



République Algérienne Démocratique et Populaire



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE DE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

Master académique

FILIERE : Sciences Biologiques

OPTION : Microbiologie appliquée

Thème

*L'évaluation de l'effet synergique des huiles
essentielles de *Juniperus thurifera* en combinaison
avec les antibiotiques*

Présenté par

MEDDOUR Mouna

BOUMAARAFI Afifa

Setenu le : 26 /08/2020

Jury de soutenance

Président : Dr. MAAMAR Hichem

M.C.B

Univ. Abbès Laghrou-Khenchela

Encadreur : Dr. ZERAIB Azzeddine

M.C.B

Univ. Abbès Laghrou-Khenchela

Examineur : Mr. RAHAL Khaled

M.A.A

Univ. Abbès Laghrou-Khenchela

Promotion : Août 2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

1420 هـ

Remerciements :

En premier lieu, nous exprimons nos profonds remerciements à Allah le tout puissant de nous avoir donné la patience et la volonté également le courage pour arriver au bout de ce modeste travail. Car sans lui rien n'est possible.

Nos vifs remerciements s'adressent à Dr. MAAMAR Hichem maître de conférences à l'université Abbes Laghrour-Khenchela, un grand honneur d'être président du jury de soutenance, merci d'avoir apporté une attention particulière à ce travail.

Nous tenons à remercier vivement Dr. ZERAIIB Azzeddine, maître de conférences à l'université Abbes Laghrour-Khenchela, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec la plus grande rigueur scientifique, sa compréhension, son aide et sa très gentillesse durant tout le long de notre mémoire sa compétence et la qualité de ses conseils. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.

Un grand merci à monsieur RAHAL Khaled , maître assistant à l'université Abbes Laghrour-Khenchela, qu'il trouve ici l'expression de profonde reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Merci à toute la promotion 2ème année Microbiologie appliquée (2019-2020)

Enfin, nous remercions tous les enseignants, nous leurs adressons nos sincères remerciements pour leurs patience et pour tout ce qu'il nous avons offert comme enseignements et conseils durant ce long cycle de formation et tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Merci

À ceux et celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur

DEDICACE

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :

Me chères parents, mon père Abdelali et ma mère Hadda qui m'ont beaucoup soutenu et encouragé jusqu'au bout et que Dieu vous donne la santé et longue vie

A mon chère frère Ahmed

A mes très chères sœurs Yousra et Seha

A mes chères amies : Iman, Malika, Aicha, Asma, Aicha et Djihane, Siham.

Et surtout mon meilleur amie et amant Touta

A toutes mes camarades de master II Microbiologie, A toutes mes professeurs dans tous les cycles de ma scolarité qui mon éclairé la voit du savoir surtout mon encadreur Mon encadreur AZZEDDIN ZERAIB

Et je n'oublie pas mes professeurs que Dieu ait pitié d'eux M. Hadda et D. Lotfi

En fin, à toutes les personnes « NB » qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et tous ceux qui, par un mot m'ont donné la force de continuer

MEDDOUR MOUNA

DEDICACE

A l'aide de Dieu tout puissant, qui m'a tracé le chemin de ma vie,

j'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

♥ *la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ; ma mère: Khemissa qui m'a apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance, courage et sécurité.*

À mon cher père : Abdallah qui m'a appris le sens de la persévérance tout au long de mes études, pour son sacrifice, ses conseils et ses encouragements ♥.

♥ *À mes chères sœurs (Sabah, Hamida, Chahrazed, Warda) et qui m'ont redonnée le sourire et*

fait retrouver la joie de vivre et leurs hommes, à leurs enfants notamment

Ayoub et Sadja..

Mes frères: Larabi , Rachid, Khalil

♥ *À ma grande sœur "Hamida" pour sa spontanéité, ses critiques constructives, et bien sur pour tous les moments de bonheur qu'elle m'a apportée♥.*

♥ *À toute ma grande famille «BOUMAAARAFI» ♥.*

♥ *À mes collègues que je les aime follement :Salsabil, Soundouss, Zahia , Habiba et Houda qu'ont ajoutées un gout épatant à ma vie durant depuis cinq ans ,*

merci pour l'ambiance et la jovialité, à mes amies agréables

chaima et Amel, je vous adore mortellement ♥.

♥ *À Mon binôme « Mouna » je ne vais jamais oublier les moments partagés pendant la préparation de notre mémoire ma chérie ♥.*

♥ *À la plus jolie enseignante Zeraïb .A, un grand merci monsieur notamment pour ta patience et ta motivation dans tout les cas ♥*

♥ *AFIFA* ♥

Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le contexte de l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Juniperus thurifera* et leur effet synergique en combinaison avec les antibiotiques. Ce manuscrit est constitué de deux chapitres, le premier est consacré à la synthèse bibliographique, dans laquelle sont mises en revue les notions indispensables à la compréhension de notre travail. Un deuxième chapitre concerne le matériel et la méthodologie adoptée. L'hydro-distillation est la méthode choisie et la plus utilisée pour l'extraction des huiles essentielles à partir des rameaux de *Juniperus thurifera* qui n'a jamais été étudiées jusqu'aujourd'hui. Deux méthodes seront adoptées pour l'évaluation de l'effet antibactérien des huiles essentielles seules et en combinaison avec les antibiotiques qui sont : la méthode de diffusion sur disque et la méthode de micro-dilution. La combinaison des huiles essentielles avec des antibiotiques constitue une piste de recherche innovante et les résultats qui seront obtenus pourraient être intéressants.

Mots - clés: *l'activité antibactérienne, Juniperus thurifera, les antibiotiques, les huiles essentielles, combinaison.*

Abstract

The present work falls within the context of the study of the antibacterial activity of the essential oil of *Juniperus thurifera* and their synergistic effect in combination with antibiotics. This manuscript consists of two chapters, the first is devoted to the bibliographic synthesis, in which are reviewed the concepts essential to the understanding of our work. A second chapter concerns the material and the methodology adopted. Hydrodistillation is the chosen and most widely used method for extracting essential oils from the twigs of *Juniperus thurifera* which has never been studied until today. Two methods will be adopted for the evaluation of the antibacterial effect of essential oils alone and in combination with antibiotics which are: the disk diffusion method and the micro-dilution method. The combination of essential oils with antibiotics constitutes an innovative track of research and the results which will be obtained could be interesting.

Keywords: *antibacterial activity, Juniperus thurifera, antibiotics, essential oils, combination.*

ملخص

يندرج العمل الحالي في سياق دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للزيت العطري المستخلص من *Juniperus thurifera* وتأثيرها التآزري مع المضادات الحيوية. تتكون هذه المخطوطة من فصلين ، الأول مخصص للتركيب الببليوغرافي ، حيث يتم مراجعة المفاهيم الأساسية لفهم عملنا. الفصل الثاني يتعلق بالوسائل والمنهجية المعتمدة. التقطير المائي هو الطريقة المختارة والأكثر استخدام لاستخراج الزيوت الأساسية من أغصان *Juniperus thurifera* والتي لم تتم دراستها حتى اليوم.

سيتم اعتماد طريقتين لتقييم التأثير المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية و حدها وبالاقتران مع المضادات الحيوية وهما : طريقة الانتشار على القرص وطريقة *micro-dilution* يشكل الجمع بين الزيوت الأساسية و المضادات الحيوية مسار مبتكرا للبحث وقد تكون النتائج التي سيتم الحصول عليها مثيرة للاهتمام

الكلمات المفتاحية : النشاط المضاد للبكتيريا ، *Juniperus thurifera* ، المضادات الحيوية ، الزيوت الأساسية، المركبات.

Liste des abréviations

- + DMSO : diméthylsulfoxyde .
- + *J. thurifera* L: *Juniperus thurifera*.
- + UV- visible : ultra violet.
- + ADN : Acide Désoxyribonucléique.
- + ARN : Acide Ribonucléique.
- + S : coefficients de sédimentation .
- + HE : Huile Essentielle.
- + ATB : Antibiotique.
- + AFNOR NF : Association Française de Normalisation
- + ATP ase :enzyme dégrade L ATP.
- + ATP : Adénosine triphosphate.
- + ADP : Adénosine diphosphate.
- + FICI : indice de concentration fractionnelle inhibitrice.
- + CMI : la détermination de la concentration minimale inhibitrice.
- + CMB : la concentration minimale bactéricide.
- + E-test : Epsilomètre.
- + GN : Gélose Nutritive.
- + MH : Mueller Hinton.
- + MHA : agar Mueller Hinton
- + BMH : Bouillon Mueller Hinton.
- + Mc Ferland : Mark Ciardi Ferland.
- + UFC : Unite formant colon
- + CFI : (la concentration fractionnelle inhibitrice).
- + RHE : Rendement en huile essentielle en %.
- + p : probabilité
- + Eab : diamètre de la zone d'inhibition des antibiotiques seules.
- + Ehe : diamètre de la zone d'inhibition des huiles essentielles seules.
- + D : diamètre de disque.
- + ATCC : Amircan Type Culture colle

Table des matières

Remerciements.....	
Dédicace.....	
Résumés.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux.....	
Introduction.....	1

Chapitre I . *Synthèse bibliographique*

I-1- Les antibiotiques	3
I-1-1-Historique.....	3
I-1-2-Définition.....	4
I-1-3- Classification des antibiotiques	4
I-1-4-Mode d'action des antibiotiques	5
I-1-5-Resistance aux antibiotiques.....	6
I-2- Les huiles essentielles.....	6
I-2-1- Définition	6
I-2-2- Répartition et localisation.....	7
I-2-3-Obtention des huiles essentielles.....	8
I-2-4- Composition chimique	11
I-2-5- Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries.....	13
I-3- Combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques.....	14
I-3-1- L'interaction huile essentielle/antibiotique.....	14
I-3-2- Méthodes de détermination l'interaction entre les antibactériens.....	15
I-4- L'espèce étudiée (<i>Juniperusthurifera</i> var. <i>aurasiaca</i>).....	18
I-4-1- Description morphologique.....	18
I-4-1- Systematique.....	18

I-4-3- Répartition géographique.....	19
I-4-4- Les travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de <i>J. thurifera</i> var. <i>aurasiaca</i>	20

Partie expérimentale

Chapitre II. Matériel et méthodes

II-1- Matériel.....	22
II-1-1- Matériel vegetal.....	22
II-1-2- Les souches bactériennes.....	23
II-1-3- Réactifs.....	23
II-1-4- Milieux de culture.....	23
II-1-5- Instruments et Appareillage.....	23
II-2- Méthodes.....	24
II-2-1- L'extraction des huiles essentielles.....	24
II-2-2- L'activité antibactérienne des huiles essentielles seules.....	25
II-2-3- L'association des huiles essentielles avec les antibiotiques.....	27
II-2-4- Analyse statistique.....	28
Conclusion et perspectives.....	29
Références bibliographiques.....	30

Liste des figures

figure 1	Schéma du principe de la technique d'hydro distillation	09
figure 2	Montage pour la distillation à la vapeur d'eau	10
figure 3	Montage pour la hydro diffusion	11
figure 4	Méthode d'extraction assistée par micro-ondes.	12
figure 5	Différentes classes des terpènes.	13
figure 6	Description graphique simplifiée et idéalisée des effets mono et multi-cibles	16
figure 7	Méthode isobogramme pour déterminer l'interaction entre les antimicrobiennes combinées	17
figure 8	Schéma de placement des bandelettes pour le test de synergie E-test	18
figure 9	Aire de répartition de <i>Juniperus thurifera</i> , modifiée.	29
figure 10	Répartition de <i>J. thurifera</i> en Algérie	21
figure 11	l'espèce <i>J. thurifera</i> dans leur milieu naturel par Dr. Zeraib en Avril 2020 à Tizi Kbal Errsas, commune de Thniat Elabed, Batna.	23
figure 12	montage de type Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles	25

Liste des tableaux

Tableau 1	La position systématique de <i>Juniperusthurifera</i> L	19
Tableau 2	Les souches bactériennes choisies pour les tests de l'activité antibactérienne.	24

Introduction

Introduction

Les maladies infectieuses sont responsables de 17 millions de décès dans le monde parmi lesquels 4,3% dans les pays en développement contre 1% dans les pays industrialisés **O.M.S , 2002** Ces maladies deviennent un problème majeur de la santé publique, notamment avec l'augmentation du nombre d'agents pathogènes résistants aux antibiotiques qui se manifestent par une utilisation vaste et inappropriée de ces produits (**Sayout et al., 2020**).

De nombreuses études le plus souvent *in-vitro* se sont intéressées à l'étude de l'association des antibiotiques et des huiles essentielles pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires associés aux médicaments. Ces recherches révèlent une synergie intéressante entre les antibiotiques et les huiles essentielles étudiées (**Laouar & Sifer, 2001**).

Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie pharmaceutique, agronomique, alimentaire, sanitaire, industries cosmétiques et de parfums (**Bakkali et al., 2008**).

Les huiles essentielles du genre *Juniperus*, connues depuis l'antiquité, sont généralement extraites par distillation et sont le résultat d'un mélange complexe et variable de divers composés tels les terpènes et les phénols (**Bertaudière-Montes et Montès, 2004**). Ce genre est composé d'environ 75 espèces, réparties sur trois sections : *Caryocedrus*, *Juniperus* et *Sabina* (**Adams, 2014**), il est le deuxième plus grand genre de conifères en nombre d'espèce après le genre *Pinus* (**Farjon, 2010**). En Algérie, le genre *Juniperus* est représenté par deux sections et cinq espèces; Sect. *Juniperus* (*J. communis* L., *J. oxycedrus* L.), et la section *Sabina* (*J. thurifera* L., *J. phonicea* L., *J. sabina* L.) (**Quézel et Santa, 1962**).

Juniperus thurifera est une espèce endémique de quelques pays riverains de la Méditerranée: Algérie, Maroc, Espagne, France (Corse comprise) et Italie (**Gauquelin et al., 1988**). Classiquement, elle présente deux sous espèces sur la base du nombre de graines par galbule (**Adams, 2014**) , *J. thurifera* subsp. *africana* (Maire) Gauquelin, dont l'aire de répartition se limite au Nord d'Afrique et *J. thurifera* subsp. *thurifera*, qui est présente de manière localisée en Espagne, dans les Pyrénées, dans les Alpes françaises et en Corse.

L'étude génétique menée par **Terrab et al. (2008)**, et la synthèse taxonomique, complétée d'une brève étude morphologique des galbules sur des échantillons d'herbier réalisé par **Véla et Schäfer (2013)**, suivie par une étude chimiosytématique et une analyse statistique multi-variables des constituants des huiles essentielles réalisé par **Zeraïb et al. (2014a)**, concluent à la

distinction souhaitable d'un taxon marocain (var. ou subsp. *africana*) et d'un taxon algérien nommé var. *aurasiaca*.

Selon la recherche bibliographique menée, très peu d'études qui portent sur l'activité biologique des huiles essentielles du taxon Algérien *J. thurifera* var. *aurasiaca*. **Zeraib et al. (2014b)**, ont étudié l'effet antibactérien des huiles essentielles extraites à partir des feuilles de *J. thurifera* vis-à-vis de 14 souches bactériennes. Elles se sont révélées actives contre toutes les souches bactériennes testées à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Les huiles essentielles extraites des individus femelles ont montré une activité bactéricide supérieure à celles des individus mâles. **Boudjedjou et al. (2018)**, se sont intéressés au pouvoir antibactérien des huiles essentielles des galbules seule et en combinaison avec les antibiotiques, contre deux bactéries Gram (-) et deux Gram (+).

Ainsi, nous nous sommes proposé dans ce travail d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites à partir du bois des individus mâles et autres femelles de *J. thurifera* var. *aurasiaca*, seules et en combinaison avec les antibiotiques qui n'ont pas été rapportées jusqu'à présent.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I-1- Les antibiotiques

I-1-1- Historique des antibiotiques

Avant la découverte de la pénicilline qui a permis d'enrayer plusieurs pathologies d'origine bactérienne et de soigner des maladies mortelles (la tuberculose, la syphilis, le tétanos), plusieurs scientifiques ont contribué, grâce à leurs travaux, à l'avènement des antibiotiques. Dans un processus évolutif de la recherche scientifique, le Français Louis Pasteur, biologiste et chimiste, peut être considéré comme l'un des précurseurs de la découverte des substances qui détruisent les bactéries (**Flamarion, 1987**).

Déjà en 1877, en collaboration avec le physicien Jules Joubert, il parvient à démontrer que des micro-organismes ont la possibilité d'inhiber l'activité d'autres micro-organismes ou de combattre certaines pathologies. Ainsi, il met en évidence un antagonisme microbien.

En 1897, le médecin français Ernest Duchesne décrit l'action d'une moisissure (*Penicillium glaucum*) sur plusieurs cultures bactériennes.

En 1928, dans son laboratoire, Alexander Flemming remarque qu'une colonie de *penicillium notatum* avait empêché la prolifération des staphylocoques. Il isole la substance antibactérienne synthétisée par le *penicillium notatum*. La pénicilline, fut le nom qu'il attribua à cette substance. Il découvre l'action antibiotique de cette substance, mais ne parvient pas à la purifier. Deux chercheurs, à savoir Ernest Chain et Howard Florey y parviennent et obtiennent la pénicilline pure en 1939 (**Flamarion, 1987**).

Au cours de cette même année, Gerhard Domark reçoit le prix Nobel de physiologie ou de médecine pour la découverte du sulfamido chrysoïdine qui a un effet sur certaines infections à streptocoque. Il va breveter ce sulfamide actif en 1935 sous le nom de Prontosil, un médicament antibactérien.

En 1944, un autre antibiotique est découvert par Selman Waksman qui obtient le prix Nobel de physiologie ou de médecine en 1952. Il s'agit d'une substance dénommée la streptomycine. Elle inhibe la vie des bactéries.

Après la deuxième guerre mondiale (1939-1945), grâce aux grandes firmes pharmaceutiques, les différents antibiotiques sont commercialisés à grande échelle avec des avancées significatives dans la lutte contre les pathologies infectieuses (**Flamarion, 1987**).

I-1-2- Définition

Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») est une substance naturelle ou semi-synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. De manière simplifiée un antibiotique est, dans le domaine médical, « une molécule chimique organique d'origine naturelle ou synthétique inhibant ou tuant les bactéries pathogènes à faible charge et possédant une toxicité sélective ». Plus globalement, pour les microbiologistes et les chimistes, un antibiotique est une substance antibactérienne (**Bouchaala, 2013**).

I-1-3- Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères: l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action (**Yala et al., 2001**). Dans ce travail nous parlerons sur les plus répandues.

- **La beta lactamine**

Les antibiotiques de cette famille sont bactéricides, dans sa structure, le noyau de base est le cycle β lactame. Les β lactamines agissent au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptido glycane entraînant une lyse bactérienne (**Yala et al., 2001**).

- **Les aminosides ou aminoglycosides**

Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol. Ce sont des antibiotiques rapidement bactéricides. Il existe plusieurs centaines de molécules naturelles et hémi-synthétiques. Ils perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome entraînant la destruction bactérienne. Ils sont bactéricides (**Kudo, 2020**).

- **Les tétracyclines**

Les tétracyclines sont bactériostatiques, elles pénètrent bien dans les cellules, ces molécules présentent une grande homogénéité. Ils inhibent la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30 S du ribosome (**Yala et al., 2001**).

- **Les phenicoles (Chloramphenicol et thiamphenicol)**

Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique à large spectre. Le thiamphénicol est très voisin chimiquement du chloramphénicol, son spectre d'action est similaire. Les deux molécules sont bactériostatiques. Elles agissent au niveau de la sous unité 50 S du ribosome. Ceci a pour conséquence une inhibition de la synthèse des protéines. En Algérie, ces molécules sont réservées aux traitements des fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et dans certains cas de

méningites purulentes à *Hemophilus* et *streptococcus pneumoniae* lorsque des molécules moins toxiques ne sont pas disponibles (Yala *et al.*, 2001).

I-1-4- Mode d'action des antibiotiques

Aujourd'hui, il existe un grand nombre d'antibiotiques dont les modes d'action sont variés. Certains agissent sur la paroi ou la membrane des bactéries provoquant ainsi leur destruction. D'autres vont agir au niveau de la machinerie des bactéries pour bloquer sélectivement leur multiplication et leur survie.

➤ **Action sur la paroi**

Le peptidoglycane c'est l'unité formant de la paroi bactérienne en présence de l'intermédiaire d'enzyme transpeptidase, celui-ci sous l'action des antibiotiques va être empêché leur synthèse et donc celle du peptidoglycane. Après avoir empêché la synthèse du peptidoglycane, la paroi ne peut plus être formée et la bactérie se désorganise. Cela permet d'empêcher la bactérie de former de nouvelles bactéries et peut détruire celles déjà présentes (Campanaud, 2006).

➤ **Action sur la membrane**

Les antibiotiques renferment des caractères dites surfactants (molécule amphiphile permet de diminuer la tension de surface entre 2 phases) permet aux antibiotiques de s'insérer parmi les phospholipides externes. Cela conduit à une perturbation de la perméabilité membranaire avec une augmentation anormale, ce qui permet une diffusion de substances hydrosolubles à l'extérieur de la bactérie qui se détruira (Campanaud, 2006).

➤ **Action sur l'ADN**

Certains antibiotiques agissent directement au niveau de l'ADN pour empêcher leur division, leur prolifération et empêcher la formation de l'ADN polymérase. Cela entraîne une inhibition de la réplication de l'ADN ce qui est indispensable à la formation de nouvelles bactéries. Les fluoroquinolones agissent suivant ce mode d'action (Campanaud, 2006).

➤ **Action sur la synthèse protéique**

L'antibiotique réagit avec la synthèse protéique de la bactérie en s'attaquant aux ribosomes. Ce sont des complexes constitués de protéines et d'ADN ribosomique présents dans les cellules eucaryotes et les cellules bactériennes. Ils permettent de produire les protéines à partir de la lecture de l'ARN messager. Les ribosomes bactériens ont des coefficients de sédimentation 70S durant la traduction de l'ARN messager, qui sont composés de deux sous-unités de 30S et

50S. Les aminosides et les macrolides agissent suivant ce mode d'action. Les aminosides peuvent se fixer sur les deux sous unités 30S et 50S. Les macrolides se fixent sur la sous unité 50S. Ces antibiotiques s'attaquent aux ribosomes bactériens ce qui permet d'empêcher la formation de nouvelles protéines (**Campanaud, 2006**).

I-1-5- Résistances aux antibiotiques

Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques via différents mécanismes (**Turkmen et al., 2006**). Considéré comme facteur compliquant l'action de ces antibiotiques, il existe 3 modes: soit par la modification de la cible de l'antibiotique, l'inactivation enzymatique (l'antibiotique est modifié par la production d'une enzyme bactérienne et ne reconnaît plus sa cible), ou bien l'imperméabilité; c'est la diminution de la pénétration et l'efflux actif par des pompes plus ou moins spécifiques (**Georgantelis et al., 2007**). Cette résistance peut être naturelle ou acquise. Elle est naturelle quand elle existe pour les souches sauvages appartenant à la descendance (**Andreu, 2003**) par ailleurs une souche sensible peut acquérir une résistance à un ou plusieurs antibiotique, soit par mutation ou bien divers transferts génétique (**Horvath et al., 2002**).

La résistance bactérienne développée par rapport aux antibiotiques a incité les chercheurs à penser à étudier l'efficacité des nouveaux agents antimicrobiens, tels que les huiles essentielles et les extraits de plantes (**Salam et Quave, 2018**). Ces produits, comme agents antimicrobiens, sont des produits naturels plus sécurisés pour les consommateurs par rapport à la toxicité et à la résistance développée par les microorganismes pathogènes. Compte-tenu de la variabilité de la composition des huiles essentielles, leur activité antibactérienne est attribuée à la combinaison de plusieurs modes d'action (**Burt, 2004 ; Salam & Quave, 2018**).

I-2- Les huiles essentielles

I-2-1- Définition

Le terme "huiles" s'explique par la propriété que présente ces 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 (**Bruneton, 2009**).

Les huiles essentielles sont des produits huileux, odoriférants et volatils, synthétisés et stockés dans les différents organes des végétaux (**Bruneton, 2009**).

La norme AFNOR NF T 75-006 définit l'huile essentielle comme étant « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydro-distillation. L'huile essentielle est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

Le terme « huile essentielle » est strictement réservé au produit aromatique issu de la distillation, compte tenu du fait, comme nous le verrons ci-après que les autres techniques d'extraction ne permettent pas d'obtenir l'huile essentielle en tant que telle. Avant son extraction, lorsqu'elle se trouve dans la plante, l'huile essentielle est appelée essence (**Hay, 2015**).

L'odeur et la volatilité des essences constituent un moyen de défense contre les prédateurs (micro-organisme, champignons, bactéries, animaux herbivores). Elles peuvent également participer à l'attraction des insectes pollinisateurs (**Theis et Lerdau, 2003**).

I-2-2- Répartition et localisation

Parmi les espèces végétales (800 000 à 1 500 000 selon les botanistes) 10% seulement sont dites "aromatiques" (**Fernandez, 2003**). Il y aurait 17500 espèces aromatiques (**Lawrence, 1995**), distribuées sur 60 familles (**Raut et Karuppaiyil, 2014**). Les genres capables d'élaborer les huiles essentielles sont répartis dans nombre limité de familles, par exemples: *Apiaceae*, *Alliaceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Cupressaceae*, *Poaceae*, *Piperaceae* (**Bruneton, 2009**).

Les huiles essentielles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices (**Francois, 2002**), et leurs accumulation généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, souvent situées sur ou à proximité de la surface des tissus des plantes. IL existe trois type de structure sécrétrice dans la plante : poils sécréteurs des *Lamiaceae* (**Svobodak, 2003**), poches sécrétrices des *Myrtaceae* ou des *Rutaceae*, et les canaux sécréteurs des *Apiaceae* ou des *Asteraceae* (**Bruneton, 2009; Guignard, 2000**).

Elles peuvent être stockées dans divers organes végétaux : Les fleurs (rose), les feuilles (citronnelle, eucalyptus), les sommités fleuries (lavande), les racines (vetiver), les rhizomes (gingembre), les fruits (ainsi), le bois (bois de rose) ou les graines (muscade) (**Horvath et al., 2002**).

I-2-3- Obtention des huiles essentielles

- **Hydro distillation simple:**

Cette méthode est la plus simple et de ce fait la plus anciennement utilisée, elle se produit dans l'appareil de Clevenger et consiste à immerger directement matériel végétal à traiter dans un alambic rempli d'eau, placé sur une source de chaleur. Les vapeurs hétérogènes sont condensées dans un réfrigérant et l'HE se sépare de l'hydrolysât par simple différence de densité, elle surnage au-dessus de l'hydrolysât (**figure 1**). Cependant, un chauffage prolongé et trop puissant engendre la dégradation de certaines molécules aromatiques (**Lucchesi, 2005**).

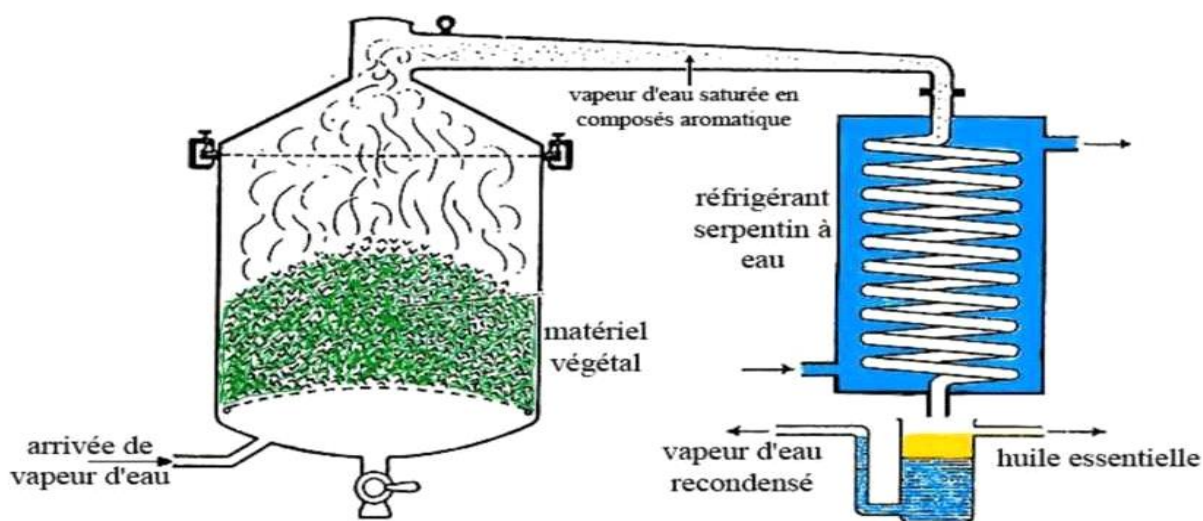
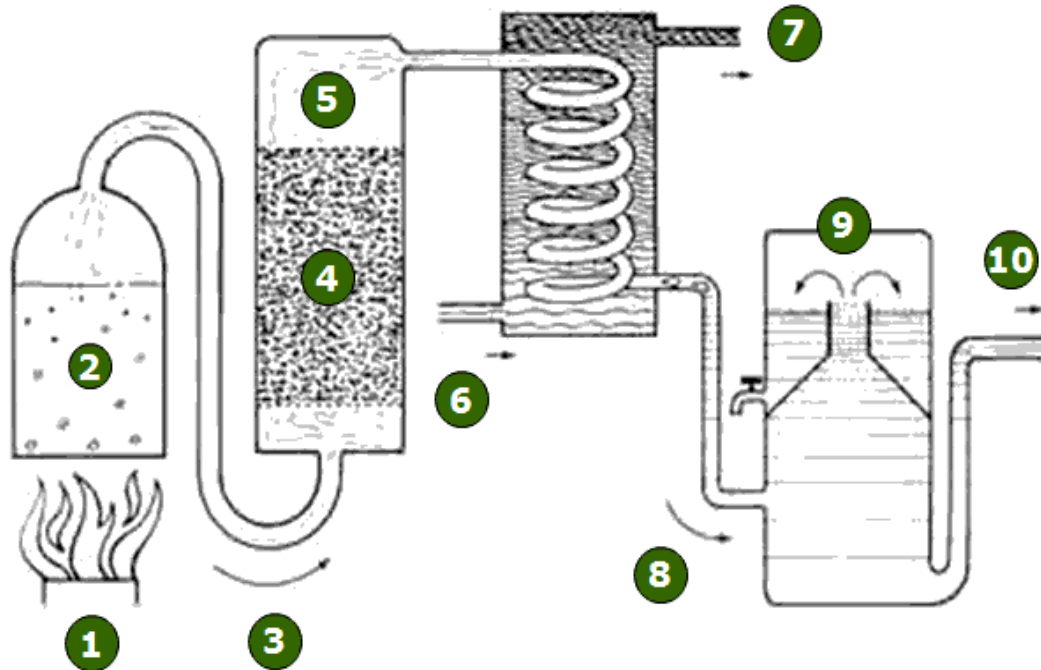


Figure 1: Schéma du principe de la technique d'hydrodistillation

- **Distillation par entraînement à la vapeur d'eau**

La distillation par entraînement à la vapeur d'eau est un procédé d'extraction parmi les plus anciens, le matériel végétal est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau, ce dernier détruit la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules contenues et entraîne les plus volatiles (**Lucchesi, 2005**). La vapeur chargée de l'essence de la matière distillée se condense dans le serpentin de l'alambic avant d'être récupérée dans un essencier (vase

de décantation). Les parties insolubles dans l'eau de condensation sont décantées pour donner l'huile essentielle. Le schéma ci-dessous décrit le processus.



1: Feu
2: Eau
3: Vapeur
4: Plante aromatique
5: Vapeur + huile essentielle

6: Eau froide
7: Eau chaude
8: Eau + huile essentielle
9: Huile essentielle
10: Hydrolat

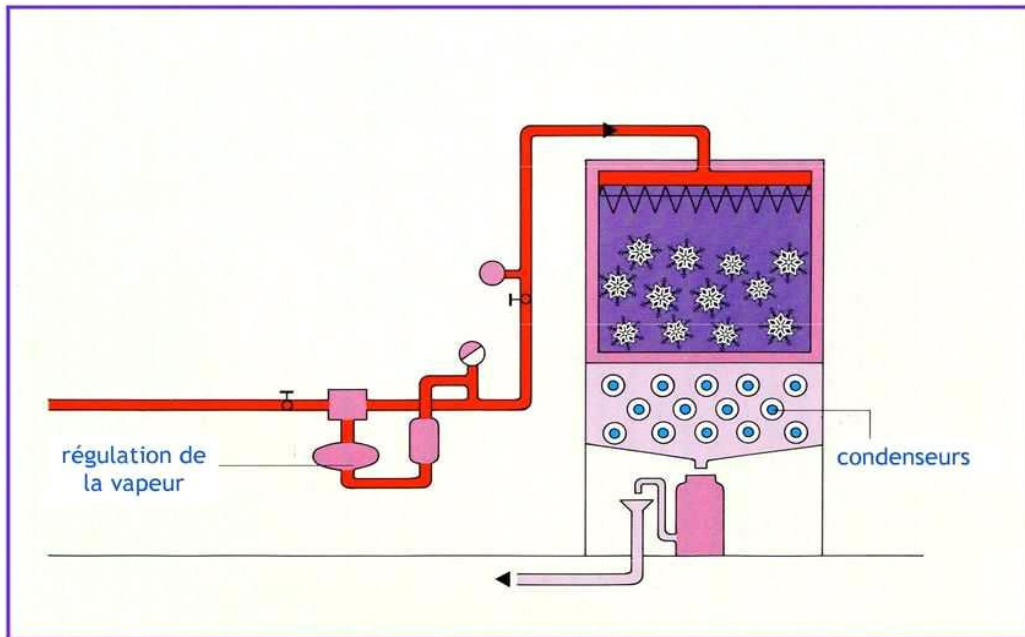
Figure 2: Montage pour la distillation à la vapeur d'eau.

▪ Hydro - diffusion

L'hydro-diffusion (**Figure 3**), elle consiste à extraire l'huile essentielle avec de la vapeur d'eau traversant la matière végétale, à l'échelle du laboratoire nous faisons bouillir quelques litres d'eau, et la vapeur remonte dans une colonne contenant la plante plus ou moins finement broyée. La vapeur est ensuite dirigée vers un condensateur, et le liquide est récolté dans une burette graduée. Grâce à un tuyau en coude à la base de la burette, l'hydrolat s'écoule dans le béccher à gauche, alors que l'huile essentielle s'accumule dans la burette graduée. Cette technique a l'avantage de permettre de récupérer l'hydrolat, Elle permet aussi de faire des extractions sur de

plus grandes quantités de plantes, et c'est une méthode plus rapide et moins endommageable pour les composés volatils (Lucchesi, 2005).

Hydrodiffusion



9

Figure 3: Montage pour la hydro - diffusion.

- **Extraction assistée par micro-ondes**

Extraction assistée par micro-ondes est une nouvelle technique développée par **Stashenko et al.(2004a, b)**, qui s'effectue par de micro-ondes et d'autre méthodes traditionnelles. Consiste à placer une partie du montage d'hydro distillation dans le four à micro-ondes (**Figure4**).

La matière végétale est donc chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle, à l'aide des procédés classiques (condensation, refroidissement et décantation). Cette technique possède plusieurs avantages tels que le gain de temps d'extraction, utilisation de petites quantités de solvant, et un rendement d'extraction élevé (**Hemwimon et al., 2007**).

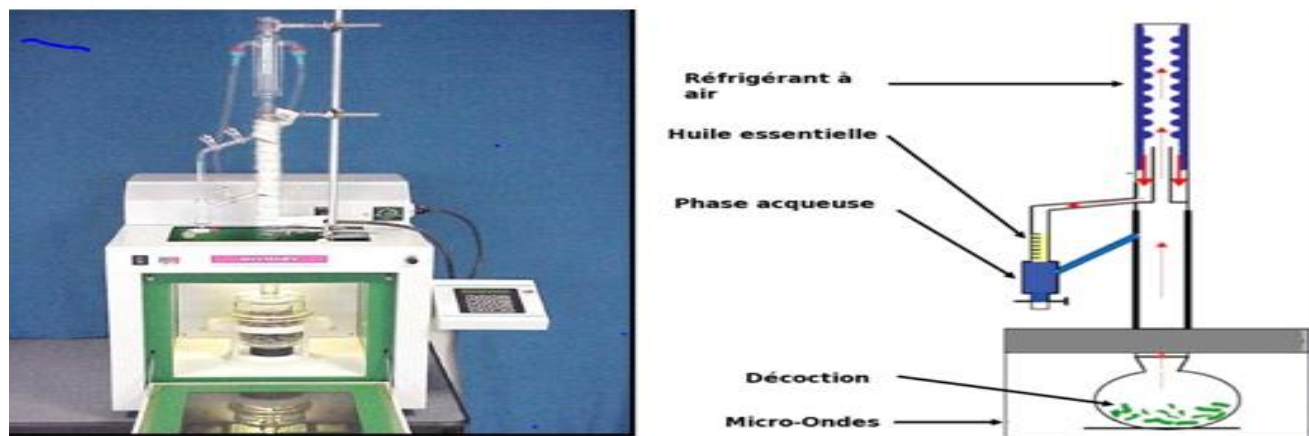


Figure 4: Méthode d'extraction assistée par micro-ondes.

▪ Extraction à froid

Les huiles essentielles de fruits d'agrumes sont des produits fragiles en raison de leur composition en terpènes et aldéhydes. C'est pourquoi, spécifiquement pour cette catégorie de matière première, est utilisé un procédé totalement différent d'une distillation classique qui est l'expression à froid (**Lucchessi, 2005**).

Le principe de cette technique est basé sur la rupture des parois des sacs oléifères contenues dans l'écorce des fruits; cette essence est ensuite entraînée par un courant d'eau froide. L'émulsion d'essence et d'eau isolée par décantation ou centrifugation. (**Ferhat et al., 2007**)

I-2-4- Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges variables et complexes de différents composés chimiques, dissous l'un dans l'autre, formant des solutions homogènes. Les principaux constituants des HEs appartiennent de façon exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (**Bakkali et al., 2008**).

❖ Terpènes

Il s'agit d'une classe d'hydrocarbures répondant à la formule générale $(C_5H_8)_n$, relativement simples et très abondantes ce qui rend leur disponibilité assez aisée (**Breitmaier, 2006**). Ils sont

également nommés isoprénoïdes ou terpénoïdes. Le terme "terpénoïde" définit l'ensemble des terpènes oxygénés et non oxygénés, alors que le terme "terpène" ne tient pas compte de la présence d'oxygène (Baser *et* Buchbauer, 2010).

❖ Monoterpènes

Sont les molécules les plus représentatives, constituant 90% des HE et permettent une grande variété de structure, ils sont formés par le couplage de deux unités isopréniques (C₁₀H₁₆). Ces composés peuvent être: monoterpènes acycliques (myrcène, ocimène), monoterpènes monocycliques ou monoterpènes bicycliques (pinènes, camphène, sabinène) (figure 5)(Bakkali *et al.*, 2008).

❖ Sesquiterpènes

Ils sont formés par l'assemblage de trois unités isopréniques (C₁₅H₂₄), l'extension de la chaîne augmente le nombre de cyclisation qui permet une grande variété de structure (figure 5)(Bakkali *et al.*, 2008). Cette classe chimique contiennent plus de 3000 molécules comme par exemple: Humulène, farnésol ,...(Brunton, 2009).

❖ Diterpènes

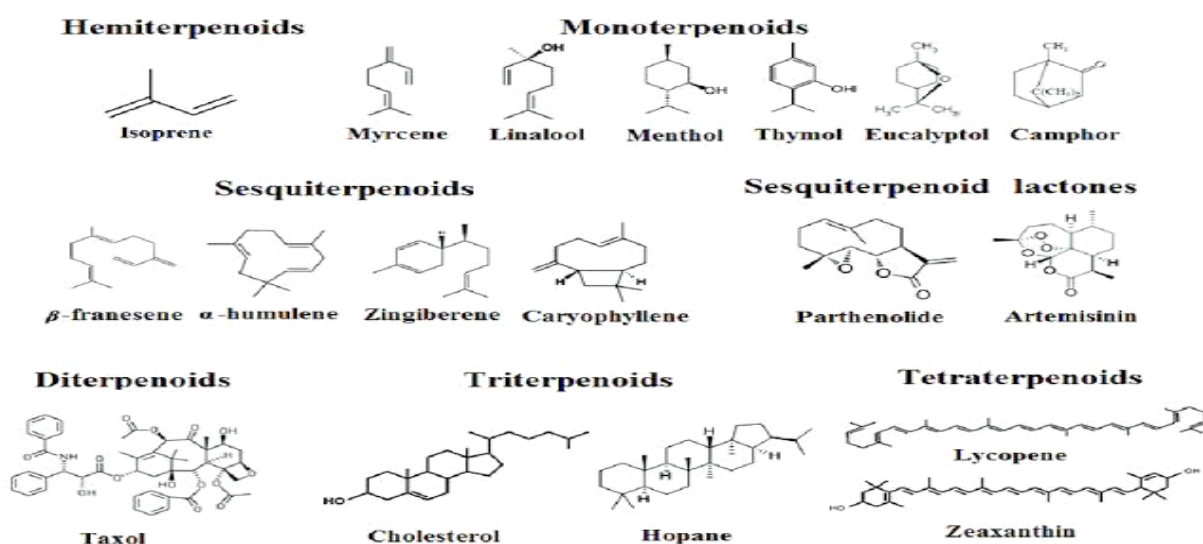


Figure 5: Différentes classes des terpènes.

❖ Composés aromatiques

Une autre classe de composés qui sont beaucoup moins fréquents que les monoterpènes et les sesquiterpènes. Il s'agit des dérivés du phénylpropane (C5-C3). Les composés de cette série représentent un mélange de différents aldéhydes, cétones, alcools, esters et autres, leurs conférant un goût et une odeur caractéristique (**Bassou, 2007**).

❖ Composés d'origines diverses

De faibles quantités de produits résultant de la transformation de molécules non volatiles généralement de faible masse moléculaire, acycliques non terpéniques peuvent se retrouver dans certaines huiles essentielles (alcools, aldéhydes, cétones, ...etc) (**Bassou, 2007**).

I-2-5- Mode d'action des huiles essentielles sur les bactéries

L'activité antimicrobienne des HEs ne soit pas attribuable à un mécanisme unique, du fait de la variabilité des quantités et des profils des composants des HEs. D'une autre part l'action des HEs dépend aussi de la nature des microorganismes ciblés, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'action des HEs, par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cela peut être expliqué par la présence de la membrane externe chez les bactéries à Gram positif, elle représente en effet une barrière capable de diminuer la perméabilité des composés hydrophobes (**Calsamiglia et al., 2007**). Cependant, les molécules à faible poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent traverser cette barrière (**Ultee et al., 1999; Dorman et al., 2000**).

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques des composants actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne. Cela peut induire un changement de conformation de la membrane, une perturbation chémo-osmotique et une fuite d'ions (K⁺) (**Cox et al., 2000**).

Certains composés phénoliques des huiles essentielles interfèrent avec les protéines de la membrane des micro-organismes comme l'enzyme ATPase, soit par action directe sur la partie hydrophobe de la protéine, soit en interférant dans la translocation des protons dans la membrane prévenant la phosphorylation de l'ADP (**Pavel et al., 2009**).

I-3- Combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques

I-3-1- L'interaction huile essentielle/antibiotique

La combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques peut donner un effet synergique, additif ou antagoniste :

- **Effet additif**

Une interaction entre antimicrobiens est additive lorsque l'effet combiné est égal à la somme des substances individuelles (**Bhat et Ahangar, 2007**). L'effet additif est parfois appelé indifférence car il n'y a pas d'interaction entre les antimicrobiens testés (**White et al., 1996**), il résulte quand les antimicrobiens combinés ont la même cible, et ne présentent aucune compétition entre eux (**Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009**).

- **Effet antagoniste**

Lorsque l'effet combiné est inférieur à celui de la somme des substances individuelles, on parle d'antagonisme (**Bhat et Ahangar, 2007**). Il résulte quand les antimicrobiens combinés sont en compétition sur la même cible, ou l'un des combinés agit sur l'autre en modifiant sa structure (**Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009**).

- **Effet synergique**

Un effet est dit synergique lorsque l'effet combiné est supérieur à la somme des effets des deux substances individuelles (**Bhat et Ahangar, 2007**). Il résulte généralement quand les antimicrobiens combinés ont des cibles différentes (**Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009**).

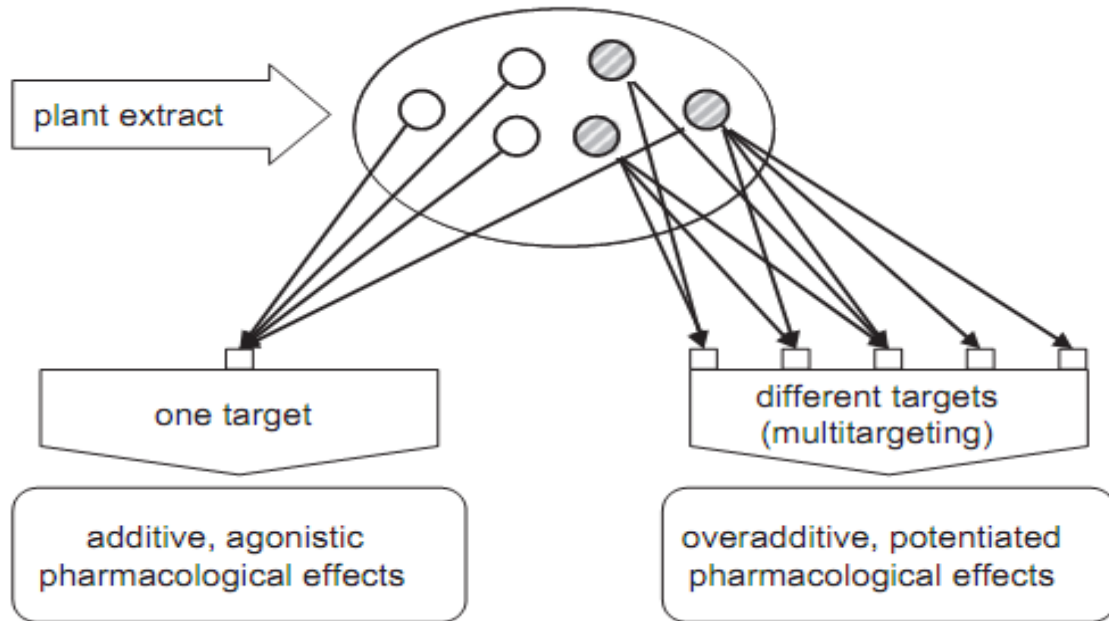


Figure 6: Description graphique simplifiée et idéalisée des effets mono et multi-cibles (Wagner et Ulrich-Merzenich, 2009)

I-3-2- Méthodes de détermination l'interaction entre les antibactériens

➤ Méthode de Checkerboard (en damier)

La technique *in-vitro* la plus courante pour tester la synergie entre les substances antimicrobiennes est la technique du damier, ainsi appelée parce que les concentrations d'une substance sont disposées horizontalement et l'autre verticalement dans une plaque à micro-puits. Les dilutions testées sont basées sur la concentration minimale inhibitrice des substances, généralement allant de quelques étapes en dessous de la CMI attendue, à des concentrations deux fois la CMI attendue (Langeveld *et al.*, 2013).

Les résultats du test en damier sont interprétés en traçant un isobogramme (figure 7) ou en calculant l'indice de concentration fractionnelle inhibitrice pour les deux antimicrobiens.

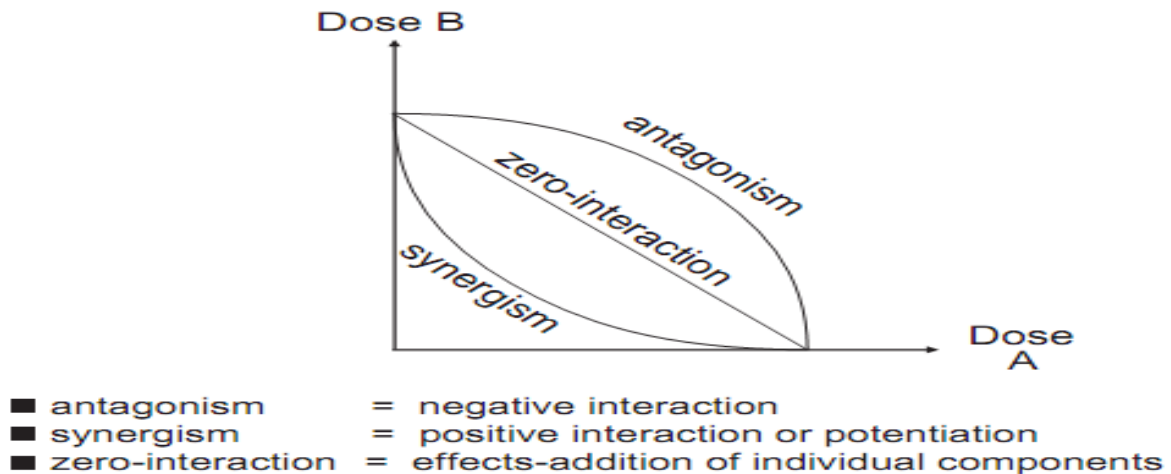


Figure 7: Méthode isobogramme pour déterminer l'interaction entre les antimicrobiens combinés (Wagner *et Ulrich-Merzenich*, 2009).

➤ La méthode de Time-Kill

Elle consiste à mesurer le nombre de bactéries viables présentes dans un milieu liquide en présence d'une combinaison particulière d'antibactériens à différents moments. Bien que les courbes time-kill ne soient pas largement utilisées pour étudier les interactions antibactériennes. En raison du fait que les colonies microbiennes doivent être comptées à de nombreux moments dans le temps, la courbe de mortalité temporelle demande beaucoup de travail et limite le nombre de concentrations et de combinaisons qui peuvent être testées (White *et al.*, 1996 ; Pillai *et al.*, 2005 ; Langeveld *et al.*, 2013).

➤ E-test

L'E-test est une technique de diffusion en milieu gélosé permettant de mesurer la concentration minimale inhibitrice d'un antibiotique en utilisant des bandelettes recouvertes d'un gradient continu d'un antibiotique. E-test est rapide, facile à réaliser, utile pour guider l'antibiothérapie en déterminant la sensibilité des germes aux antibiotiques, détectant les mécanismes de résistance, les synergies ou les antagonismes entre deux antibiotiques. Cette technique apparaît comme une excellente alternative à la méthode de référence pour la mesure quantitative de la sensibilité aux antibiotiques (Jolyguillou, 2006).

Les bandes sont placées à 90 ° l'une de l'autre sur une plaque de gélose ensemencée préalablement, se croisant au niveau des CMI respectives des antimicrobiens individuels. L'endroit où les deux zones d'inhibition se croisent est la valeur prise pour la CMI de la combinaison (**White et al., 1996**)(figure 8). Si les composés interagissent de manière synergique, la croissance bactérienne dans le quadrant inférieur droit sera inhibée et s'ils s'opposent les uns les autres, la croissance sera inhibée dans le quadrant supérieur gauche (**figure 8**). Les mesures ne sont souvent effectuées qu'à un moment donné et donnent donc une vue statique de l'interaction antibactérienne. Le test E étudie l'inhibition de la croissance, alors que dans le test time-kill, la mort bactérienne peut être l'un des paramètres étudiés (**Pillai et al.,2005**).

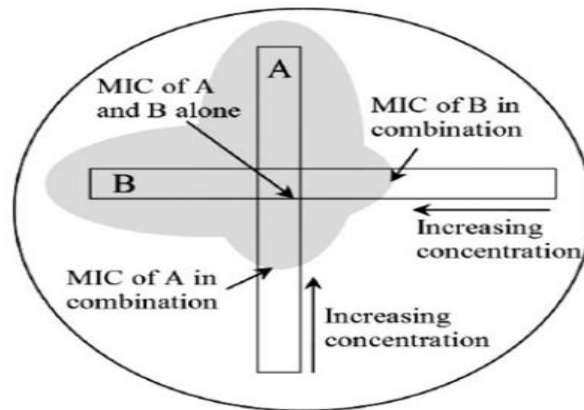


Figure 8: Schéma de placement des bandelettes pour le test de synergie E-test (**White et al., 1996**).

➤ **La méthode de diffusion sur disque**

Dans ce test, les disques des antibiotiques sont imprégnés par l'huile essentielle. Les données de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et les antibiotiques seules et en combinaison sont soumises à une analyse de la variance à un seul facteur (**Boudjedjou et al., 2018 ;2019**).

L'effet est synergique, si l'effet antibactérien de l'association des antimicrobiens est supérieur significativement ($p < 0.05$) à la somme de leurs effets pris séparément. Tandis qu'il est Antagoniste si l'effet antibactérien de l'association des antimicrobiens est inférieur significativement à la somme de leurs effets pris séparément. Si l'effet antibactérien de

l'association des antimicrobiens est égal ($p > 0.05$) à la somme de leurs effets pris séparément, alors l'effet de l'interaction est additif (Semeniuc *et al.*, 2017)

I-4- L'espèce étudiée (*Juniperus thurifera* var. *aurasiaca*)

I-4-1- Description morphologique

Le genévrier thurifère (*Juniperusthurifera* L.) (Nom commun "berbère": Aywel; Thazenzna), est un arbre ou arbuste dioïque, bien que la présence de quelques individus monoïques ait été mentionnée dans les Alpes françaises et en Corse (Conrad, 1986) de même en Espagne, au Maroc dans le Haut Atlas (Badri, 2003), et en Algérie (les Aurès) (Zeraib, 2016). Il possède un port très variable, il peut atteindre 20 mètres de hauteur, avec un tronc très ramifié montrant une structure multicaule. Les feuilles en écailles, entières ou faiblement denticulées, à dos plus ou moins caréné, A l'état juvénile, les feuilles ne sont pas sous forme d'écailles mais de petites feuilles en alènes (formes de jeunesse), semblables à celles du genévrier oxycèdre ou commun (Bertaudière, 1999 ; Badri, 2003). Les cônes femelles (galbules) sont charnus, de couleur noir bleuâtre, et contiennent 2 à 4 graines suivant la variété (Gauquelin *et al.*,1988).

I-4-2- Systématique

La classification botanique de l'espèce *J. thurifera* est résumée ci-dessous.

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Pracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Sous-embranchement	<i>Gymnospermes</i>
Division	<i>Pinophyta</i>
Classe	<i>Pinopsida</i>
Ordre	<i>Pinales</i>
Famille	<i>Cupressaceae</i>
Sous-famille	<i>Cupressoideae</i>
Genre	<i>Juniperus</i> L.
Section	<i>Sabina</i>
Espèce	<i>Juniperusthurifera</i> L.

Variété ou sous espèce ? *Aurasiaca*

I-4-3- Répartition géographique

○ Dans le monde

Le Genévrier thurifère est une espèce oroméditerranéenne, qui se rencontre en Espagne, en France, au Maroc, en Algérie et en Italie (**Figure 9**)(Adams, 2014).

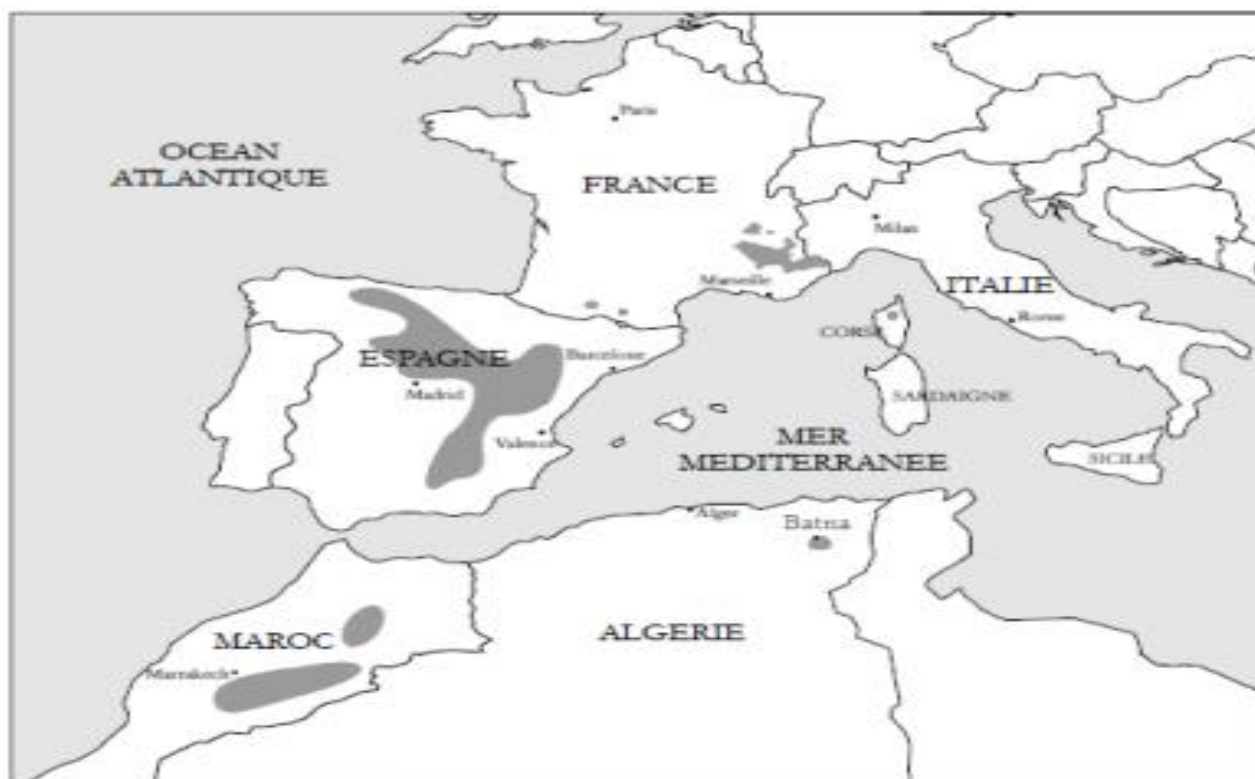


Figure 9: Aire de répartition de *Juniperus thurifera* (Montès, 1999), modifiée.

○ En Algérie

En Algérie, *J. thurifera* se rencontre dans le massif de l'Aurès, sous forme de peuplements très ouverts, dégradés et paraissant relictuels (Tamagoult, 1988). La thurifère dans les Aurès est distribuée en 3 blocs d'inégale importance: le premier est situé dans la région de T'kout, le second, dans la vallée de l'Ouled Abdi alors que le troisième est localisé dans le lieu dit Tibhirine (figure 10) (Beghami, 2013).

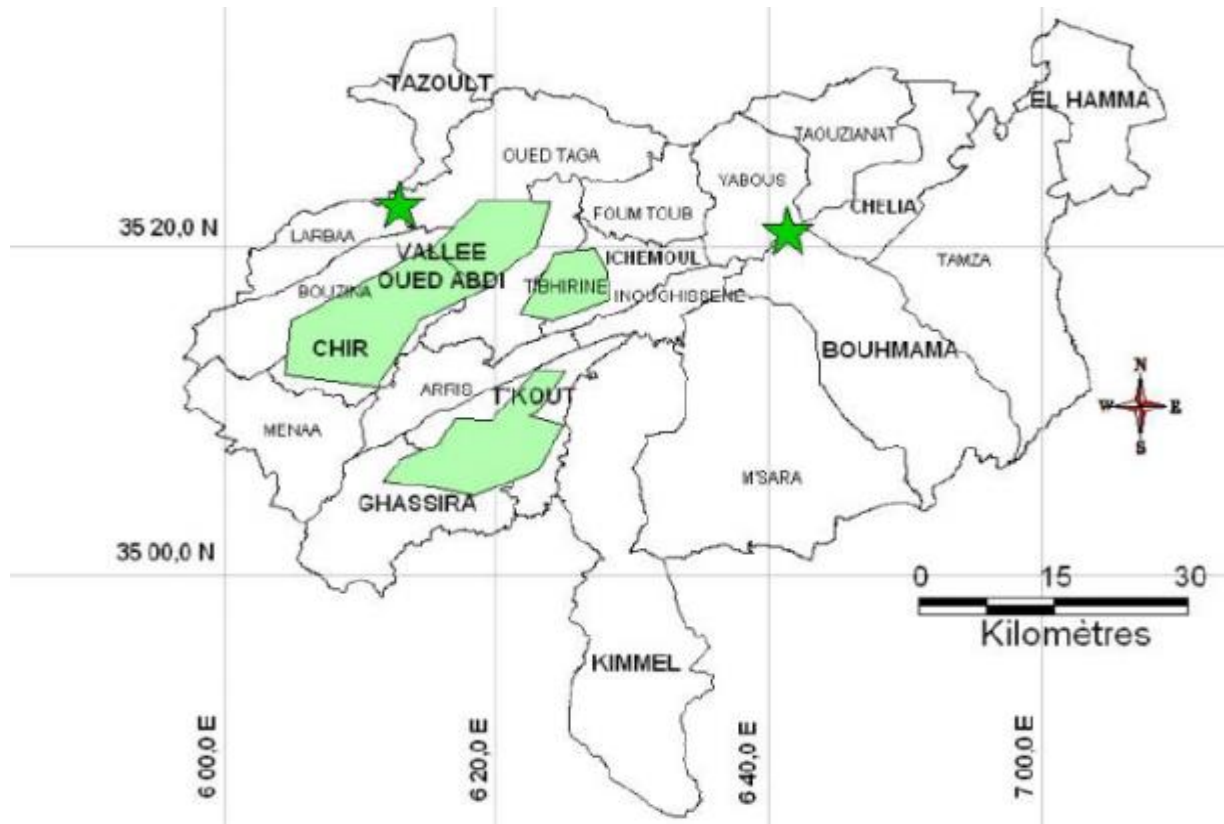


Figure 10: Répartition de *J. thurifera* en Algérie (Beghami, 2013).

I-4-4- Les travaux antérieurs sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *J. thurifera* var. *aurasiaca*

Les travaux focalisés sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles du taxon Algérien sont très rares, il y a uniquement deux Articles (Zeraïb *et al.*, 2014b ; Boudjedou *et al.*, 2018).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites à partir des feuilles des individus mâles et autres femelles de *Juniperus thurifera* var. *aurasiaca* a été testée par Zeraïb *et al.* (2014b) contre 14 souches bactériennes. Les huiles testées ont inhibées la croissance de la majorité des souches bactériennes, en produisant un diamètre de zone d'inhibition allant de 6 mm à 17 mm. La zone d'inhibition maximale a été enregistrée contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (17 mm) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (16 mm). Par contre la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est résistante aux deux huiles testées. Les huiles essentielles extraites des individus femelles ont montré une activité bactéricide supérieure à celles des individus mâles.

(Boudjedjou *et al.*, 2018 ; Adem, 2020). ont étudié l'effet antibactérien des huiles essentielles extraites du galbules de *J. thuriferavar. aursiaca*, seules et en combinaison avec trois antibiotiques conventionnels. L'huile essentielle étudiée (seule ou en association avec des antibiotiques) a montré une activité significative contre presque toutes les souches bactériennes testées. Des effets synergiques, additifs et antagonistes ont été observés en combinant les huiles essentielles avec les antibiotiques.

Cependant, des études supplémentaires devraient être menées sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de cette espèce en utilisant d'autres souches bactériennes et des huiles extraites d'autres organes végétales.

Chapitre II

Matériel et Méthodes

II-1- Matériel

II-1-1- Matériel végétal

Le matériel végétal qu'on va utiliser dans cette étude est constitué des rameaux récoltés à partir des individus mâles et autres femelles de l'espèce *Juniperus thurifera* (**figure 11**), durant le printemps. Dans cette période, les individus mâles seront en phase de floraison tandis que les femelles en différentes phases (floraison, fructification), on prend uniquement les individus qui portent les fruits.



Figure 11: l'espèce *J. thurifera* dans leur milieu naturel.

par Dr. Zeraïb en Avril 2020 à Tizi Kbal Errsas, commune de Thniat Elabed, Batna.

Le matériel végétal sera récolté de l'une des régions de l'aire de leur répartition dans les Aurès (**figure 10**, page 21). Après la récolte et l'identification, le matériel végétal sera nettoyé des impuretés, et séchés à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 jours, puis on le conservera dans des sachets en papier pour servir à l'extraction de l'huile essentielle.

II-1-2- Les souches bactériennes

Les souches bactériennes choisies dans cette étude sont illustrées dans le **tableau 2**:

Tableau 2: les souches bactériennes choisies pour les tests de l'activité antibactérienne.

Souches	Gram	Référence	Famille
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	<i>Staphylococcaceae</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positif	ATCC 25922	<i>Listeriaceae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC27853	<i>Pseudomonadaceae</i>
<i>Escherichiacoli</i>	Négatif	ATCC 25922	Enterobacteriaceae

II-1-3- Réactifs

Plusieurs réactifs et solvants sont nécessaires pour réaliser nos expériences, parmi ces produits: Eau physiologique, Eau distillée, les Antibiotiques (sous forme de disques et de poudre), Eau de Javel, di-méthyl-sulfoxyde (DMSO),

II-1-4- Milieux de culture

Trois milieux de culture seront utilisés:

Gélose nutritive pour réactiver les souches bactériennes. On peut préparer ce milieu en ajoutant une quantité de 14g GN sous forme déshydratée dans un volume de 500 ml l'eau distillé avec une agitation.

Gélose de Mueller-Hinton c'est le seul milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne et qui comporte des ions favorisant une bonne diffusion des antibiotiques. Le (MHA) pour l'étude de la sensibilité des bactéries aux huiles essentielles et aux antibiotiques par la méthode de diffusion sur disque. Le bouillon Mueller-Hinton (BMH) pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) par la méthode de micro-dilution en milieu liquide.

II-1-5- Instruments et Appareillage

Le test de l'effet antibactérienne des extraits des plantes ou d'antibiotique nécessite des instruments et appareillage tel que : Tubes à essai, Anse de platine, Bec bunsen, Boîtes de pétri, microplaques, Ecouvillons, Micropipette, Pince, Autoclave, Etuve électrique à 37°C, Réfrigérateur, Bain Mari, Vortex, disques en papier de 6mm de diamètre, les embouts, Spectrophotométrie UV- visible, Plaque chauffante.

II-2- Méthodes

II-2-1- L'extraction des huiles essentielles

La méthode adoptée pour l'extraction des huiles essentielles à partir des rameaux de *J. thurifera*, est celle de l'hydro distillation simple (en contact direct avec l'eau), sur un montage de type «Clevenger (1928)» (**figure 12**).

A chaque extraction, une quantité d'environ 100 g des Rameaux coupés en petits morceaux (environ 0,5 cm) est introduite dans un ballon contenant 1 L d'eau distillée, l'ensemble est porté à ébullition. Les huiles essentielles sont entraînées à la vapeur d'eau. Les vapeurs chargées d'huiles essentielles passent à travers le tube vertical, puis dans le réfrigérant où aura lieu la condensation.

Le procédé d'extraction est répété plusieurs fois pour permettre de récupérer une quantité suffisante en huile essentielle.

Selon la norme **AFNOR (1986)**, le rendement en huile essentielle est le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE} = \frac{m}{M} \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en %

m : Masse d'huile essentielle en gramme ;

M : Masse de la plante en gramme.

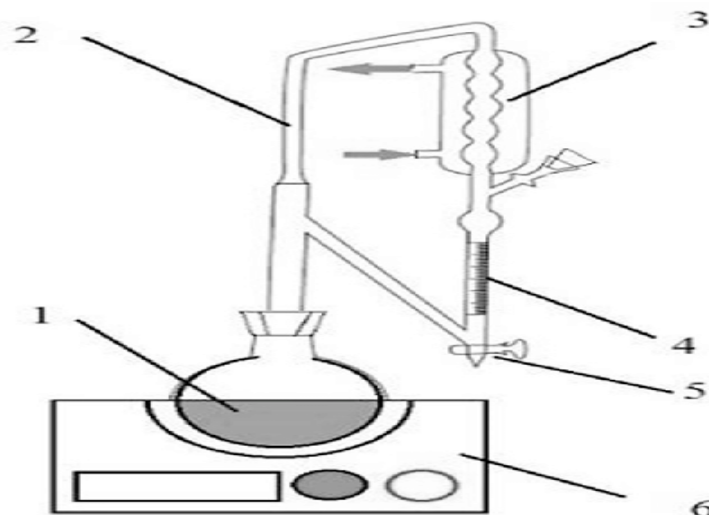


Figure 12: montage de type Clevenger pour l'extraction des huiles essentielles

1, le matériel végétale dans l'eau distillée ; 2, Clevenger; 3, réfrigérant à eau ; 4, tube de collecte des huiles essentielle ; 5, robinet ; 6, chauffe ballon.

II-2-2- L'activité antibactérienne des huiles essentielles seules

Deux méthodes sont adoptées pour évaluer l'effet antibactérien des huiles essentielles extraites à partir les rameaux de *J. thurifera* var. *aurasiaca* :

II-2-2-1- Méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme)

Cette méthode est basée sur la diffusion de l'huile essentielle testée dans la gélose .Elle est appelée aromatogramme par référence à l'antibiogramme, la seule différence c'est que l'antibiotique est remplacé par les huiles essentielles. Dans notre travail, on va l'appliquer en suivant celle décrite par **Boonyanugomol et al. (2017)**.

+ Préparation des disques

On peut préparer les disques à partir du papier Wattman n°1, en le découpant en disques de 6 mm de diamètre. Ensuite, ces disques seront placés dans un tube à vis pour la stérilisation à 120°C pendant 20 min par autoclavage.

+ Préparation de la suspension bactérienne

L'activité antibactérienne doit être réalisée sur des souches jeunes en phase de croissance exponentielle. À cet égard, la réactivation des cultures peut être effectuée par repiquage sur une surface pré coulée de la gélose nutritive à 37C° pendant 18 à 24h.

La préparation de l'inoculum se faite en ajoutant 4 à 5 colonies bien isolées dans une petite quantité d'eau physiologique stérile, après homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex, la turbidité de la suspension d'inoculum doit être identique à celle de la solution 0.5 Mc Ferland préalablement préparée, ce qui correspond à une concentration de 10⁷ à 10⁸ UFC/ml.

+ Ensemencement

L'ensemencement se fait à l'aide d'un écouvillon stérile chargé par une suspension bactérienne avec une turbidité de 0,5 Mc Ferland, sur une surface de gélose Muller-Hinton couler et solidifier préalablement dans des boites de Pétri. L'écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne puis essoré en le pressant fermement sur la paroi interne du tube afin de décharger au maximum. L'opération est répétée trois fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois et en passant sur la périphérie de la gélose (**Benzeggouta,2005**).

+ Dépôt des disques

On dépose les disques imprégnés de 10 μ L d'huile essentielle à l'aide d'une pince flambée au Bec Bunsen sur la surface des milieux gélosés de Mueller-Hinton précédemment ensemencés par les bactéries testées. On laisse les boîtes d'abord à une température ambiante pendant 20 min pour assurer une bonne diffusion. Ensuite, incubée à 37°C pendant 24 heures pour la lecture.

La lecture

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm selon la fourchette proposée par **Ponce et al. (2003)** comme suit:

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre compris entre 9 à 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19mm.
- Extrêmement sensible (+++) diamètre > 20 mm.

II-2-2-2-La méthode de Micro-dilution en milieu liquide

Cette méthode peut être utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI). Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentrations décroissantes des produits tests. Après incubation, l'observation de la plaque permet d'accéder à la CMI, qui correspond la plus faible concentration du produit testé capable d'inhiber la croissance bactérienne. Cette méthode peut être procédée en suivant la technique de **Bertella et al. (2018)** comme suit:

Dans des microplaques de 96 puits, 100 μ l de la suspension bactérienne (à 10⁵UFC/ml) ont été inoculés avec 100 μ l de la dilution antimicrobienne testée. Les concentrations des huiles essentielles étaient des dilutions en série de deux fois allant de 500 μ l/ml à 3,90 μ l/ml. Après 24h d'incubation à 37°C, la CMI a été déterminée comme la concentration la plus faible de l'huile essentielle inhibant la croissance bactérienne visible.

La concentration minimale bactéricide (CMB) c'est la plus faible concentration à laquelle aucune croissance visible du micro-organisme n'avait eu lieu après 18 heures de culture à 37°C, c'est-à-dire une activité létale. Cette valeur caractérise l'effet bactéricide d'un antibiotique ou d'un extrait.

Pour estimer cette activité d'huiles essentielles, il faut transformer les micro-organismes du bouillon liquide où aucune croissance n'a été observée (sur microplaque), dans des tubes à essai qui contiennent 9ml d'un nouveau milieu de bouillon MH et les incubent à 37°C pendant 18 heures.

L'activité antibactérienne des composés pris isolément peut être estimée par le rapport CMB/CMI; lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance antimicrobienne est inférieur ou égal à quatre (≤ 4) cette dernière est qualifiée de substance bactéricide, cependant si ce rapport est supérieur à quatre (> 4), alors elle est dite bactériostatique (Traoré et al., 2012).

II-2-3- L'association des huiles essentielles avec les antibiotiques

Deux méthodes sont adoptées pour les tests de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques.

II-2-3-1- La méthode de diffusion sur disque

La combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques peut être réalisée en utilisant la méthode de diffusion sur disques décrite Boudjedjou et al.(2018, 2019). Les disques des antibiotiques sont imprégnés par 10 μ l de l'huile essentielle avec une concentration sélectionnée préalablement. Après la période d'incubation, les zones d'inhibition de croissance sont été mesurées. La combinaison d'HE avec ATB peut donner un effet synergique, additif ou antagoniste.

Synergique, si l'effet antibactérien de l'association des huiles essentielles avec les antibiotiques (Ehe+ab - D) est supérieur significativement ($p < 0.05$) à la somme des effets antibactériens des huiles essentielles et de l'antibiotique pris séparément ((Ehe - D) + (Eab-D));

Antagoniste, si l'effet antibactérien de l'association des huiles essentielles avec les antibiotiques Ehe+ab - D) est inférieurs significativement ($p < 0.05$) à la somme des effets antibactériens des huiles essentielles et de l'antibiotique pris séparément ((Ehe - D) + (Eab-D));

Si l'effet antibactérien de l'association des huiles essentielles avec les antibiotiques (Ehe+ab - D) est égal ($p > 0.05$) à la somme des effets antibactériens des huiles essentielles et de l'antibiotique pris séparément ((Ehe - D) + (Eab-D)), alors l'effet de l'interaction est additif;

Avec :

Ehe+ab : diamètre de la zone d'inhibition des huiles essentielles en combinaison avec les antibiotiques.

Eab : diamètre de la zone d'inhibition des antibiotiques seules ;

Ehe : diamètre de la zone d'inhibition des huiles essentielles seules ;

D : diamètre de disque (6 mm).

II-2-3-2- La méthode de microdilution

Pour déterminer les interactions de l'association des huiles essentielles avec les antibiotiques, on peut suivre la même procédure utilisée pour évaluer la CMI, avec de légères modifications (**Rosato et al., 2010**).

La dilution de l'HE sera effectuée dans le sens horizontal (de CMI × 8 à CMI × 1/16) et l'ajout des différentes concentrations d'antibiotiques est fait verticalement avec une gamme de concentration allant de CMI × 8 à CMI × 1/16, une série de combinaisons de concentration différente en HE/ATB sera obtenue. L'HE et l'ATB seront également testés séparément sur la même microplaque pour la comparaison (témoin positif). Par la suite, la microplaque sera inoculée avec une suspension bactérienne de telle façon à obtenir une charge finale qui est de 5 x10⁵UFC/ mL, puis incubée à 37°C pendant 24 h.

La mesure de l'effet de l'association HE/ATB sera obtenue en calculant l'Indice de Concentration Inhibitrice Fractionnaire (FICI) selon la formule suivante :

$$FICI = \frac{\text{CMI de l'ATB en combinaison}}{\text{CMI de l'ATB seul}} + \frac{\text{CMI de l'HE en combinaison}}{\text{CMI de l'HE seul}}$$

FICI ≤ 0.5, **synergique**.

FICI > 0.5–4.0, **Indifférent**.

FICI > 4.0, **antagoniste**.

0,5 < FICI < 1, **Additif**.

II-2-4- Analyse statistique

Toutes les mesures seront répétées trois fois dans des expériences indépendantes, et toutes les valeurs obtenues dans ce travail seront exprimées en moyenne ± écart types. L'analyse de la variance est nécessaire pour tester la signification des effets de différents facteurs qu'on voulait tester (sexe de l'arbre, souches bactérienne et l'interaction de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les plantes médicinales restent toujours une source inépuisable de substances, de composés naturels bioactifs et efficace grâce à leurs différents principes actifs notamment les huiles essentielles, plusieurs travaux de recherche sur les huiles essentielles extraites de plantes aromatiques. Notre étude s'est basée sur l'huile d'une plante appelée *Juniperus thurifera*. Plus précisément nous sommes concentrés sur l'huile extrait des tiges, tandis que la plupart des expériences se sont concentrées sur l'huile extraite des graines et des feuilles.

De même d'autres études de l'association « huiles essentielles/antibiotiques » sont recommandées afin d'aller plus loin dans la recherche concernant ce domaine.

Nous recommandons également une étude de conception d'une formule médicamenteuse qui combine entre les antibiotiques et les huiles essentielles présentant des effets synergiques en association et ce dans le but de lutter contre les bactéries manifestant une résistance aux agents antibactériens.

Sachant que la diversité des composés actifs à pouvoir antimicrobien dans l'HE rend la résistance microbienne difficile, voire impossible puisque les souches bactériennes ne peuvent pas opérer des mutations conduisant à des résistances simultanées vis-à-vis de toutes les molécules bioactives.

Références bibliographiques

- ❖ **Adams, R. P. (2014).** *Junipers of the world: the genus Juniperus*. Trafford Publishing. Activities of Black Tea. *Molecules*, 12, 484-496.
- ❖ **Badri, W. (2003).** *Structure, Dynamique et Fonctionnement des peuplements à Genévrier thurifère (Juniperus thurifera L.) dans les Atlas marocains* (Doctoral dissertation, Thèse de doctorat, Université Cadi Ayyad, Marrakech, Maroc).
- ❖ **Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008).** Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- ❖ **Baser, K. H. C., & Buchbauer, G. (2010).** Essential oils science, technology, and applications. *Florida, Estados Unidos: CRC Press. doi, 10, 9781420063165-c3*.
- ❖ **Bassou, K. (2007).** Efficacités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata L'* issue de la région de Ouargla sur quelque germe pathogène: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. *Etude supérieures, Université de Kasdi Merbah Ouargla*, 69.
- ❖ **Beghami, Y. (2013).** Écologie et dynamique de la végétation de l'Aurès: analyse spatio-temporelle et étude de la flore forestière et montagnarde. Thèse de Doctorat, Université Mohamed Khider-Biskra, Algérie.
- ❖ **Bertaudière, V. (1999).** Dendroécologie du genévrier thurifère (*Juniperus thurifera L.*) dans la haute montagne méditerranéenne (Haut Atlas, Maroc) et dans une station xérothermique des Pyrénées centrales (France). *Unpublished Thesis, University Paul Sabatier, Toulouse, France*.
- ❖ **Bertella, A., Benlahcen, K., Abouamama, S., Pinto, D. C., Maamar, K., Kihal, M., & Silva, A. M. (2018).** *Artemisia herba-alba* Asso. essential oil antibacterial activity and acute toxicity. *Industrial Crops and Products*, 116, 137-143.
- ❖ **Bhat, A. S., & Ahangar, A. A. (2007).** Methods for detecting chemical–chemical interaction in toxicology. *Toxicology mechanisms and methods*, 17(8), 441-450.
- ❖ **Boonyanugomol, W., Kraiwattana, K., Rukseree, K., Boonsam, K., & Narachai, P. (2017).** In vitro synergistic antibacterial activity of the essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of infection and public health*, 10(5), 586-592.

- ❖ **Bouchaala, O. (2013).** *Synthèse, Caractérisation et Activité biologique d'une base de Schiff* (Doctoral dissertation).
- ❖ **Boudjedjou, L., Ramdani, M., Zeraib, A., Benmeddour, T., & Fercha, A. (2018).** Chemical Composition and Antibacterial Activity of Berries Essential Oil of Algerian *Juniperus thurifera* (Var. *aurasiaca*). *Pharmaceutical Sciences*, 24(3), 240-245.
- ❖ **Boudjedjou, L., Ramdani, M., Zeraib, A., Benmeddour, T., & Fercha, A. (2019).** Chemical composition and biological activities of Algerian *Santolina africana* essential oil. *Scientific African*, 4, e00090.
- ❖ **Breitmaier, E. (2006).** *Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*. John Wiley & Sons.
- ❖ **Bruneton, J. (2009).** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). *Tec & Doc/Lavoisier*, Paris, 279-281.
- ❖ **Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- ❖ **Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007).** Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of dairy science*, 90(6), 2580-2595.
- ❖ **Campanaud, J. (2006).** Résistance aux antibiotiques: l'état d'urgence. *Science et Vie*, (1070).
Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial
- ❖ **Conrad, M. (1986).** Essai sur la repartition de *Juniperus thurifera* L. en Corse, en 1985. *Le monde des plants*, 423(424), 1-2.
- ❖ **Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of applied microbiology*, 88(1), 170-175.
- ❖ **Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000).** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- ❖ **Farjon, A. (2010).** *A Handbook of the World's Conifers* (2 vols.) (Vol. 1). Brill.
- ❖ **Ferhat, M. A., Meklati, B. Y., & Chemat, F. (2007).** Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. *Flavour and Fragrance Journal*, 22(6), 494-504.

- ❖ **Flamarion, M. E. (1987).** *Le défi de la complexité en soins primaires: de la médecine générale à la médecine interne* (Doctoral dissertation, UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE PARIS).
- ❖ **François, V. (2004).** *Détermination d'indicateurs d'accélération et de stabilisation de déchets ménagers enfouis: Etude de l'impact de la recirculation de lixiviats sur colonnes de déchets* (Doctoral dissertation, Limoges).
- ❖ **Gauquelin, T., Idrissi Hassani, M., & Lebreton, P. (1988).** Le Genévrier thurifère, *Juniperus thurifera* L. (Cupressacées): analyse biométrique et biochimique; propositions systématiques. *Ecologia mediterranea*, 14(3), 31-42.
- ❖ **Georgantelis, D., Ambrosiadis, I., Katikou, P., Blekas, G., & Georgakis, S. A. (2007).** Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4 C. *Meat science*, 76(1), 172-181.
- ❖ **Guignard, B., Bossard, A. E., Coste, C., Sessler, D. I., Lebrault, C., Alfonsi, P., ... & Chauvin, M. (2000).** Acute Opioid Tolerance Intraoperative Remifentanil Increases Postoperative Pain and Morphine Requirement. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 93(2), 409-417.
- ❖ **Hay, Y. O. M. (2015).** La complexité des simples- Caractérisations chimique et biologique de combinaisons hydrolats-huiles essentielles et huiles essentielles-huiles essentielles pour l'objectivation d'effets conservateurs de produits phyto thérapeutiques. Thèse de Doctorat dissertation, Université de Toulouse, France.
- ❖ **Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007).** Microwave-assisted extraction of ant oxidative anthrax quinines from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54(1), 44-50.
- ❖ **Horvath, G. (2002).** Antibacterial activity of *Thymus* phenols by direct bioautography. *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3-4), 145-146.
- ❖ **Jolyguillou, M. (2006).** Intérêt du E-test dans le suivi de l'antibiothérapie. *Réanimation*, 15(3), 237-240.
- ❖ **Kudo, F. (2020).** Biosynthesis of Amino glycoside Antibiotics, In Hung-Wen (Ben) Liu and Tadhg P. Begley, *Comprehensive Natural Products III*, Third Edition, Elsevier.
- ❖ **Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., & Burt, S. A. (2014).** Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 76-94.

- ❖ **Laouar, S., & Sifer, H. (2013).** Etude de l'activité antibactérienne de quelques huiles essentielles et l'effet de leurs associations avec les antibiotiques. Mémoire En Vue de l'Obtention de Diplôme d'Ingénieur d'Etat En Génie Biologique. Univ. Abderrahmane MIRA, Bejaia.
- ❖ **Lawrence, B. M. (1995).** Essential oils (Ed.) Allured Publishing Corporation, Carol Stream.
- ❖ **Lucchesi, M. E. (2005).** *Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles* (Doctoral dissertation).
- ❖ **Mondiale de la Santé, O. (2002).** Médecine traditionnelle: Besoins croissants et potentiels. *Genève: OMS.*
- ❖ **Montès, N. (1999).** *Potentialités, dynamique et gestion d'une formation arborée à Genévrier Thurifère (Juniperus Thurifera L.) des Atlas marocains: le cas de la vallée de l'Azzaden* (Doctoral dissertation).
- ❖ **Pavel, M., Ristić, M., & Stević, T. (2010).** Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescent* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(1), 27-34.
- ❖ **Pillai, S. K., Moellering, R. C., & Eliopoulos, G. M. (2005).** Antibiotics in laboratory medicine. *Antimicrobien Combinassions*, 365-440.
- ❖ **Ponce, A. G., Fritz, R., Del Valle, C., & Roura, S. I. (2003).** Antimicrobial activity of essential oils on the native micro flora of organic Swiss chard. *LWT-Food Science and Technology*, 36(7), 679-68.
- ❖ **Quézel, P., & Santa, S. (1962).** *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.* CNRS. France.
- ❖ **Raut, J. S., & Karuppayil, S. M. (2014).** A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial crops and products*, 62, 250-264.
- ❖ **Rosato, A., Piarulli, M., Corbo, F., Muraglia, M., Carone, A., Vitali, M. E., & Vitali, C. (2010).** In vitro synergistic action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current medicinal chemistry*, 17(28), 3289-3295.
- ❖ **Salam, A. M., & Quave, C. L. (2018).** Opportunities for plant natural products in infection control. *Current opinion in microbiology*, 45, 189-194.

- ❖ **Sayout, A., Ouarhach, A., Dilagui, I., Soraa, N., & Romane, A. (2020).** Antibacterial activity and chemical composition of essential oil from *Lavandulatenuissecta* Coss. ex Ball. An endemic species from Morocco. *European Journal of Integrative Medicine*, 33, 101017.
- ❖ **Semeniuc, C. A., Pop, C. R., & Rotar, A. M. (2017).** Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 403-408.
- ❖ **Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2004).** Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia Alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *Journal of Chromatography A*, 1025(1), 93-103.
- ❖ **Svoboda, K. P., & Hampson, J. B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW*, 16, 1-7.
- ❖ **Terrab, A., Schönswetter, P., Talavera, S., Vela, E., & Stuessy, T. F. (2008).** Range-wide phylo geography of *Juniperus thurifera* L., a presumptive keystone species of western Mediterranean vegetation during cold stages of the Pleistocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), 94-102.
- ❖ **Theis, N., & Lerdau, M. (2003).** The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3), S93-S102.
- ❖ **Traoré, Y., Ouattara, K., Yéo, D., Doumbia, I., & Coulibaly, A. (2012).** Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*, 58, 4234-4242.
- ❖ **Turkmen, N., Vellioglu, Y. S., Sari, F., Polat, G. (2007).** Effect of Extraction
- ❖ **Ultee, A., Kets, E. P. W., & Smid, E. J. (1999).** Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4606-4610.
- ❖ **Vela, E., & Schäfer, P. A. (2013).** Typification de *Juniperus thurifera* var. *africana* Maire, délimitation taxonomique et conséquences nomenclaturales sur le Genévrier thurifère d'Algérie. *Ecologia mediterranea*, 39(1), 69-80.

- ❖ **Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phyto pharmaceuticals. *Phyto medicine*, 16(2-3), 97-110.
- ❖ **Wagner, H., & Ulrich-Merzenich, G. (2009).** Synergy research: approaching a new generation of phyto pharmaceuticals. *Phyto medicine*, 16(2-3), 97-110.
- ❖ **White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., & Bosso, J. A. (1996).** Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(8), 1914-1918.
- ❖ **White, R. L., Burgess, D. S., Manduru, M., & Bosso, J. A. (1996).** Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(8), 1914-1918.
- ❖ **Yala, D., Merad, A. S., Mohamedi, D., & OuarKorich, M. N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91(1), 5-12.
- ❖ **Zeraib, A. (2016).** Etude phyto chimique et chimio systématique de *Juniperus thurifera* L. en Algérie. thèse de Doctorat en Science, Université Ferhat Abbès Sétif1, Algérie.
- ❖ **Zeraib, A., Ramdani, M., Boudjedjou, L., Chalard, P., & Figuredo, G. (2014b).** Chemical composition and antibacterial activity of *Juniperus thurifera* L. essential oils. *Journal of Bio Science & Bio technologie*, 3(2).
- ❖ **Zeraib, A., Ramdani, M., Boudjedjou, L., Chalard, P., & Figuredo, G. (2014a).** Characterization and chemosystematics of Algerian thuriferous juniper (*Juniperus thurifera* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87.