils
• Tubes à essai • Papier whatman N°1 • Flacons stériles • Anse de platine • Pipettes Pasteur	• Bec benzène • Autoclave • Micropipette • Balance magnétique • Vortex magnétique

• Boîtes de pétri • Ecouvillons • Epprouvettes • Entonnoirs • Fiole jaugée • Erlenmeyer • Béchers • Cuves à CCM	• Bain-marie • Incubateur • four Pasteur • Agitateur-plaque chauffante • Spectrophotomètre UV-Visible (Shimadzu UV-1601) • Pied à coulisse • pH mètre • Microscope optique
--	---

2.3. Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries pathogènes pour l'homme, responsables d'infections plus ou moins graves, souvent multi-résistante aux antibiotiques. Des souches de collection internationale ATCC (**Tableau 3**) (American type culture collection) ont toutes été fournies par le laboratoire vétérinaire de la wilaya de Laghouat.

Et deux autres souches ont été isolées à partir de prélèvements de malades hospitalisés (Hôpital el Akid Lotfi 240 lits, LAGHOUAT) :

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*

Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C.

Tableau 3 : Origine des souches utilisées dans le test d'activité antibactérienne.

Souche	Gram	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	ATCC 25923	Lab Vet-Lagh
<i>Escherichia coli</i>	Négative	ATCC 25922	Lab Vet-Lagh
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	ATCC 27853	Lab Vet-Lagh

2.4.Milieux de culture

Suivant les méthodes employées et selon les souches, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants : gélose de Mueller-Hinton agar et Bouillon Mueller-Hinton et l'eau physiologique (Les milieux de cultures et des produits chimiques dont une description détaillée est présentée dans l'annexe 1).

3. Méthode

3.1.Extraction des huiles essentielles par l'hydro-distillation

L'hydro-distillation est composée de hydro- en grec « eau » et de -distillation qui vient du latin stilla, « goutte » et de distillare (latin savant), « tomber goutte à goutte » [35].

L'hydro-distillation est la méthode la plus simple et la plus anciennement utilisée et normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité [36].

Elle se produit dans l'appareil de Clevenger (**Figure 7**) et consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (entier, coupé ou éventuellement broyé) dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite portée à ébullition [37]. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau un mélange azéotropique (eau + huiles essentielles) et l'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par différence de densité [38].

La durée de la distillation est plus longue pour les organes de plantes ligneuses que pour les herbacées, cette différence est liée à la localisation des structures d'élaboration ou de stockage des huiles essentielles pouvant être superficielles ou internes.

De ce fait, elles ont une influence sur le déroulement de l'hydro-distillation, c'est-à-dire sur les mécanismes successifs mis en jeu, et par conséquent sur la durée [39].

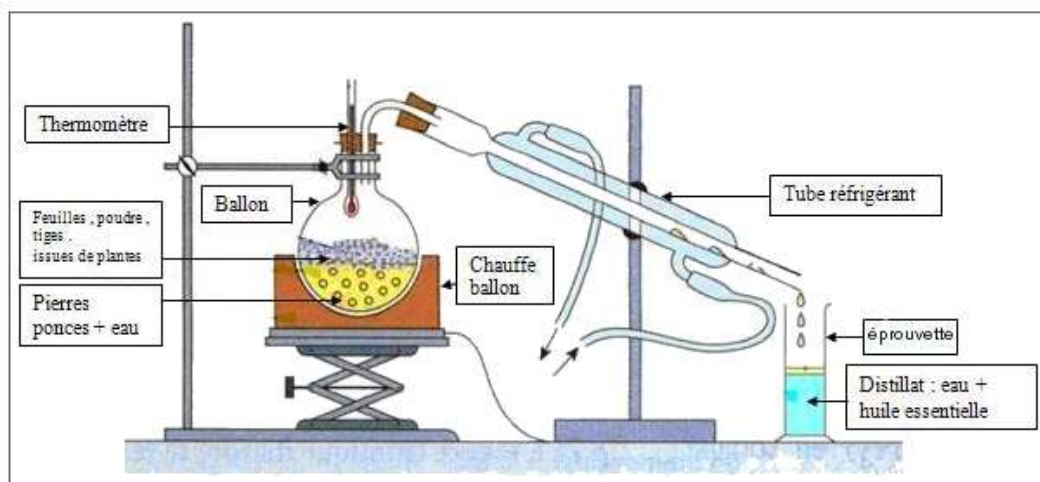


Figure 7 : Montage d'extraction par la technique d'hydro-distillation [40].

3.1.1. Caractérisation des huiles essentielles

Chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques tels que : l'odeur, l'aspect physique et la couleur [41].

- L'aspect physique : l'aspect d'une HE dépend des produits qui la constituent, elle nous apparaitre sous forme liquide, solide ou bien semi solide.
- Odeur : il appartient aux sens chimiques les plus sensibles.
- Couleur : la coloration d'une HE dépend des produits qui la constituent, donc la couleur change d'une huile essentielle à l'autre ; elle peut être déterminé à l'œil nu.

3.2. Coloration de gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour distinguer et classifier les bactéries. Son avantage est de donner une information rapide, facile et bon marché sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu [42]. C'est pour cela on a utilisé pour mettre en évidence les bactéries Gram positif ou négatif (les souches hospitaliers) (**Figure 8**), selon les étapes suivantes :

- Déposer quelques gouttes de solution de violet de gentiane sur le frottis fixé, laisser agir 1 minute. Le violet de gentiane colore le cytoplasme des bactéries.
- Rincer très brièvement de l'eau distillée sur la lame au-dessus du frottis.
- Déposer quelques gouttes de lugol sur le frottis et laisser agir 1 minute, il permet de fixer le violet dans les bactéries.
- Rincer brièvement à l'eau distillée comme précédemment décrit.
- Décolorer à l'alcool, cette étape est la plus importante de la coloration. Versez goutte à goutte l'alcool sur la lame, laissé agir 30 secondes. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment avec de l'eau distillée pour stopper la décoloration.
- Contre-colorer en déposant la solution de fuchsine pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram- décolorées à l'étape précédente. Rince à l'eau distillée et séchée à l'aide d'un papier.
- Observer au microscope (grossissement 1000x, avec une goutte d'huile à immersion).

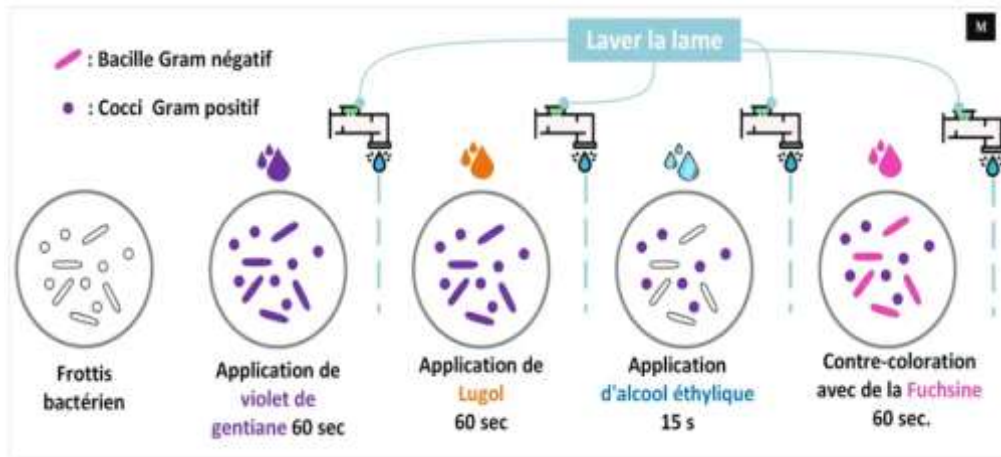


Figure 8: Les étapes de coloration de gram [42].

3.3.Préparation des milieux de culture

- **Gélose Mueller-Hinton agar** : Pour préparer ce milieu il faut peser 38 g de poudre et la mélanger dans 1 L d'eau. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant. Il faut porter à ébullition pendant environ une minute (pH=7,3). Ensuite il faut stériliser la gélose à l'autoclave durant 15 min à 121,1 °C, répartir en flacons stériles (**Figure 9**).

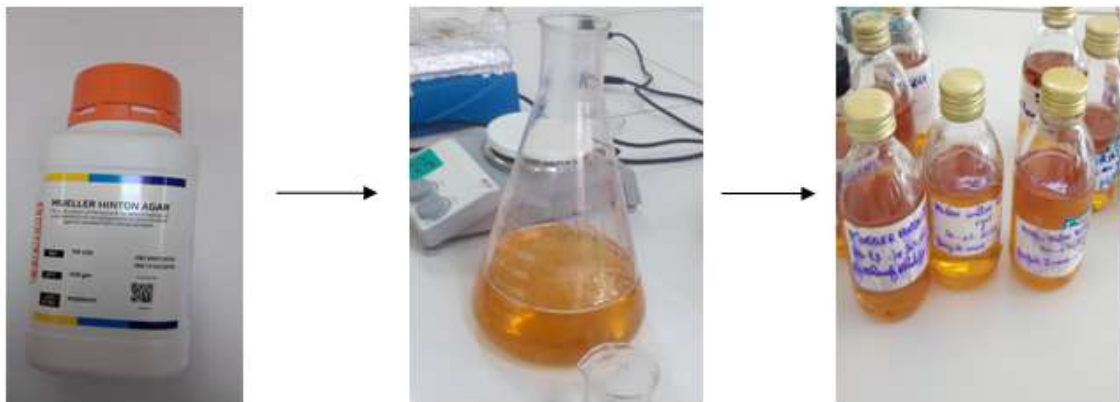


Figure 9 : La préparation de Gélose Mueller-Hinton agar (Original., 2023).

- **Bouillon Mueller-Hinton** : Mélanger 21 grammes de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée stérile, chauffé jusqu'à obtention d'une suspension homogène. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes, répartir en tubes ou flacons stériles (**Figure 10**).

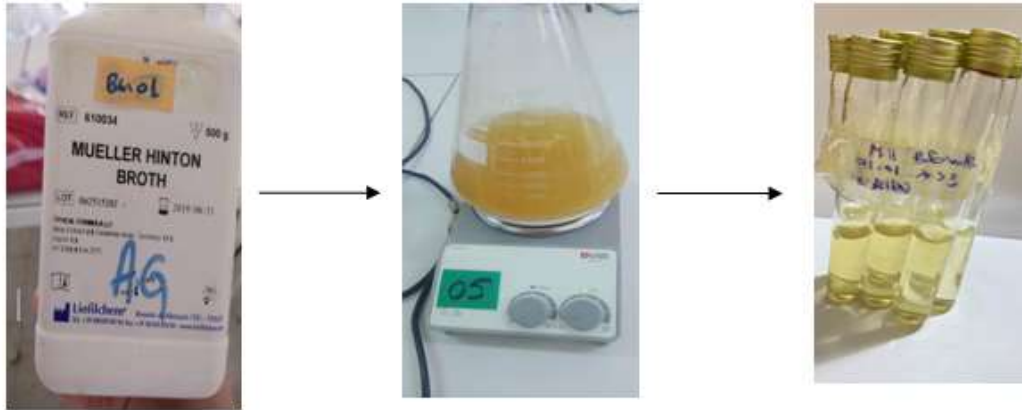


Figure 10 : La préparation de Bouillon Mueller-Hinton (Original., 2023).

3.4.Préparation des pré-cultures

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de (18 à 24 heures) en phase de croissance exponentielle.

Afin d'obtenir des souches microbiennes pures et jeunes, des ré-isolements réguliers ont été effectués selon la méthode des stries, avec la pipette pasteur sur le milieu Mueller-Hinton agar, puis elles ont été incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

3.5. Préparation des disques d'aromatogramme

Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés à partir du papier whatman N°1, ensuite ils sont mis dans une boîte de pétri en verre, stérilisés au four pasteur 30 minutes à 120°C (Figure11), puis stockés à une température ambiante (la boîte de pétri est hermétiquement fermée avec le papier aluminium).

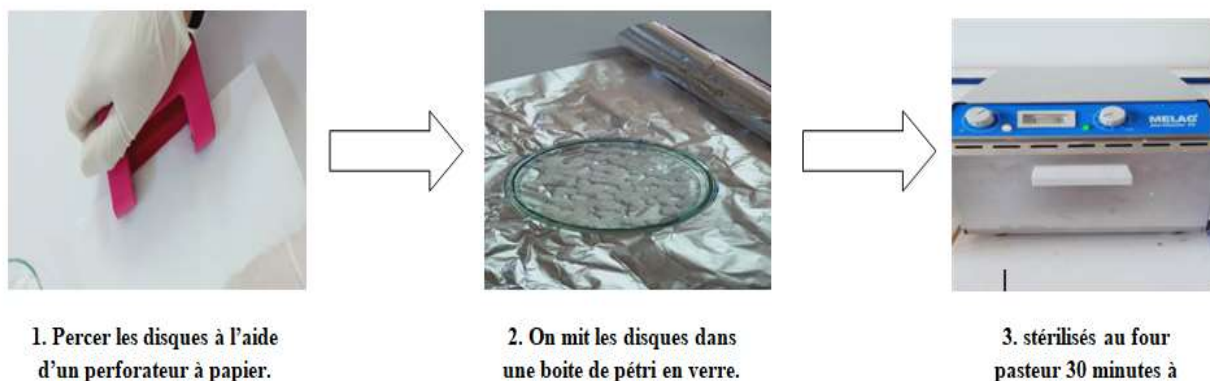


Figure 11: Préparation des disques d'aromatogramme. (Original., 2023)

3.6. Evaluation de l'activité antibactérienne

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes, la méthode de diffusion sur milieu gélosé Muller Hinton a été adoptée.

Selon **Fauchère et Avril**, l'aromatogramme est une méthode qui se réalise in vitro. Elle est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale appelée antibiogramme ou méthode de disque ou méthode par diffusion en milieu gélosé [43].

Le principe de la méthode repose sur le pouvoir migratoire du composé testé en milieu solide (MH) dans une boîte de pétri, après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme cible (**Figure 12**).

L'activité antibactérienne sur la cible est appréciée par la mesure de la zone d'inhibition [30].

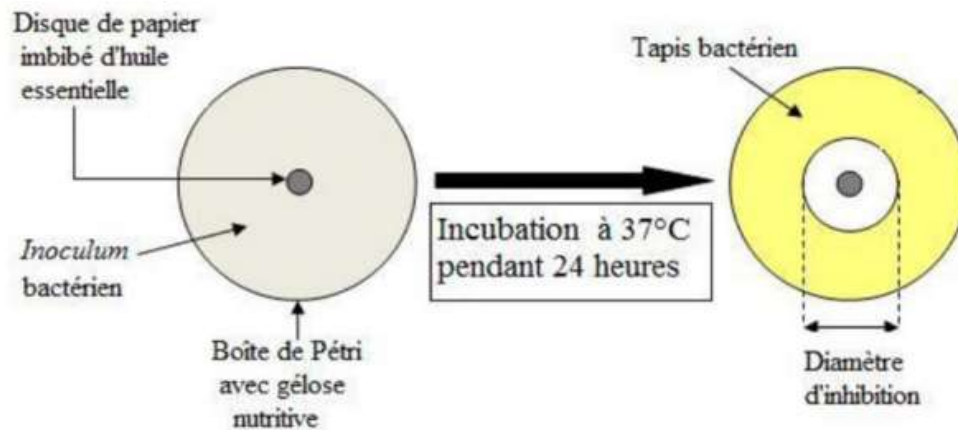


Figure 12: Principe de la diffusion de disque [30].

3.7. Préparation des dilutions de l'HE

Une série de dilutions des huiles essentielles (*thym* et *clou de girofle*) dans le DMSO (diméthylsulfoxyde) a été réalisée par deux méthodes de dilutions :

- En débutant par la première méthode de dilution à 1/2 jusqu'à la dilution de 1/16, dans des tubes en verre stériles :
 - Le premier contient 100 µl d'huile essentielle et 100 µl de DMSO.
 - 100 µl de la première dilution sont transférées dans le deuxième tube (1/4) auquel on rajoute 100 µl de DMSO, puis agiter à l'aide d'un vortex. Des dilutions à 1/8, 1/16, sont préparés de la même manière (**Figure 13**).

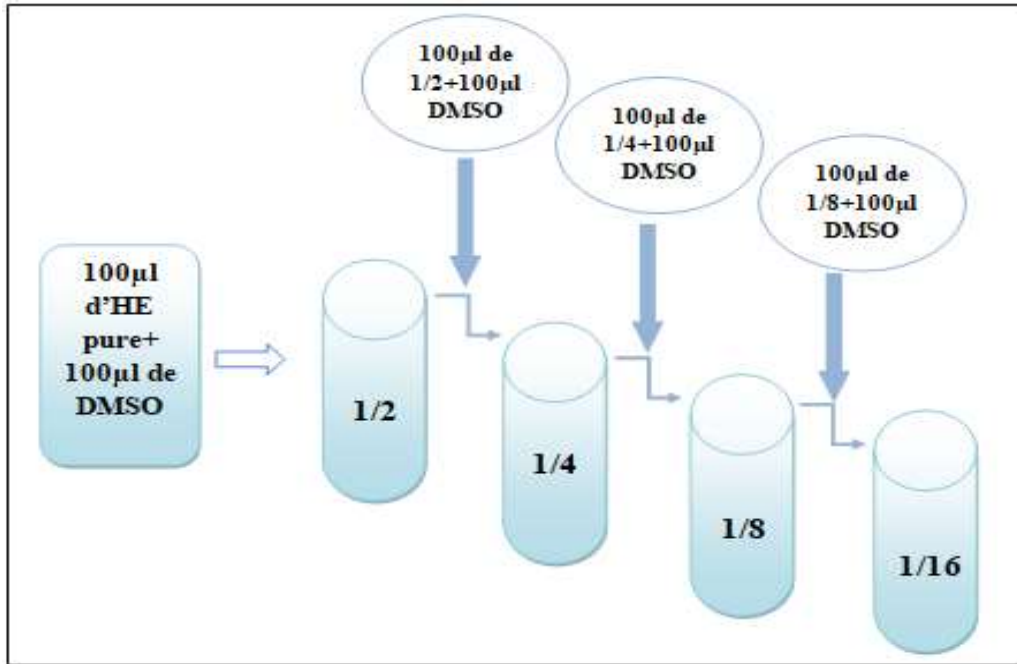


Figure 13: Méthode de dilutions des HE (Méthode 1). (Original., 2023)

➤ La deuxième méthode est basée sur une dilution de pourcentage en commençant par 6% jusqu'à 100%. (Figure14).

- Le premier tube contient 6% d'huile essentielle et 94% de DMSO ;
- Le deuxième tube contient 12% d'huile essentielle et 88% de DMSO ;
- Le troisième tube contient 25% d'huile essentielle et 75% de DMSO ;
- Le quatrième tube contient 50% d'huile essentielle et 50% de DMSO ;
- Et le dernier tube contient 100% d'huile essentielle et 0% DMSO.

(Un tube qui contient seulement le DMSO est utilisé comme témoin négatif).

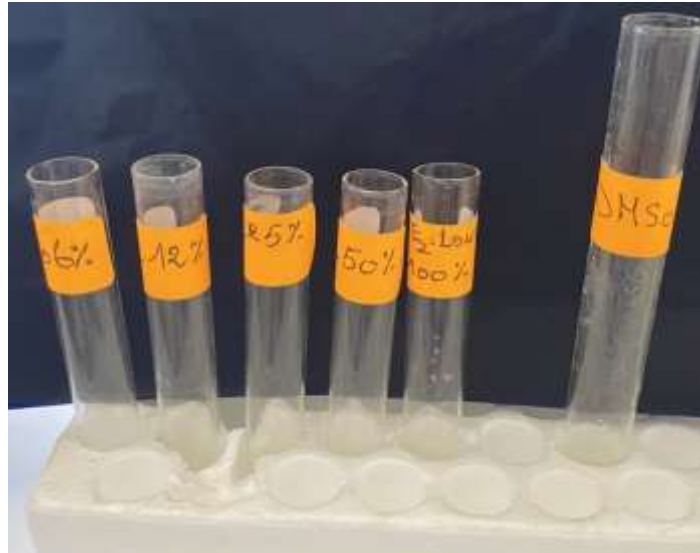


Figure 14 : les différentes dilutions de l'HE (Méthode 2). (Original., 2023)

➤ Préparation de dilutions de mélange des huiles essentielles

Afin de mettre en évidence l'effet combiné entre les deux HEs *Thym* et clou de girofle, ont été réalisés des dilutions de 1/2 jusqu'à la dilution de 1/16, dans des tubes en verre stériles :

- Le premier contient 50 µl d'huile essentielle de *thym* + 50 µl d'HE de clou de girofle et 100 µl de DMSO.
- 100 µl de la première dilution sont transférées dans le deuxième tube (1/4) auquel on rajoute 100 µl de DMSO, puis agiter à l'aide d'un vortex. Des dilutions à 1/8, 1/16, sont préparés de la même manière.

3.8.Préparation des suspensions bactériennes

3.8.1. Pour les souches ATCC

- A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, on a raclé à l'aide d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- On a déchargé la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile et bien homogénéisé la suspension bactérienne, la standardisation de la suspension 10^6 UFC/ml qui correspond à une densité optique comprise entre 0.08 et 0.1 mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à 623 nm (Figure15).

L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.



Figure 15 : Les étapes de préparation des suspensions microbiennes. (Original., 2023)

3.8.2. Pour les souches hospitalières

A partir d'une culture jeune sur gélose MH on prélève à l'aide d'une pipette pasteur 3 à 5 colonies bien isolées et identiques dans 10 ml de bouillon MH, on agite au vortex pendant quelque seconde. Cette culture était incubée pendant 18H-24H à 37°C.

3.9. Ensemencement

On coule le milieu de culture gélosé Mueller Hinton dans les boites de pétri à raison de 15 ml par boîte et on laisse solidifier sur la paillasse. On a Trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Puis Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées (**Figure 16**). Avec la répétition de l'opération trois fois, en tournant la boîte de Pétri de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.



Figure 16 : Ensemencement des souches microbiennes. (Original., 2023)

3.10. Dépôt des disques d'aromatogramme

Une fois les géloses Muller – Hinton sont ensemencées, les disques préparés sont disposés sur la surface de la gélose dans des conditions stériles, à raison de trois disques par boîte de pétrie pour les différentes dilutions et un disque qui contient seulement le DMSO est utilisé comme témoin négatif, à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen (**Figure 17**). Puis, ils ont été imbibés par 5 μ l à l'aide d'une micropipette de chaque composé testé (**Figure 18**).

Les boîtes ont été maintenues à température ambiante pendant 20 minutes pour que les composés puissent diffuser. Les boîtes ont été incubées à l'étuve à 37 °C pendant 24h.



Figure 17 : dépôt des disques (Original., 2023).



Figure 18 : dépôt des différentes dilutions de l'HE. (Original., 2023)

4. Expression des résultats

L'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo autour des disques, dont le diamètre a été mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre du disque de 6 mm). Une échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle en se basant sur les diamètres des zones d'inhibition (D) permet de distinguer 5 classes d'HE.

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

La sensibilité des souches aux agents antimicrobiens a été classifiée en fonction des diamètres des zones d'inhibition selon **Djeddi et Al, 2000** comme suite [44] :

Tableau 4 : transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés [44].

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité du germe
<8	-	Résistant
9-14	+	Sensible
15-19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

Chapitre III : *résultat et* *discussion*

1. Activité antibactérienne des huiles essentielles

La méthode de diffusion des disques (5.0 µl HE/disque) nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des huiles essentielles de deux plantes médicinales et aromatiques d'Algérie.

La sensibilité des différentes souches microbiennes se traduit par un halo autour du disque imprégné du composé testé. Le diamètre du halo est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse. les résultats du test de sensibilité microbienne aux huiles essentielles sont regroupés dans le **tableau 5** pour les souches ATCC et le **tableau 6 et 7** pour les souches hospitalières (**Voir l'annexe 2**).

Tableau 5 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles sur les souches ATCC.

Microorganisme	Témoin (DMSO)	Thymus vulgaris (HE1)				Syzygium aromaticum (HE2)				HE 1 + HE 2			
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>Escherichia coli</i> (25922)	-	33,27	21,68	18,79	9,80	17,08	15,02	13,73	9,15	29,67	15,45	8,56	5,61
<i>Staphylococcus</i> <i>Aureus</i> (25923)	-	45,48	31,15	12,91	10,23	14,86	12,64	12,40	7,67	27,85	21,08	17,98	16,38
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> (27853)	-	9,53	9,28	7,30	7,09	10,28	9,17	8,07	7,98	13,13	6,99	6,86	6,69

(Diamètres des zones d'inhibition en **mm** de chaque dilution, DMSO)

Notes : (-) : pas d'inhibition, **DMSO:** témoin, **HE:** huile essentielle.

Tableau 6 : Résultats de l'aromatogramme des huiles essentielles sur les souches hospitalières.

Microorganisme	Témoin (DMSO)	<i>Thymus vulgaris</i> (HE1)					<i>Syzygium aromaticum</i> (HE2)				
		6%	12%	25%	50%	100%	6%	12%	25%	50%	100%
<i>Escherichia coli</i>	-	13,2	14,2	22,75	24,8	27,1	7,5	10,5	13,25	13,6	13,86
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	9,01	12	22,5	27,7	32	9,8	10,1	11,30	13	14,5

(Diamètres des zones d'inhibition en **mm** de chaque dilution, DMSO)

Notes : (-) : pas d'inhibition, **DMSO**: témoin, **HE**: huile essentielle.

Tableau 7 : Résultats de l'aromatogramme de mélange des huiles essentielles sur les souches hospitalières.

Microorganisme	Témoin (DMSO)	<i>HE 1 + HE 2</i>				
		6%	12%	25%	50%	100%
<i>Escherichia coli</i>	-	9,17	11,3	15,3	19,8	23,43
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	9,6	11	24	21,1	25,9

D'après les tableaux 5 et 6 , nous constatons que la plupart des souches bactériennes présentent une sensibilité variable vis-à-vis des huiles essentielles testées. Parmi les souches étudiées à Gram négatif, l'espèce la plus résistante est *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1 *Thymus vulgaris*

Le pouvoir antibactérien de HE de *Thymus vulgaris* est plus élevé (diamètre d'inhibition > 40 mm) par rapport au *Syzygium aromaticum*. L'activité antibactérienne de cette plante est due à leur richesse en thymol et carvacrol.

- Le Carvacrol et le thymol agissent en désorganisant la paroi bactérienne et la membrane plasmique, grâce à une interaction avec les protéines membranaires.
- Plus spécifiquement, le thymol semble perturber la production d'ATP par la cellule, en inhibant le cycle de Krebs, ce qui l'empêche de récupérer un fonctionnement normal après l'exposition au thymol.
- De son côté, le carvacrol agit essentiellement sur la membrane plasmique, où il modifie la fluidité membranaire, et perturbe l'équilibre ionique de la bactérie [45].

1.2 *Syzygium aromaticum*

Les résultats du test antibactérien montrent une variation dans l'efficacité d'inhibition de l'extrait de *Syzygium aromaticum* vis-à-vis des souches bactériennes testées. Cette efficacité pourrait être attribuée au composé majoritaire de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* qui est l'eugénol (appartenant à la classe des phénols).

- L'eugénol est très actif contre les micro-organismes testés, utilisé comme agent bactéricide ou bactériostatique selon la concentration utilisée :

L'activité létale bactéricide rend la membrane du micro-organisme perméable, provoquant une fuite d'ion K⁺, ce qui implique la perte de l'osmose de la cellule suivi de la mort du micro-organisme et l'activité inhibitrice ou bactériostatique empêche la croissance du micro-organisme.

- L'eugénol provoque une perte de perméabilité sélective en changeant les propriétés physiques de la membrane, grâce à une coexistence de parties hydrophiles et hydrophobes. Cette augmentation de perméabilité fera perdre à la bactérie ses constituants cellulaires. Par ailleurs, l'huile essentielle va acidifier l'intérieur de la bactérie pour bloquer sa production d'énergie et de composantes de structure. Enfin, si

la bactérie survit, l'huile attaquera directement le matériel génétique de cette dernière [23].

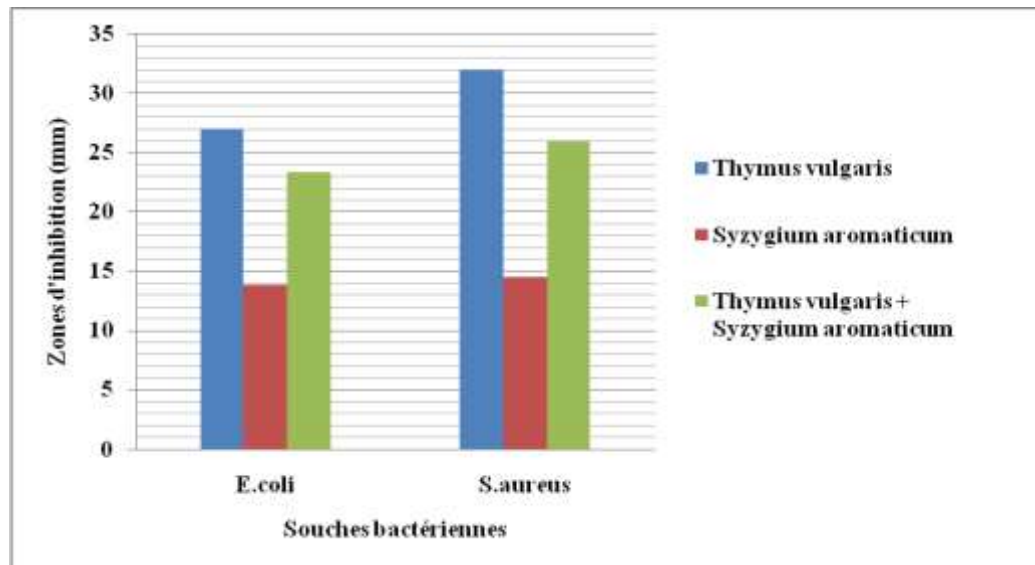


Figure18 : Représentation graphique des résultats de la méthode des disques sur les souches hospitaliers.

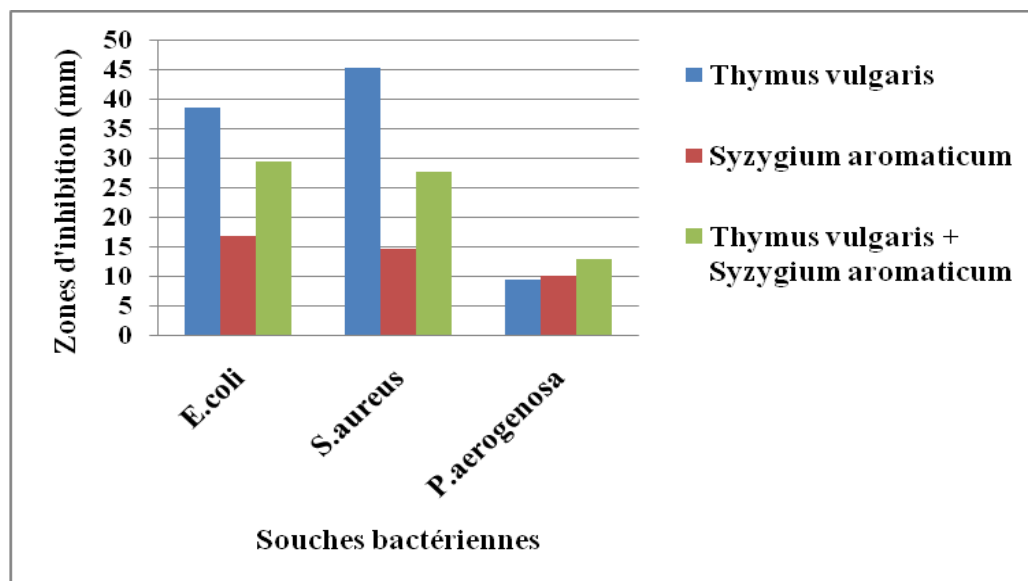


Figure 19: Représentation graphique des résultats de la méthode des disques sur les souches ATCC.

Il ressort de l'histogramme présenté dans les **Figure18** et **19** que les agents antimicrobiens étudiés sont dotés d'une activité inhibitrice variable selon la bactérie testée.

Cette observation a été également rapportée par (**Malecky, 2006**) soulignant que, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire vis-à-vis des huiles essentielles. Cependant, nous constatons que les souches à Gram- sont plus au moins résistantes aux HEs que les souches à Gram+. Il a été fréquemment rapporté dans la littérature (**Fadli et al. , 2012**) que les bactéries à Gram- résistent à l'effet inhibiteur des HEs et leurs composants.

Selon **Lecrerc et al**, cette résistance peut s'expliquer par le fait que les bactéries à Gram- possèdent une membrane externe imperméable aux substances hydrophobes, susceptibles d'entrer et empêcher la croissance bactérienne. Cependant, l'absence de cette barrière chez les Gram+ permet le contact direct des constituants hydrophobes des huiles essentielles avec la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire bactérienne [46].

2. Mélange des HEs

Les résultats de l'activité antibactérienne du *Syzygium aromaticum* et de *Thymus vulgaris* et leur combinaison ont montré qu'ils avaient un pouvoir bactéricide important contre, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*.

Ces résultats ont montré que la composition chimique du mélange d'huiles essentielles a été qualitativement et quantitativement riche en molécules actives volatiles en raison de la puissante activité antibactérienne du produit obtenus contre certaines souches pathogènes.

Ceci peut être principalement dû à la synergie entre les molécules actives telles que l'eugénol et le thymol qui ayant des niveaux élevés dans le mélange d'HEs.

En effet, selon de récentes travail, l'eugénol et le thymol se sont des molécules très actives et dotées d'une activité antimicrobienne (**Marchese et al. 2017; De Arújo et al. 2020**) et leur effet synergique se traduit par l'amélioration de l'effet antibactérien contre certains souches de bactéries Gram-négatives et positives. De plus, selon une récente étude de (**Marchese et al. (2017)**), l'interaction de l'eugénol et du thymol a été étudié par plusieurs auteurs contre les pathogènes Gram-négatif et Gram positifs. En effet, en ce qui concerne Souches à Gram négatif, la combinaison d'eugénol et le thymol ont montré

des effets synergiques sur *E. coli* et *P. aeruginosa*.

- ✓ Nos résultats sont similaires par rapport à ceux mentionnés dans la littérature
- **Cheurfa et al., 2013** ont trouvé également que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* exerce un effet antibactérien remarquable sur les bactéries pathogènes responsables de gastroentérites.
- **Bouterfas et al., 2014** ont trouvé que Les bactéries gram négatif, ayant une membrane externe composée de phospholipides, et riche en molécules de lipopolysaccharides. Cette membrane forme donc une barrière imperméable et empêche l'entrée de substance environnementale comme les antibiotiques et les huiles essentielles ;
- **Abirami et al., 2012** ont trouvé que les bactéries à gram-positives sont plus sensibles ayant seulement une couche de peptidoglycane externe qui n'est pas une barrière de perméabilité effective ;
- **Marchese et al., 2017** ont trouvé qu'il est communément reconnu que les bactéries à Gram négatif sont plus résistantes aux huiles essentielles ;
- **Benmansour et al., 2008** ont trouvé que *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance à ces deux huiles car elles possèdent une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides. En effet cette résistance est associée à la nature de sa membrane externe.

Conclusion

Les plantes médicinales constituent entre autres une source riche en principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Durant cette étude menée sur l'évaluation d'activité antibactérienne de combinaisons d'huiles essentielles essais sur le clou de girofle et le thym, le seul objectif fut à l'évaluation des huiles essentielles de deux plantes médicinales (*Thymus vulgaris* et *Syzygium aromaticum*) vis-à-vis des souches bactériennes à Gram positive et à Gram négative.

L'activité antibactérienne des HES a été évaluée par la méthode d'aromatogramme sur trois souches bactériennes pathogènes. Les HES de *Thymus vulgaris*, de *Syzygium aromaticum* ont un très pouvoir antibactérien dont les zones d'inhibition varient entre 20 et 40 mm.

L'activité antibactérienne est attribuée à leur richesse en thymol et carvacrol. Cette étude mérite d'être complétée par la réalisation des travaux suivants :

- ✓ Tester les mêmes substances sur d'autres bactéries de la flore intestinale ainsi que sur les bactéries pathogènes impliquées dans la détérioration des aliments;
- ✓ Etudier l'effet de combinaison de ces huiles avec les antibiotiques afin de renforcer leurs activités;
- ✓ Tester ces combinaisons sur des matrices alimentaires;
- ✓ Il serait, également très intéressant d'élargir l'utilisation des combinaisons à l'échelle industrielle en les adoptants comme additifs pour conserver les denrées alimentaires;
- ✓ Utiliser ces combinaisons dans le domaine pharmaceutique et cosmétique.

Annexe 1**1. Produits chimiques et composition des milieux de cultures****Produits chimiques**

L'eau distillée

DMSO

KOH

NaCl

Milieux de cultures utilisés

Gélose Mueller-Hinton

Bouillon Mueller-Hinton

Mueller-Hinton agar

Sa formule (g/l) est la suivante :

Casein acid hydrolysate	17.5g
Agar	17g
Beef,infusion from 300gms	2g
Starch	1.5g
Eau distillé	1000ml

PH 7.3

Stériliser à 121°C pendant 15 min.

Mueller-Hinton broth

Sa formule (g/l) est la suivante :

Acid Casein pepton (H)	17,5g
Beef infusion	2g
Corn starch	1,5g
Eau distillé	1000ml
Acid Casein pepton (H)	17,5g

PH 7.4

Stériliser à 121°C pendant 15 min.

Eau physiologique

Sa formule (g/l) est la suivante :

NaCl	9g
Eau distillé	1000ml

PH 7.4

Annexe 2

2. Résultats de l'aromatogramme sur les souches hospitalières

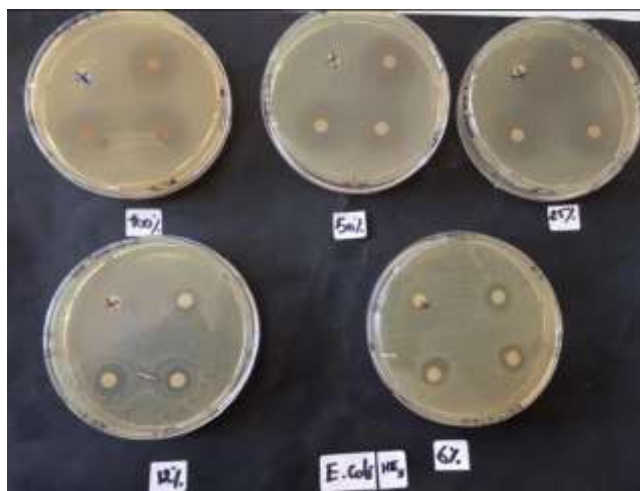


Figure 1: Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* (HE1) sur *E.coli*.

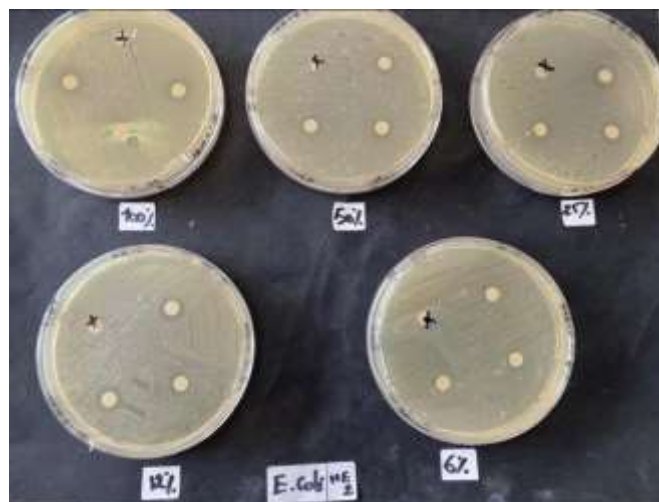


Figure 2 : Résultats d'aromatogramme de *Syzygium aromaticum* (HE2) sur *E.coli*.

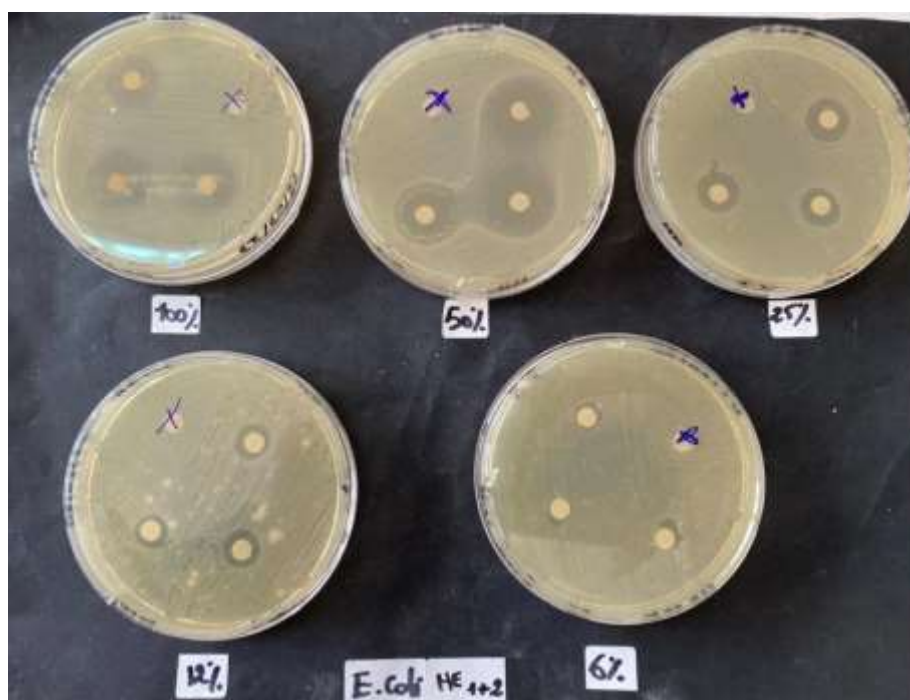


Figure 3 : Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* + *Syzygium aromaticum* (HE1+HE2) sur *E.coli*.



Figure 4: Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* (HE1) sur *S.aureus*.



Figure 5 : Résultats d'aromatogramme de *Syzygium aromaticum* (HE2) sur *S.aureus*.

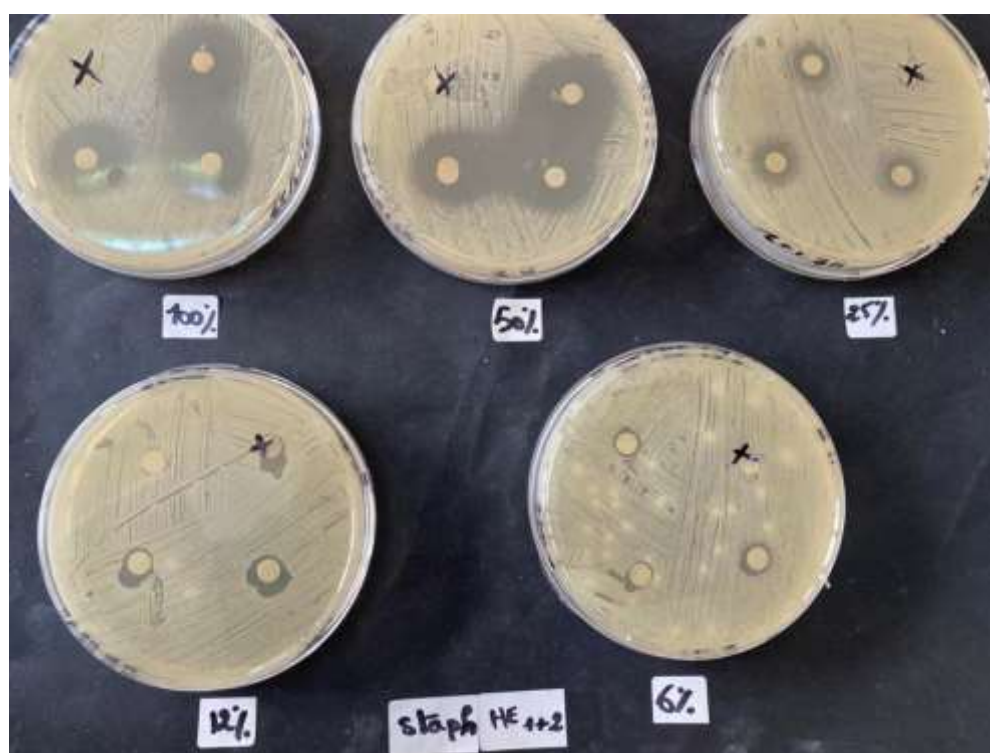


Figure 6 : Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* + *Syzygium aromaticum* (HE1+HE2) sur *S.aureus*.

3. Résultats de l'aromatogramme sur les souches ATCC

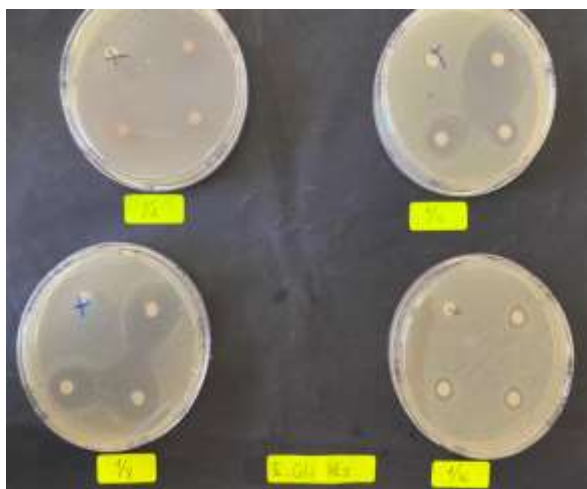


Figure 7: Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* (HE1) sur *E.coli*.

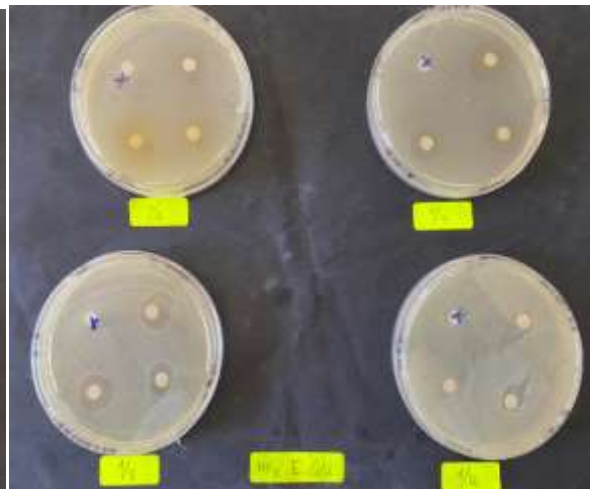


Figure 8 : Résultats d'aromatogramme de *Syzygium aromaticum* (HE2) sur *E.coli*.

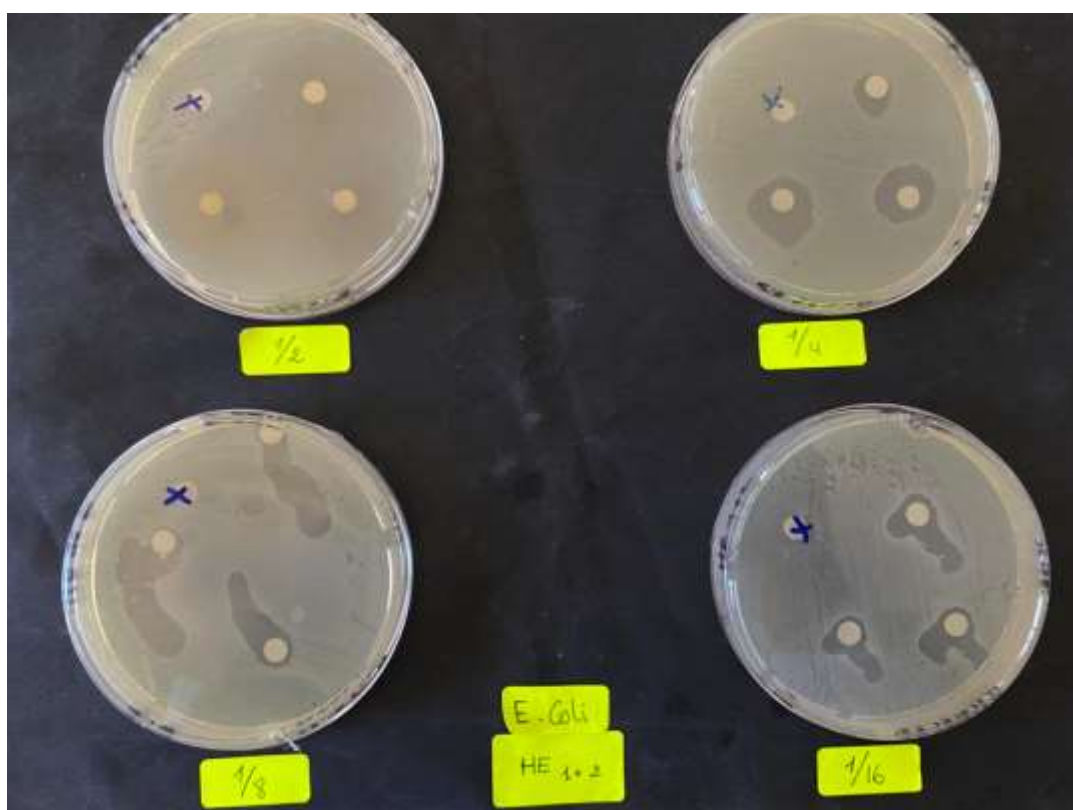


Figure 9 : Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* + *Syzygium aromaticum* (HE1+HE2) sur *E.coli*.

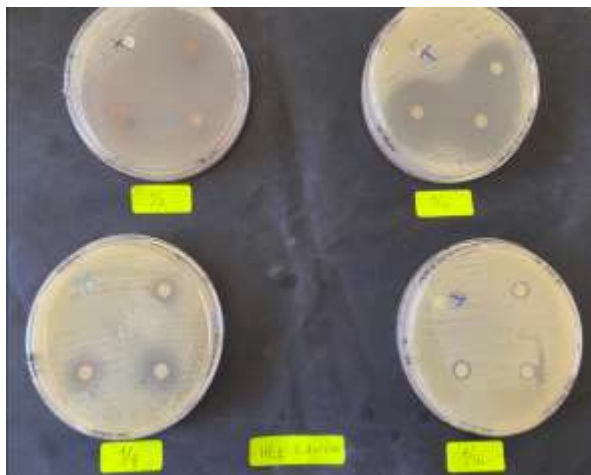


Figure 10: Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* (HE1) sur *S.aureus*.

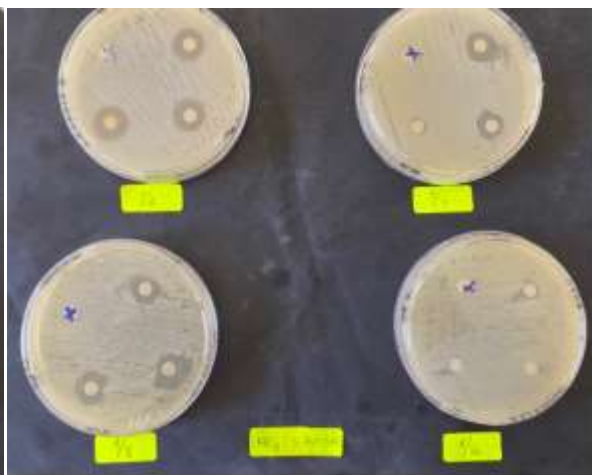


Figure 11 : Résultats d'aromatogramme de *Syzygium aromaticum* (HE2) sur *S.aureus*.

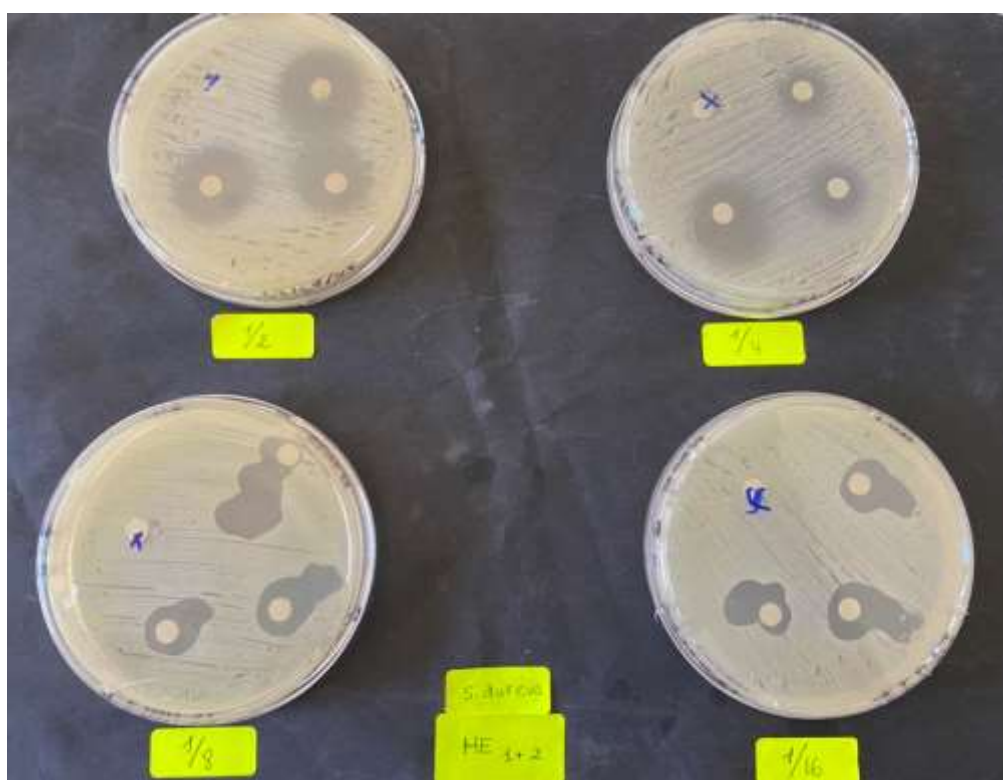


Figure 12: Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* + *Syzygium aromaticum* (HE1+HE2) sur *S.aureus*.

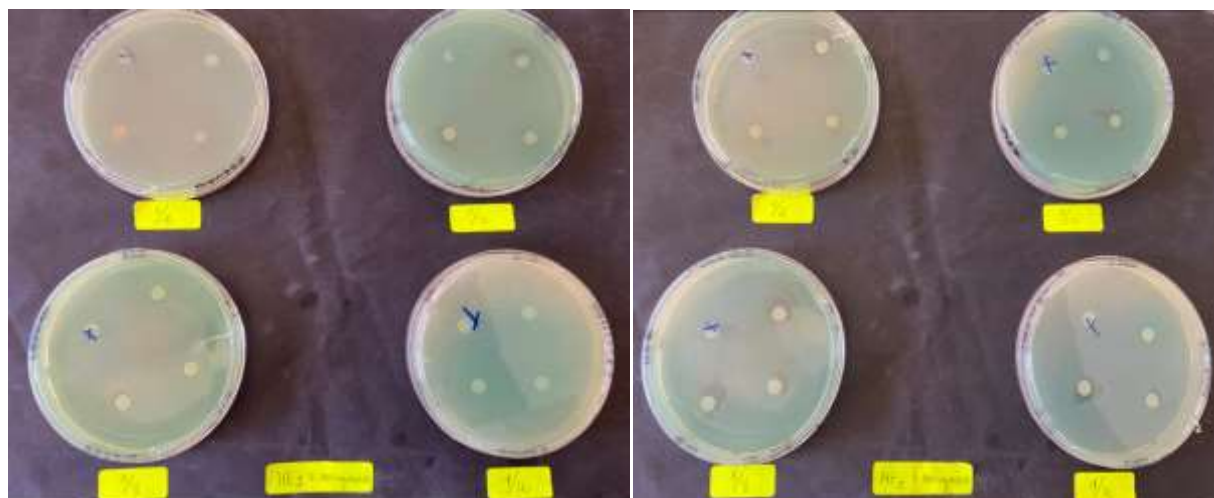


Figure 13: Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* (HE1) sur *P.aeruginosa*.

Figure 11 : Résultats d'aromatogramme de *Syzygium aromaticum* (HE2) sur *P.aeruginosa*.

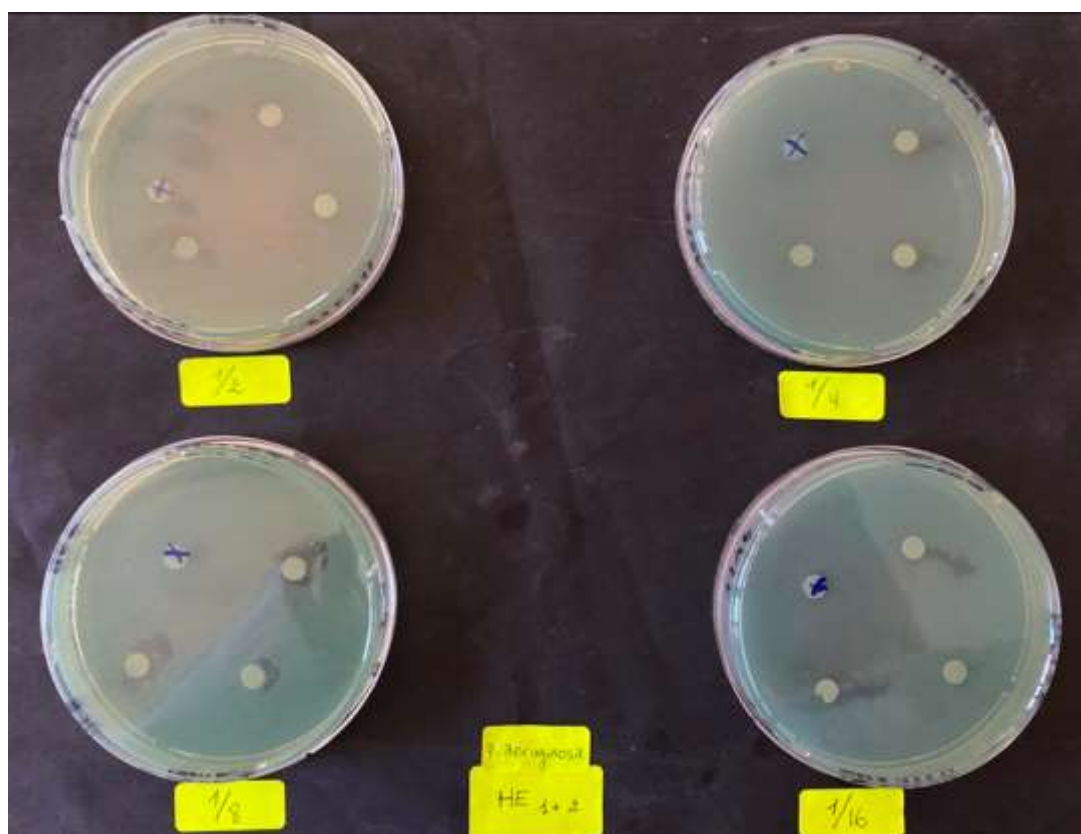


Figure 12: Résultats d'aromatogramme de *Thymus vulgaris* + *Syzygium aromaticum* (HE1+HE2) sur *P.aeruginosa*.

REFERENCES

- [1]. **Bouden I. 2018.** Etude de l'activité antiarthritique, antioxydante et antimicrobienne des extraits de *Matricaria pubescens*. Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas Sétif, Algérie.
- [2]. **Talbaoui A., Jamaly N. et Aneb M. 2012.** Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *J Med Plants Res*, 6 (4): 593-600.
- [3]. **Fouché J., Marquet A., A. Hambuckers. 2000.** Les plantes médicinales : de la plante au médicament. Exposition temporaire de 19.09 au 30.09.2000.
- [4]. **García-Ruiz A., Bartolomé B., Martínez A., Pueyo E. Martín P. et Moreno M. 2008.** Potential of phenolic compound for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19(9) : 835–841.
- [5]. **Bouyahya A., Bakri A., Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa S., Charfi J., Abrini N. et Dakka. 2017.** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1) : 173–183.
- [6]. **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils. *Food Chem Toxicol*, 46: 446-475.
- [7]. **Kambouche N., El-Abed D. 2003.** Composition de l'huile volatile des parties aériennes de *Trachyspermum ammi*. *Journal de recherche sur les huiles essentielles*, 15(1): 39–40.
- [8]. **Simon Y. 2001.** Mills, Evidence for the clinician – a pragmatic framework for phytotherapy, *The European Phytojournal - ESCOP*, Issue 2.
- [9]. **MENACER R., NABI H. 2020.** Contribution à l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Inula Viscosa* L. Mémoire de Master. Université de Médéa. Algérie.
- [10]. **Omar A., Mohammed El haykle M. 1993.** Plantes médicinales et aromatiques. Deuxième édition. Installation connaissance D'Alexandrie, p:13-134.
- [11]. **Zbalah H., Belarbi Y. 2018.** « Effet de séchage des plantes médicinales de la famille des lamiacées (Romarin) sur l'activité antibactérienne. Mémoire de Master. Université abdelhamin Ibn Badis-Mostaganem. Algérie.
- [12]. **NIBOUCHA Y., CHEBBAH S. 2016.** Extraction, et étude de la composition chimique des huiles essentielles d'une plante médicinale de la wilaya de Jijel. Mémoire de Master. Université Mohamed Seddik Ben yahia – Jijel. Algérie.
- [13]. **Beloued A. 1998.** Plantes médicinales d'Algérie. Office des publications universitaires. Alger.

[14]. **HURTEL J.2001.** Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huiles essentielles.

[15]. **LAREDJ H. 2004.** Les plantes médicinales: Extraction des huiles essentielles et activités antibactériennes. Premières journées de pharmacie. Mémoire de Master. Université Badji Mokhtar -Faculté de Médecine, Annaba. Algérie.

[16]. **Benoit G. 2015.** Etat des lieux sur l'aromathérapie dans les officines. Thèse de doctorat. Université de poitiers faculté de médecine et de pharmacie. Vienne.

[17].**Bruneton J.1999.** Pharmacognosie, photochimie, plantes médicinales, 3ème éd. Lavoisier, Paris, 1120.

[18]. **Bao L., Nozaki A. 2012.** Hydrolysable tannins isolated from *Syzygium aromaticum* structure of a new C-glucosidic ellagitannin and spectral features of tannins with a tergalloyl group. *Heterocycles* 85(2) : 365-381.

[19]. **Cortés-Rojas D., Souza C. et Oliveira W.2014.**Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 4(2) : 90-96.

[20]. **Kamatou G., Vermaak I. et Viljoen A.2012.** Eugenol from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule, 17(6) : 953-981.

[21]. **Kuete V.2017.** Chapter 29 *Syzygium aromaticum* Medicinal Spices and Vegetables from Africa, 611-625. Academic Press.

[22]. **Jirovetz L., Buchbauer G., Stoilova I., Stoyanova A., Krastanov A. et Erich Schmidt.2006.** Chemical Composition and Antioxidant Properties of Clove Leaf Essential Oil *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (17) : 6303-6307.

[23]. **BOUZAA F. ZID H. et HARIZA E. 2022.** Etude des activités antimicrobiennes de l'huile essentielle de la plante *Syzygium aromaticum*. Mémoire de magistère. Université frères mentouri Constantine 1.Algérie.

[24]. **Dai J., Zhao X. et Zeng J.2013.** Drug screening for autophagy inhibitors based on the dissociation of Beclin1-Bcl2 complex using BiFC technique and mechanism of eugenol on anti-influenza A virus activity. *PLoS One* : 8-4.

[25]. **TRAGOOLPUA Y., JATISATIENR A.2011.** Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S.G. Harrison and essential oil, eugenol. *Journal of microencapsulation*, 28(1) : 82-91.

[26]. **ABED S. MESSAADIA B. DJESSAS M.2021.** Etude des propriétés physicochimiques et biologiques de *Thymus vulgaris* L. Mémoire de Master. Université des Frères Mentouri Constantine. Algérie.

[27]. **SAADALLAH H. RADJEH B. DAKHLI D. 2020.** Les activités biologiques des constituants bioactifs de Thym (*Thymus algeriensis*). Mémoire de Master. Université de Jijel. Algérie.

[28]. **Caillet S., Lacroix M. 2007.** Les huiles essentielles : leurs propriétés antimicrobiennes Doc, Lavoisier, Paris, p: 915.

[29]. **Bouyahya A., Bakri Y., Et-Touys A., Talbaoui A., Khouchlaa A., Charfi S.et Dakka N. 2017.** Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. Phytothérapie.

[30]. **HESSAS T. SIMOUD S. 2018.** Contribution à l'étude de la composition chimique et à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus*. Thèse de Doctorat. Faculté de Médecine Tizi-Ouzou, Algérie.

[31]. **ATMANI H. BAIRA K.2015.** Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères Physico-chimique de l'huile essentielle du clou de girofle *Syzygium aromaticum* L. Mémoire de Master. Université Frères Mentouri 1 Constantine, Algérie.

[32]. **El hajjaji S. 2017.** Étude phytochimique et Activités Biologiques des Huiles Essentielles et des Extraits des *M. pulegium* (L.), *M. suaveolens* (Ehrh.) et *M. spicata* (L.) du Moyen-Atlas Marocain. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V, Rabat.

[33]. **Dworkin M. Falkow S. Rosenberg E. Schkeufer KH. et Stackebrandt E.2006.** The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. Dans: The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. Springer, New-York, 4-75.

[34]. **Gomes T., Elias W., Scaletsky I., Guth B., Rodrigues J., Piazza R. et Martinez M. 2016.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Microbiology, 47 : 3–30.

[35]. **Echchaoui M. 2018.** Le Pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V-Rabat, Maroc.

[36]. **Benouali D. 2016.** Extraction et identification des huiles essentielles. Mémoire de Master. Université des sciences et de la technologie d'Oran, Algérie.

[37]. **Figueredo G. 2007.** Étude chimique et statistique de la composition d'huiles essentielles d'origans (*Lamiaceae*) cultivés issus de graines d'origine méditerranéenne. Mémoire de Doctorat. Université Blaise Pascal, France.

[38]. **Zerbani G. 2020.** Caractéristiques physico-chimiques antimicrobiennes d'un savon additionné à l'huile essentielle de citron (*Citrus limon*). Mémoire de Master. Université de Ghardaïa, Algérie.

[39]. **El kalamouni C. 2010.** Caractérisations chimiques et biologiques d'extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées. Mémoire de Doctorat. Université de Toulouse, France.

[40]. **KHECHAI M. 2016.** Etude expérimentale de l'équilibre liquide – liquide d'un système ternaire (eau + acide propénoïque + huile d'Eucalyptus).Mémoire de Master. Université Mohamed Khider Biskra, Algérie.

[41]. **Hameurlaine S. 2009.** Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *Pituranthos scoparius* et *Rhantherium adpressum* de la région de Ghardaïa. Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah-Ouargla, Algérie.

[42]. **Rita B., Moyes J. et Donald P. 2009.** Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Current Protocols in Microbiology* : 1-8.

[43]. **Kheyar N., Meridja D. et Belhamel K.2014.** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula viscosa*, *Salvia officinalis* et *Laurus nobilis* de la région de Bejaia. *Algerian Journal of Natural Products* 2(1) : 18-26.

[44]. **Djeddi S., Bouchenah N., Settari I. et Skaltsa, H.2007.** Composition and Antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(4) : 487–490.

[45]. **Chouhan S., Sharma K. et Guleria S. 2017.** Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Present Status and Future Perspectives. *Medicines*, 4(3) : 58.

[46]. **Abdi F. Arkam R. 2016.** Évaluation de l'activité antibactérienne de d'origine végétale, microbienne individuellement et en combinaison. Mémoire de Master. Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou, Algérie.

[47]. **Malecky M. 2006.** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins, thèse de doctorat. Agro Paris Tech, France.

[48]. **Yeddes W., Mejri I., Grati-Affes T. et Khammassi S.2022.** Combined effect of essential oils from Clove (*Syzygium aromaticum*, Thym (*Thymus vulgaris* L.) and Lemon peel on anti-bacterial, cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Trends in Phytochemical Research (TPR)*, 6(1): 11-18.