



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABBES LAGHROUR - KHENCHELA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : **Sciences de la Nature et de la Vie**

Filière : **Biologie**

Option : **Microbiologie Appliquée**

Thème

Etude de l'activité antibactérienne d'un mélange de quatre huiles essentielles

Présenté par :

MENAI Asma

BOUNEZRA Yasmina

Devant le jury composé de:

Président:	YAHIA Massinissa	M. C. B	Univ Abbès Laghrouour Khenchela
Examinatrice :	BENREDJEM Lamia	M. C. B	Univ Abbès Laghrouour Khenchela
Encadreur :	BERTELLA Anis	M. C. B	Univ Abbès Laghrouour Khenchela

Année universitaire: 2020-2021

REMRCIEMENTS

Avant tout, Merci à Dieu le tout puissant, de nous avoir donné courage, volonté et force pour réaliser ce travail.

Toutes notre gratitude et notre reconnaissance va à **Dr. BERTELLA Anis**, notre encadreur d'avoir accepté de diriger notre travail, ainsi pour son aide, sa patience et ses conseils et encouragements.

Nous tenant à remercier tous les membres de jury, Un grand merci à **Dr. BEREDJEM Lamia** d'avoir accepté d'examiner ce mémoire de fin d'étude.

Nous remercions **Dr. YAHIA Massinissa** d'avoir honorer ce jury en le président, pour enrichir et perfectionner notre mémoire.

Nous n'oublierions pas de remercier **tout le staff du laboratoire de l'université Abbès Laghrour Khenchela**, pour l'aide précieuse qu'elles nous ont apportée durant la réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements vont à **toutes les personnes** qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, sources de mes joies et secret de ma force, vous serez toujours le modèle.

À mon père Bounezra Ramdhane qu'Allah l'accueille dans son vaste paradis.

À ma chère Maman Achouri noua, merci pour tes sacrifices et soutiens. C'est à vous toi que je dois cette réussite.

À mes frères Lazhar, Mokhtar, Saleh et Khire Eddine en reconnaissance de leur affection toujours constante.

A ma très chère sœur Ismahane et son mari

Aux anges de la famille : Djomana, Sirine, Ayat Errahman, Omaira, Saja et Abd el momene et à mon cousin Boubaker

À mes très chères amies Rabab, Wassila, Dounia et Salma

À mon binôme Asma Menai

À toute ma famille "Bounezra"

À Tous mes proches, mes amis et mes camarades de la promotion

A toutes les personnes qui me connaissent de loin ou de près

Yassmina

Dédicaces

A tous ceux qui me sont chers

Asma

Résumé

Cette étude consiste à évaluer l'efficacité antibactérienne d'un mélange des huiles essentielles obtenues à partir de plantes médicinales des espèces *Artemisia herba alba* Asso., *Artemisia campestris* L., *Rosmarinus tournefortii* de Noé., *Thymus hirtus* Willd., connues pour sa valeur thérapeutique dans la médecine traditionnelle algérienne.

Les huiles essentielles ont été testées seules et en combinaison sur cinq souches bactériennes, par la méthode de diffusion sur disque, ainsi que la détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide et bactéricide en milieu solide (CMB).

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles seules par la méthode de diffusion par disque a montré un effet remarquable de l'huile de *Rosmarinus tournefortii* sur *Escherichia coli* traduite par un diamètre de la zone d'inhibition de 15 mm, Ainsi les huiles d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris* ont révélées une CMI et CMB élevées allant à 80 mg /ml sur les souches de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La combinaison des huiles RT: AHA :TH: AC avec les ratios de M1: 1:1:1:1; M2 : 7:1:1:1; M3 : 1:7:1:1; M4 : 1:1:7:1; M5 : 1:1:1:7, a montré que le mélange (M3) a une activité très importante sur *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 16 mm ,certains mélanges ont montré un effet antibactérien faible par rapport aux huiles seules. Les faibles concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de 5 mg/ml étaient remarquées pour les mélanges (M2) et (M3) sur les souches *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus* sp.

Mots clés : Mélange des huiles essentielles, activité antibactérienne, *Artemisia herba alba* Asso., *Artemisia campestris* L., *Rosmarinus tournefortii* de Noé., *Thymus hirtus* Willd.

ملخص

تهدف هذه الدراسة الي تقييم الفعالية المضادة للبكتيريا لخليط من زيوت عطرية معينة تم الحصول عليها من نباتات طبية من نوع *Rosmarinus tournfortii de Noé* ، *Artemisia campestris L* ، *Artemisia herba alba asso* و *Thymus hirtus Willd* المعروفة بقيمتها العلاجية في الطب التقليدي الجزائري.

تم اختبار الزيوت العطرية بمفردها ومشاركة على خمس سلالات بكتيرية بتقنية الانتشار عن طريق القرص، تحديد الحد الأدنى من التركيز المثبط (MIC) في وسط سائل و الحد الأدنى من التركيز القاتل في وسط صلب (CMB).

أظهر تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية وحدها بطريقة الانتشار عن طريق القرص تأثيرًا ملحوظًا لزيت *Artemisia tournfortii* على سلالة *Escherichia coli* حيث بلغ قطر منطقة التثبيط 15 مم ، اما الزيوت *Artemisia herba alba* و *Artemisia campestris* اسفرت عن حد ادنى من التركيز المثبط والقاتل بمقدار 80 ملغم / مل على كل من *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus*.

كشف المزيج المتكون من الزيوت *RT: AHA: TH: AC* بنسب $M1: 1: 1: 1: 1$ ؛ $M2: 7: 1: 1: 1$ ؛ $M3: 1:$ مع $M4: 1: 1: 7: 1$ ؛ $M5: 1: 1: 1: 7$ أن المزيج (M3) له نشاط حاسم على *Staphylococcus aureus* مع منطقة تثبيط قدرت ب 16 مم ، وقد أظهرت بعض الامزجة تأثير ضعيف مضاد للبكتيريا مقارنة بالزيوت وحدها. كما لوحظ ايضا قيم منخفضة للحد الأدنى من التركيز المثبط و القاتل قدرت ب 5 ملغم / مل بالنسبة للمزيج (M2) و (M3) على السلالات *Enterococcus sp* و *Pseudomonas aeruginosa* على التوالي.

الكلمات المفتاحية : مزيج من الزيوت الأساسية ، نشاط مضاد للبكتيريا ، *Artemisia herba alba Asso* ، *Artemisia campestris L* و *Rosmarinus tournfortii de Noé* و *Thymus hirtus Willd*.

Abstract

This study consists to evaluate the antibacterial activity of a mixture of some essential oils obtained from medicinal plants of the species *Artemisia herba alba* Asso., *Artemisia campestris* L., *Rosmarinus tournfortii* de Noé., *Thymus hirtus* Willd., Known for its therapeutic value in Algerian traditional medicine.

The essential oils were tested single and in combination against five bacterial strains, by the disc diffusion assay, the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) in broth and bactericidal in agar (MBC).

The evaluation of the antibacterial activity of single EOs by disc diffusion assay exhibited a remarkable effect of *Rosmarinus tournfortii* oil against *Escherichia coli* translated by 15mm of the inhibition zone diameter, while the oils of *Artemisia herba alba* and *Artemisia campestris* revealed an elevated MIC and MBC ranging to 80 mg / ml against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* strains.

The combination of RT: AHA: TH: AC oils with the ratios of (M1) : 1: 1: 1: 1; (M2) : 7: 1: 1: 1; (M3) : 1: 7: 1: 1; (M4) : 1: 1: 7: 1; (M5) : 1: 1: 1: 7; displayed that the mixture (M3) has a crucial activity against *Staphylococcus aureus* with an inhibition zone of 16 mm, However some mixtures showed a weak antibacterial effect compared to the single oils. The low minimum inhibitory and bactericidal concentrations of 5 mg / ml were noted for the mixtures (M2) and (M3) against the strains *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus sp* respectively.

Key words: Blend of essential oils, antibacterial activity, *Artemisia herba alba* Asso., *Artemisia campestris* L., *Rosmarinus tournfortii* de Noé., *Thymus hirtus* Willd.

Sommaire

Sommaire

Liste des tableaux

Liste des figures

Symboles et abréviations

Introduction

Chapitre 1: Revue bibliographique

1. Les huiles essentielles...	04
1.1.Définition des huiles essentielles.....	04
1.2.Historique.....	04
1.3.Propriétés des huiles essentielles	05
1.3.1.Propriétés organoleptiques.....	05
1.3.2.Propriétés chimiques.....	05
1.3.3.Propriétés physiques	06
1.4.Activités biologiques.....	06
1.4.1.Activité antibactérienne	06
1.4.2.Activité antifongique	07
1.4.3Activité antiprotozoaire	07
1.4.4Activité antivirale	08
1.5.Localisation dans la plante	08
1.6.Composition chimique des huiles essentielles	09
1.6.1.Les terpènes.....	09
1.6.1.1.Les mono terpènes.....	10
1.6.1.2.Les sesquiterpènes	10
1.7.Usage.....	10
1.7.1.En pharmacie	10
1.7.2.En cosmétique	11
1.7.3.En industrie alimentaire	11
1.7.4.En agroalimentaire.....	12
1.8.Les techniques d'extraction des huiles essentielles.....	12
1.8.1.Hydrodistillation.....	12
1.8.2.Entrainement à la vapeur d'eau	13
1.8.3.Extraction au CO2 supercritique.....	14

1.8.4.Extraction assistée par micro- onde.....	15
1.8.5.Extraction à l'expression à froid.....	15
2 . Présentation des espèces étudiées.....	16
2.1.Artemisia herba alba Asso... ..	16
2.1.1.Description botanique.....	16
2.1.2.Systématique	17
2.1.3.Habitat.....	17
2.1.4.Usage.....	18
2.2.Artemisia campestris L.....	18
2.2.1.Description botanique.....	18
2.2.2.Systématique.....	19
2.2.3 Habitat et distribution.....	20
2.2.4.Usage.....	20
2.3.Rosmarinus tournefortii de Noé	20
2.3.1.Description botanique	20
2.3.2.Systématique	21
2.3.3.Habitat.....	22
2.3.4.Usage.....	22
2.4.Thymus hirus willd	22
2.4.1. Description botanique	22
2.4.2 Systématique	23
2.4.3.Habitat.....	24
2.4.4.Usage.....	24

Chapitre 2: Matériel et méthodes

1. Préparation du matériel végétal.....	25
2. Extraction des huiles essentielles.....	26
3. Détermination du rendement en huile essentielle.....	27
4. Etude de l'activité antibactérienne	27
4 .1. Souches bactériennes.....	28
4.2.Repiquage des souches bactériennes.....	28
4.3.Préparation de l'inoculum bactérien	29
4.4.Préparation des mélanges des huiles essentielles.....	29

4.5.Préparation des disques	30
4.6.Méthode de diffusion sur disque	30
4.7.Préparation de dilution des He V/V31
4.8.Détermination de CMI.....	32
4.9.Détermination de CMB.....	..34

Chapitre 3: Résultats et discussion

1.Rendement	35
1. Méthode de diffusion sur disque	35
1.1. Les He seules et en combinaison	35
2. Détermination de la CMI et CMB	42
2.1. Les He seules et en combinaison	42
Conclusion et perspectives	51
Références bibliographiques	53

Liste des tableaux

Tableau 01 : Organes de certaines plantes riches en huiles essentielles.....	09
Tableau 02 : Systématique d' <i>Artemisia herba alba</i> Asso.....	17
Tableau 03 : Systématique d' <i>Artemisia campestris</i> L.....	19
Tableau 04 : Systématique de <i>Rosmarinus tournefortii</i> de Noé.....	21
Tableau 05 : Systématique de <i>Thymus hirtus</i> willd.....	23
Tableau 06 : Les souches bactériennes.....	28
Tableau 07 : Les mélanges des huiles essentielles.....	29
Tableau 08 : Diamètre de zones d'inhibition de bactéries testées vis-à-vis des huiles essentielles.....	36
Tableau 09 : Diamètres des zones d'inhibition des bactéries testés vis-à-vis des mélanges des huiles essentielles.....	39
Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles.....	44
Tableau 11 : Les valeurs de CMI et CMB des mélanges des huiles essentielles... ..	44
Tableau 12 : Les valeurs de CMB et CMI des huiles essentielles et des mélanges.....	46

Liste des figures

Figure 1 : Extraction des huiles essentielles par l'hydro distillation.....	13
Figure 2 : Entraînement à la vapeur d'eau.....	14
Figure 3 : Extraction par CO2 supercritique.....	15
Figure 4 : Aspect morphologique de l'espèce <i>Artemisia herba alba</i> Asso.....	17
Figure 5 : Aspect morphologique de l'espèce <i>Artemisia campestris</i> L.....	19
Figure 6 : Aspect morphologique de l'espèce <i>Rosmarinus tournefortii</i> de Noé.....	21
Figure 7 : Aspect morphologique de l'espèce <i>Thymus hirtus</i> Willd.....	23
Figure 8 : Carte géographique de la wilaya de Batna, commune de Fesdis, Bouilef.....	25
Figure 9 : Préparation du matériel végétale de la plante <i>Thymus hirtus</i> Willd.....	26
Figure 10 : Procédé d'extraction de l'huile essentielle par hydro distillation.....	27
Figure 11 : Les volumes des mélanges des huiles essentielles préparés par μ l.....	30
Figure 12 : Schéma d'un aromatoigramme par méthode de diffusion sur disque.....	31
Figure 13 : Préparation de la dilution des huiles essentielles par pesage.....	31
Figure 14 : La technique de Micro dilution par microplaque (dessinée par InvisionStudio.....	34
Figure 15 : La détermination de concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	34
Figure 16 : Le rendement de l'huile <i>Thymus hirtus</i> willd.....	35
Figure 17 : Effet des huiles <i>Artemisia herba alba</i> (AHA) ; <i>Artemisia campestris</i> (AC) ; <i>Rosmarinustournefortii</i> (RT) ; <i>Thymus hirtus</i> willd (TH) sur la croissance des bactéries.....	37
Figure 18 : Effet des mélanges des huiles essentielles sur la croissance des bactéries.....	38
Figure 19 : La lecture de concentration minimale inhibitrice.....	43
Figure 20 : La lecture de concentration minimale bactéricide des huiles essentielles.....	43

Figure 21: La lecture de concentration minimale bactéricide des huiles essentielles.....**43**

Figure 22 La lecture de CMB des mélanges des huiles essentielles.....**44**

Symboles et abréviations

% : pourcent

ACL : *Artemisia campestris* L.

AHA : *Artemisia herba alba* Asso.

[C]: concentration

CMB : Concentration minimale inhibitrice

CMI : Concentration minimale bactéricide

CO₂ : Dioxyde de Carbone

DENV : Virus de la dengue

DMSO : Diméthyle sulfoside

EC : *Escherichia coli*

En sp : *Enterrococcus sp*

ET : L'écart type

FIC : Index concentration inhibitrice fractionnaire

GN : Gélose nutritive

h : heure

He : Huile essentielle

Hes : huiles essentielles

J.C : Jesus christ

L : litre

M1 : mélange 1 des huiles essentielles

M2 : mélange 2 des huiles essentielles

M3 : mélange 3 des huiles essentielles

M4 : mélange 4 des huiles essentielles

M5 : mélange 5 des huiles essentielles

m :Masse

MEV :Masse de matériel végétal

MHB :Bouillon Muller Hinton

MHE :Masse d'huile essentielle

MHS : Gélose Muller Hinton

ml : millilitre

mm : millimetre

M : La moyenne

Na₂So₄ : Sulfate de Sodium anhydride

OE : essential oil

Pa : Pseudomonas aeruginosa

PBS

RHE :Rendement en huile essentielle

RT : Rosmarinus tournefortii de Noé

S : Sensibilité

Sa :Staphylococcus aureus

SB : Suspension bactérienne

TH : Thymus hirtus Willd

TTC : diphenyltetrazolium chloride

UFC : Unité formante colonie

V : volume

(+) : Modérement sensible

(-)Résistante

(++) Sensible

Introduction

Introduction

L'histoire des plantes aromatiques et médicinales a commencé avec l'évolution des civilisations. Une plante médicinale désigne toute plante qui contient un ou plusieurs composants actifs pouvant prévenir, soulager ou guérir des maladies (**Schauenberg et Paris., 2006**), ce qui la considère comme une source importante en médecine traditionnelle et de médicaments qui sont efficaces dans le traitement des maladies (**Bako et al., 2005 ; Borokini et Omotayo., 2012**). Plus de 80 % de la population mondiale utilisent les plantes médicinales comme source de soins de santé primaires (**Agisho et al., 2014**), puisque différentes parties de la plante sont utilisées en médecine traditionnelle, notamment les écorces, les fleurs, les fruits, les feuilles, les résines, les rhizomes, les racines, les graines et tiges (**Alqethami et al., 2017**).

En conséquence, le métabolisme secondaire des plantes produit des substances volatiles appelées les huiles essentielles. A noter que, plus de 17 500 espèces de plantes à fleurs produisent des huiles essentielles avec une odeur et un goût caractéristiques, dont plus de 300 huiles essentielles ont été largement utilisées (**Mérillon et al., 2018**). Ces huiles essentielles affectées par une gamme de facteurs intrinsèques et extrinsèques, surtout les huiles des plantes officinales, qui peuvent induire des changements dans leur composition chimique et leurs activités physiologiques, ainsi la même espèce dans des conditions environnementales et géographiques différentes, peuvent produire des huiles avec différents profils chimiques et propriétés biologiques (**Maksimović et al, 2018 ; Mastinu et al, 2021**)

De plus, les huiles essentielles ont une composition chimique très complexe: elles contiennent deux ou trois composants principaux, principalement des terpènes, des terpénoïdes et des phénylpropanoïdes. Les principaux composants des huiles essentielles représentent environ 70% de sa composition mais le reste contient de nombreux autres composés tels que des acides gras, des oxydes et des dérivés soufrés (**Stringaro et al., 2018**). Ces composants ont un grand potentiel en tant qu'agents antimicrobiens et utilisés dans plusieurs domaines industriels et médicaux (**Dorman et al., 2000**) .

L'activité antimicrobienne des plantes médicinales et aromatiques est connue et décrite depuis plusieurs siècles (**Begamboula et al., 2003**), la plupart de leurs propriétés sont dues aux métabolites secondaires que contiennent (**Adam et al., 1998; Sartoratto et al., 2004**). Dans ces dernières années, plusieurs des huiles essentielles et de leurs constituants ont été

étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes contre les bactéries et les champignons (**Vasinauskienė et al., 2006**), en outre les HE et les extraits de plusieurs espèces végétales sont capables de contrôler les micro-organismes liés à la peau, les caries dentaires et la détérioration des aliments, y compris les bactéries gram-négatives et gram-positives (**Sartoratto et al., 2004**).

De sorte que, Plusieurs travaux scientifiques révélaient l'action antiseptique de plusieurs huiles essentielles à la fin du XIXe et au début du XXe siècle (**Chamberland., 1887 ; Baser et al., 2000**), une sérieuse alternative à la médecine des antibiotiques dans les pathologies infectieuses (**De Billerbeck et al., 2002; Tonneau et al., 2007**), dont plusieurs espèces sont utilisées comme matières premières pour la Production des médicaments vendus par l'industrie pharmaceutique (**Juliana et al., 2021**). Ces dernières années, une augmentation importante a été observée concernant l'utilisation des plantes médicinales en raison de leur abondance, de leur importance culturelle et de leurs bas prix (**Thomford et al., 2015**).

Notre flore algérienne est très riche en espèces aromatiques. Ils sont répandus dans des conditions climatiques diversifiées (humide, subhumide, semi-aride, aride et désertique), cette flore est utilisée beaucoup plus traditionnellement, elle est donc certainement un intérêt économique plus élevé (**Benmeddour et al., 2019**).

Cette étude consiste à évaluer l'efficacité antibactérienne d'un mélange de 4 huiles essentielles obtenues à partir de plantes médicinales et aromatiques (*Artemisia herba alba* Asso., *Artemisia campestris* L., *Rosmarinus tournefortii* de Noé., *Thymus hirtus* Willd.), elles sont des plantes très utilisées dans la médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire et antibactérienne dans la région nord-est de l'Algérie qui représente une région où les plantes médicinales suscitent une importance aussi bien par les habitants que par les scientifiques.

Ce manuscrit est structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique sur les plantes médicinales et les huiles essentielles, les principes actifs des plantes (métabolites secondaires) plus particulièrement l'huile essentielle, et leurs propriétés biologiques (antibactérienne, antifongique).

Dans le deuxième chapitre nous nous sommes intéressés à illustrer le matériel et les méthodes utilisés dans les différentes manipulations.

Enfin, le troisième chapitre est consacré aux résultats obtenus et une discussion et ponctués d'une conclusion.

Chapitre 1:
Revue
bibliographique

1. Les huiles essentielles :

1.1. Définition des huiles essentielles

Il existe plusieurs définitions des huiles essentielles qui sont communément appelées essences, alors elles peuvent être définies comme étant des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires obtenues à partir d'une matière première végétale, soit par hydrodistillation, expression à froid dans le cas des agrumes (**Burt, 2004**), soit par d'autres techniques nouvelles permettant d'augmenter le rendement de production comme la technique d'extraction par le CO₂ supercritique (**Santoyo et al., 2005**) ou l'extraction assistée par micro-ondes (**Kimbaris et al., 2006**).

Alors que selon AFNOR, (2000) (Association Française de la Normalisation) l'HE est un « produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés physiques et séparé de la phase aqueuse par des procédés physiques ».

Ces huiles largement répandues dans le règne végétal notamment chez les végétaux supérieures, et elles sont obtenues à partir des feuilles, de graines, de bourgeons, d'écorce, de bois, de racine ou de fruits (**Burt, 2004**), selon les utilisent dans divers domaines les se composent généralement de terpénoïdes, de phénolpropénoïdes et des composés soufrés et azotés (**Bekkali et al., 2008**).

En fin, elles présentent plusieurs activités anti-microbiennes (l'activité anti-bactérienne, l'activité anti-fongique, l'activité anti-virale et l'activité anti-protistes). (**Sbayou et al., 2014 ; Guinoiseau et al., 2015**).

1.2. Historique

L'origine de l'utilisation des plantes aromatiques remonte aux plus anciennes civilisations, tout d'abord elle avait commencé dans l'Orient et le Moyen-Orient et par la suite au nord de l'Afrique et en Europe (**Franchomme et al., 1990 ; Lardry et Haberkorn, 2007**).

Les papyrus de 2 800 ans avant J.-C. témoignent que l'huile essentielle de l'origan, la cannelle, la menthe a fait partie des composants des pommades et des crèmes préparées. L'utilisation des huiles essentielles était pratique courante chez les Grecs de l'Antiquité et plusieurs livres ont été publiés sur le sujet. Ils ont été parmi les premiers à traiter les maladies d'ordre psychologique, entre autres avec des plantes aromatiques. Ils avaient constaté les

effets calmants, relaxants, antidépresseurs, stimulants et toniques de certaines herbes et de leurs essences, les Chinois aussi, grands connaisseurs des épices, avaient classé les huiles essentielles selon le type d'humeur qu'elles inspiraient à l'être humain (solitaire, noble, tranquille,...) (**Khalfi-habes et al., 2014**).

Les Romains ont poursuivi l'œuvre des Grecs et approfondi leur connaissance des plantes et des huiles essentielles. Ils enfoncèrent en pratique les bienfaits de ces dernières en développant leur utilisation dans les bains (**Buronzio, 2008**).

Quant à l'extraction des huiles essentielles, les premiers à utiliser le procédé d'hydrodistillation semblent être les Perses, 1 000 ans avant J-C., mais il faudra attendre 2 000 ans pour que ce procédé soit sensiblement perfectionné. Avicenne, médecin médiéval Persan, produit la première huile essentielle pure à partir de fleurs de roses (**Garneau, 2005; Zhiri, 2006**). Ensuite, la véritable naissance de l'aromathérapie revient au chimiste français René Maurice Gattefossé en 1928; après s'être brûlé la main par accident dans son laboratoire, il l'a plongée sur le champ dans l'essence de lavande, là où il observé une guérison très rapide, sans infection, ni cicatrice. Il crée le terme « Aromathérapie », ensuite il publie un ouvrage du même nom en 1931 dans lequel il met en évidence la relation entre la structure biochimique de l'huile essentielle et son activité (**Franchomme et al., 1990**).

En résumé, les huiles essentielles ont une place prestigieuse et des propriétés thérapeutiques connues depuis l'antiquité et sont encore utilisées à l'heure actuelle après le développement de méthodes d'extraction et que leurs bienfaits sont connus.

1.3. Propriétés des huiles essentielles

1.3.1. Propriétés organoleptiques

Les huiles essentielles ont des propriétés organoleptiques communes comme le fait d'être liquides à température ambiante, volatiles et entraînaibles à la vapeur d'eau. Elles sont aussi très odorantes et incolores ou jaunes pâles sauf pour les huiles essentielles de cannelle, girofle, camomille matricaire, vétiver et bouleau où la couleur est relativement foncée. (**Phatak et al., 2002**).

1.3.2. Les Propriétés chimiques

Les huiles essentielles constituent des mélanges complexes de composés organiques possédant des structures et des fonctions chimiques très diverses, provenant de leurs

biosynthèses, en particulier celles des isoprénoïdes (Monoterpènes, sesquiterpènes, diterpènes, triterpènes, caroténoïdes) (Mark, 1960).

1.3.3. Propriétés physiques

Les huiles essentielles ne sont pas solubles dans l'eau mais en revanche elles sont solubles dans les solvants organiques et les huiles végétales. Leur densité est inférieure à « 1 » sauf les huiles essentielles de cannelle, girofle, saffran et ail. Elles sont sensibles à l'oxydation, à la lumière et à la chaleur ce qui par conséquent rend leur conservation très délicate. Les huiles essentielles ont des indices de réfractifs élevés et aussi des pouvoirs rotatoires. (Harris et al., 1952).

1.4. Activités biologiques

L'activité biologique des huiles essentielles et de leurs principaux composants est bien documentée. Les huiles essentielles telles que l'huile d'origan et de cannelle sont connues pour leur effet contre les bactéries, les champignons et même des virus. Le mécanisme d'action est proposé pour être lié à la membrane et aux structures cellulaires externes, y compris les parois cellulaires (Sergio et al., 2021).

1.4.1. Activité antibactérienne

Au cours des dernières années, l'émergence d'agents pathogènes résistants aux médicaments a attiré l'attention sur les huiles essentielles pour leurs propriétés antimicrobiennes potentielles. En raison de la grande diversité biologique et structurale de leurs composants, elles constituent une source unique et renouvelable pour la découverte de nouveaux antimicrobiens indispensables (Hercules et Chrissanthy., 2017).

Compte tenu des différents groupes de composés des huiles essentielles, il est fort probable que leur activité antibactérienne ne soit pas attribuable à un seul mécanisme mais qu'il existe plusieurs modes de ciblage de la cellule microbienne. Des propriétés importantes des huiles essentielles, telles que l'hydrophobie, la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation du flux d'électrons, le transport actif et la coagulation du contenu cellulaire, peuvent être considérées comme des mécanismes possibles de leur action antimicrobienne (Burt., 2004). D'autres mécanismes qui peuvent probablement provoquer un dysfonctionnement de la membrane incluent des perturbations du gradient de pH et du potentiel électrique de la force motrice du proton. (Lambert et al., 2001) Les huiles

essentielles qui ont les propriétés antibactériennes les plus puissantes contiennent un pourcentage élevé de composés phénoliques, comme le carvacrol, l'eugénol et le thymol (Guynot et al.,2003) qui provoquent des perturbations structurelles et fonctionnelles dans la membrane cellulaire (Walsh,2003) et agissent sur les protéines cellulaires qui sont aussi collés dans la membrane cytoplasmique (Sikkema,1995).

1.4.2.Activité antifongique

Les infections fongiques peuvent être soit superficielles, soit invasives, leur traitement implique principalement l'utilisation de comprimés oraux ou de crèmes topiques. Il est également plus difficile d'appliquer un traitement pour les infections fongiques que bactériennes, car les cellules humaines et fongiques ont en commun d'être eucaryotes. Si le traitement fongique cible et agit contre une structure commune dans les cellules eucaryotes, cela peut également conduire à une toxicité pour les cellules humaines, compromettant la sécurité de l'hôte(Nazzaro et al ., 2017). Lors du développement d'un médicament antifongique, il est important pour les industries pharmaceutiques de cibler une structure qui ne se trouve spécifiquement que dans les cellules fongiques telles que la structure de la chitine (Hu et al., 2017 ;Nazzaro et al ., 2017). En conséquence, divers HE et leurs composés individuels ont été largement testés contre diverses souches fongiques (Rahman et al.,2011 ;Tian et al ;2011). Il a été trouvé que l'huile essentielle exerçait une activité antifongique avec des rôles dans le blocage de la communication cellulaire, l'atténuation de la croissance fongique et l'inhibition de la production de mycotoxines (prakash et al., 2012 ;] Böhme et al.,2014 ;Nazzaro et al.,2017)

1.4.3.Activité anti protozoaire

Plusieurs huiles essentielles ont été étudiées pour montrer leur activité anti-protozoaire ,certaines d'entre elles ont été trouvées remarquablement actives (Anthony et al., 2005)(Ueda-Nakamura et al.,2006) ont trouvé *Leishmania* spp.agent responsable de la leishmaniose, très sensible aux huiles essentielles d'*Ocimumgratissimum*.

De plus les principaux constituants des huiles essentielles avec activité antiprotozoaire sont des monoterpénoïdes (linalol, terpinène4-ol, thymol, carvacrol, citral, limonène, α -pinène, γ -terpinène, α -phellandrène et p-cymène), sesquiterpènes (β -caryophyllène,nérolidol, -copaène, cypérène et germacrène D) et des phénylpropanoïdes (eugénol, méthyl chavicol et cinnamaldéhyde),qui sont responsables de leurs effets biologiques (Lianet et al.,2012).

1.4.4. Activité antivirale

Plusieurs HEs sont avérées antivirales, et elles ont différents modes d'action sur les virus; en général, ils agissent en ciblant les polymérases d'acide nucléique. Les propriétés antivirales des HE peuvent être une alternative prometteuse à l'avenir, car davantage d'essais humains doivent être menés afin de fournir des preuves plus appuyées en termes d'efficacité et de sécurité (Aljaafari et al., 2021).

Certains composés des huiles essentielles ont montré une réponse efficace contre les virus grâce à une activité viricide, empêchant la réplication virale et l'adsorption des virus sur les cellules hôtes (Schnitzler., 2019).

Une étude a prouvé l'activité antivirale de plusieurs HEs des plantes, notamment *Zataria multiflora*, *Eucalyptus caesia*, *Artemisiakermanensis*, *Saturejahortensis* L. et le Romarin contre l'herpès simplex virus-1 (HSV-1) en utilisant le test de réduction de plaque (Gavanji et al., 2015). Cependant, l'HE du thymus a été testée contre le HSV et la grippe et n'a montré aucun résultat efficace (Bektas et al., 2016). Dans une étude différente, le β -caryophyllène, qui est présent dans de nombreuses HE, a été examiné pour son activité viricide contre les protéines du virus de la dengue (DENV), et des résultats importants ont été rapportés car il agissait sur l'inhibition de la réplication du (DENV) (Moo et al., 2020 ; Pájaro-Castro., 2015).

1.5. Localisation dans la plante

Le règne végétal contient un grand nombre de plantes aromatiques, environ 17500 plantes, et les huiles essentielles y sont présentées car elles sont stockées dans toutes les parties de la plante (Belakhder., 1997).

Les HEs sont synthétisées au niveau des glandes sécrétoires que l'on trouve dans la plupart des parties de la plante, ou elles sont sécrétées dans le cytoplasme de certaines cellules et peuvent s'accumuler sous forme de petites gouttelettes. Le tableau ci-dessous regroupe les organes des plantes pouvant fournir les huiles essentielles:

Tableau 1 : organes de certaines plantes riches en huiles essentielles (Garneau , 2005).

Organes	Plantes
Feuille d'Angiospermes	<i>Romarin</i>
Feuilles de gymnospermes	<i>Sapin</i>
Tiges	<i>Citronnelle</i>
Ecorces	<i>Cannelier</i>
Racines	<i>Angelica</i>
Rhizomes	<i>Acorus</i>
Bulbes	<i>Oignon</i>
Bois	<i>Santal</i>
Fruits	<i>Citron</i>
Fleurs	<i>Jasmin</i>
Grains	<i>Aneth</i>

1.6.Composition chimique des HEs

Les huiles essentielles ont une composition chimiques très complexes, pouvant renfermer plus de 300 composés différents, ces composants volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes c'est-à-dire dérivés de l'isoprène et non du benzène, et des composés oxygénés (alcools, esters,aldéhydes,cétones,) (**Grand wald.,2007**). Ces composants appartiennent à deux groupes différents: les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivées du phénylpropane (**Bruneton.,1999**).

1.6.1.Les terpènes

Constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétale, elles sont caractérisées par une squelette qui contient une unité isoprénique à 5 atomes de carbone (C5) (**Lamarti.,1994**). Ces isoprènes sont des véritables précurseurs de la molécule terpénique.

Les systèmes enzymatiques responsables de cette conversion en composés terpéniques dans: lecytoplasme, mitochondrie et plastes, sont hydrosolubles et permet

l'élongation de la chaîne isoprénique conduisant à tout l'éventail des composés terpéniques à 10, 15, 20, 30 atomes de carbone (**Lamarti, 1994**), seules les terpènes dont la masse moléculaire est relativement faible sont rencontrés dans les huiles essentielles (**Brunetton, 1999**).

1.6.1.1. Les mono terpènes

Les composés mono terpéniques constitués de deux unités d'isoprène, leur formule chimique brute est $C_{10}H_{16}$ (**Rahal, 2004**), ces composés peuvent être: monoterpènes acycliques (myrcène, ocimène), monocyclique (α - et γ -terpinène, p-cymène) et mono terpènes bi cycliques (pinènes, Δ^3 -carène, camphène, sabinène). La réactivité des cations intermédiaires montre la présence de nombreuses molécules caractérisées par différentes fonctions (alcool, ester, aldéhyde, éthers, peroxydes de phénols (**Brunetton, 1999**)).

1.6.1.2. Les sesquiterpènes

Ils se composent de trois unités d'isoprène, leur formule brute est $C_{15}H_{24}$. On note une grande diversité dans leurs structures (**Rahal, 2004**). Les sesquiterpènes peuvent être Acycliques (farnésol), Monocycliques (humulène, α -zingibèrene) ou encore Polycycliques (matricine, artéannuine). et peuvent aussi renfermer aussi des fonctions alcools (Farnésol, carotol, patchoulol), des cétones comme (nootkatone), des aldéhydes (sinensal), des esters (acétate de cédrile) (**Brunetton, 1999**).

1.7. Usage

Les HES occupent une place importante dans divers secteurs économiques, à titre d'exemple dans l'industrie alimentaire, l'industrie agroalimentaires, l'industrie pharmaceutiques et dans l'industrie de la cosmétologie et de la parfumerie.

1.7.1. En pharmacie

Plusieurs principes actifs des plantes aromatiques entrent dans la fabrication de plus de 40 médicaments. Selon **Pascal, (2005)**, on peut utiliser les huiles essentielles en pharmacie pour les raisons suivantes:

- L'huile de Lavande : pour détendre le corps et calmer le stress, sur la peau, améliorer la qualité du sommeil
- L'huile de citron : fraîcheur, débarrasser le corps des toxines, détoxifiants, lute

contre trouble de système immunitaire.

- L'huile de menthe poivrée : Traitement des maladies inflammatoires chroniques intestinales, traitement de diarrhée et constipation
- L'huile d'origan : stimule la défense immunitaire ;, et pour traiter le rhume
- L'huile d'Arachide : anti gastrique, hypocholestérolémiante
- L'huile de carthame : adoucissant de l'intestin, antirhumatismale
- L'huile de colza : anti thrombus
- L'huile de noisette : hypotensive, anti lithiasique
- L'huile de pavot : améliore la circulation sanguine
- L'huile d'olive : draineur hépatique

1.7.2.En cosmétique

Sur le plan dermatologique, les HEs sont largement utilisées, surtout pour traiter les infections dermiques. C'est le cas de la citronnelle, qui est connue pour ses vertus antifongiques; en pharmacologie, elle fait partie de la base des crèmes antimycosiques applicables sur toutes les parties du corps.

L'huile essentielle de lavande est utilisée pour soigner et entretenir la peau, elle est incorporée dans les savons et dans d'autres produits cosmétiques, elle est également utilisée dans le traitement des dermatoses (**Chemat et Fernandez.,2012**).

Les principaux HE utilisés sont :

- L'huile de Lavande : régénération de la peau, pour traitement des rides et des blessures ;
- L'huile de Citron : contre le vieillissement de la peau ;
- L'huile de rose : traitement d'eczéma, et de sécheresse cutanée et traitement de cicatrices ;
- L'huile de rose musquée : stimule les rides, contre les cicatrices et bon hydratant de la peau ;
- L'huile de l'arbre à thé : traitement d'acné, herpes et blessures ouvertes ;
- L'huile de soja : douceur de la peau, masque antirides;
- L'huile de Romarin : pour traiter les cheveux, et traitement d'eczéma.

1.7.3.En industrie alimentaire

Les huiles essentielles sont utilisés comme des exhausteurs de gout et des arômes, conservateurs des aliments et des antioxydants et antimicrobiens, et ceci dans le domaine de la confiserie, produits laitiers, soupes et sauces (**Richard, 1992**).

Selon (**Oosaleh., 2007**), les huiles essentielles peuvent être utilisées comme: Conservateur alimentaire:

- L'huile de cannelle, origan et thym par leur efficacité sur les viandes, volailles et légumes.
- L'huile de menthe pour les légumes frais comme le yaourt et salade.

1.7.4.En agroalimentaire

La consommation d'huiles essentielles dans l'agroalimentaires suit la croissance de la consommation de produits préparés, ceci en réponse à une demande croissante de produits naturels de la part des consommateurs et à la mauvaise publicité faite aux conservateurs de synthèse.

Le domaine le plus grand consommateur des huiles essentielles est celui des boissons gazeuses celle qui est la plus utilisée dans le monde pour l'agroalimentaire est celle d'orange douce (*Citrus sinensis* (L)) (**Garneau, 2005**).

1.8. Techniques d'extraction des huiles essentielles

1.8.1. Hydrodistillation

L'hydro-distillation est une méthode simple et ancienne, effectuée dans un appareil appelé Clevenger, elle consiste à une immersion directe de la plante (intacte, écrasée) dans l'eau (**Bruneton, 1999**), qui est ensuite portée à l'ébullition, sous l'influence de la température, les cellules végétales sécrètent leur contenu (**Luccherie, 2005**), dont les huiles essentielles qui seront récupérées par décantation.

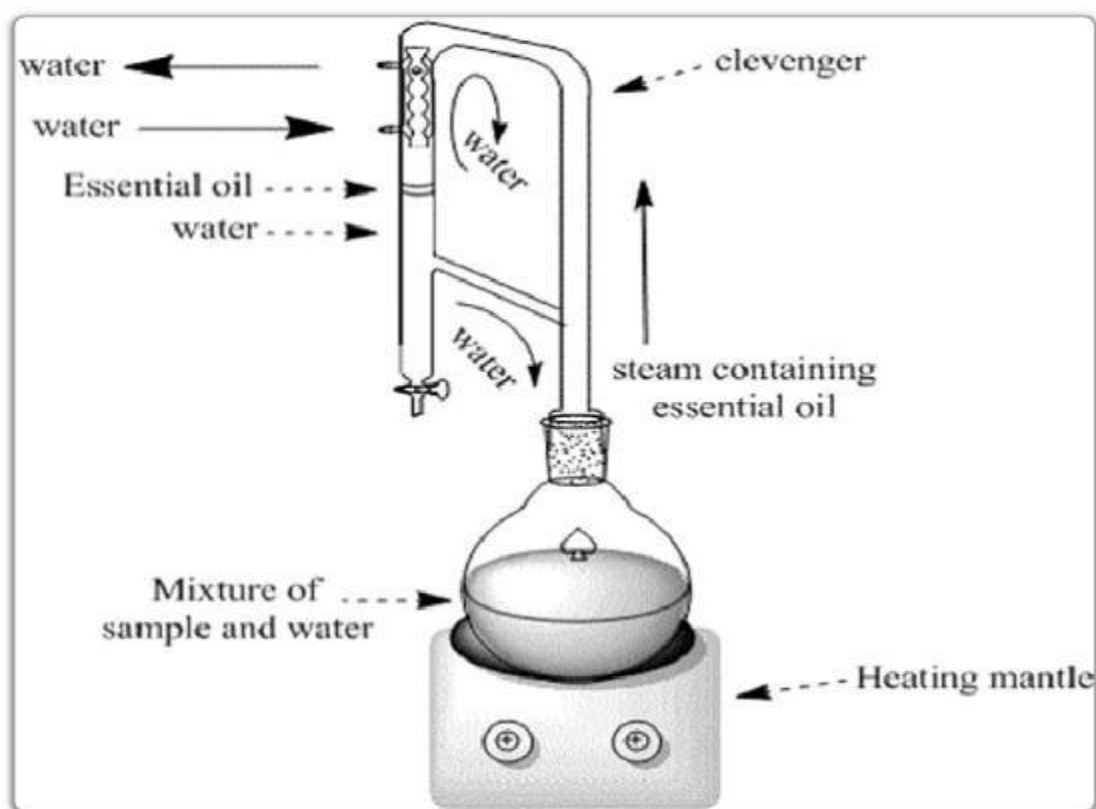


Figure 01: Extraction d'huile essentielle par l'hydro distillation

1.8.2. Entrainement à la vapeur d'eau

Contrairement à l'hydro-distillation, dans la technique d'entraînement à la vapeur d'eau, le matériel végétal est en contact avec une vapeur directe, produite dans l'équipement, ou par la vapeur indirecte produite à l'extérieur et conduite vers ce dernier, le tout se passe sous pression ($<0,1$ bar), cette vapeur va entrainer les composés volatils par action osmotique (Lahlou, 2004). Les méthodes d'hydrodistillation et d'entraînement à la vapeur d'eau demeurent les deux méthodes les plus adoptées en production commerciale des huiles essentielles (Carson et Hammer, 2011).

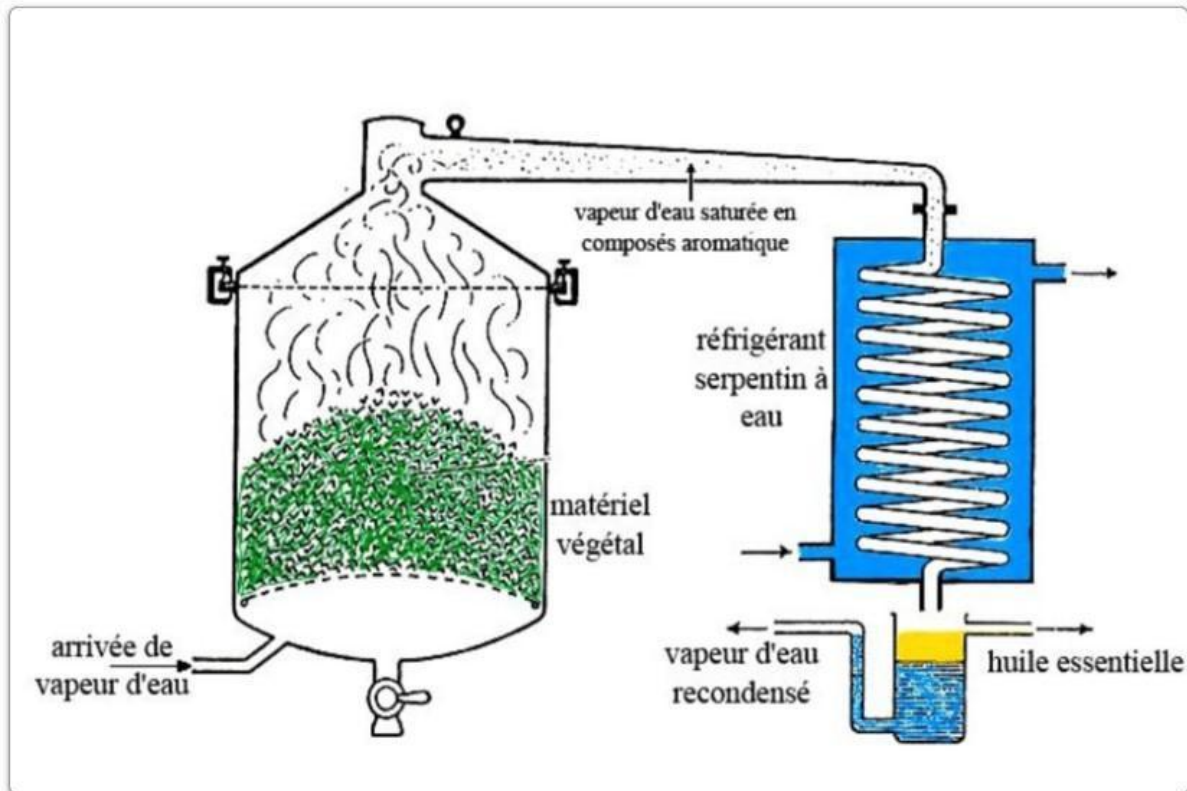


Figure 02: Entraînement à la vapeur d'eau

1.8.3.Extraction au CO₂ supercritique

La méthode d'extraction au CO₂ super critique est un procédé moderne consiste à faire éclater les poches à huile essentielle des plantes et entraîner les substances aromatiques en faisant passer un courant de CO₂ à haute pression dans la masse végétale (Keville et al.,1995; Baysal et al.,1999).

On utilise le CO₂ car il possède de nombreux avantages : il s'agit d'un produit naturel, inerte chimiquement, ininflammable, facile à éliminer totalement, aisément disponible, peu réactif chimiquement et enfin peu coûteux.

Le CO₂ a également la capacité de fournir des extraits de compositions très proches de celles obtenues par les méthodes décrites dans la pharmacopée européenne. tous ces avantages permettent à ce procédé de se développer malgré un investissement financier important. (Keville et al, 1995 ;Baysal et al,1999).

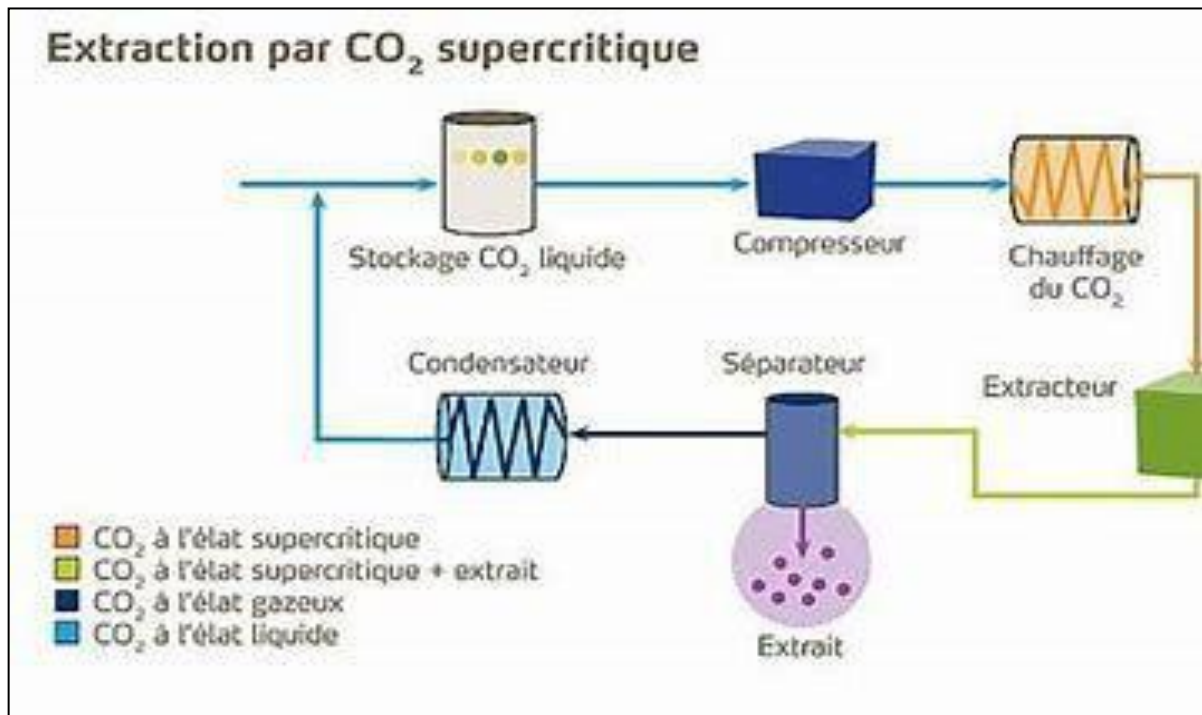


Figure 03: Extraction par CO₂ supercritique

1.8.4. Extraction assistée par micro-onde

L'extraction assistée par micro-onde est une technique permettant d'obtenir des huiles essentielles qui a été développée au début des dernières décennies à des fins analytiques, elle consiste à irradier la matière végétale d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes pour l'extraction des composés apolaires. Le mélange est chauffé sans atteindre l'ébullition durant des courtes périodes séparées par des étapes de refroidissement, l'avantage de cette technique est de réduire la durée de distillation et d'obtenir un bon rendement en huile essentielle (Wang et al., 2006)

1.8.5. L'expression à froid

C'est la technique d'extraction la plus simple mais très limitée, elle est réservée à l'extraction des composés volatils dans les péricarpes des hespéridés ou encore d'agrumes, qui sont très importants en cosmétiques et en parfumerie, ces produits sont très fragiles car ils sont constitués de terpènes. Il s'agit d'un traitement dynamique qui consiste à déchirer les péricarpes riches en cellules sécrétrices, et libérer leur contenu en essence puis recueillir par un courant d'eau. L'avantage de cette technique est d'obtenir tout le contenu d'huile essentielle de la plante (Anton et Lobstein., 2005).

2. Présentation des espèces étudiées

Le genre *Artemisia* appartient à la famille des Astéraceae : c'est l'un des genres les plus répandus de cette famille et il contient environ 400 espèces. Ce genre est très riche en flavonoïdes, acides caféoylquiniques, les coumarines, les stéroïdes qui sont des métabolites secondaires (**Kundon et Anupam, 2010**).

2.1. *Artemisia herba-alba* Asso.

2.1.1. Description botanique

L'armoise blanche est une plante herbacée à tiges ligneuse et ramifiées, de 30 à 50 cm, très feuillée avec une couche épaisse, les feuilles sont petites, sessiles, pubescentes et à aspect argenté, les fleurs sont groupées en grappes, à capitule très très petite (3/1,5mm) et ovoïde l'involucre est à bractées imbriquées, les externes orbiculaires et pubescentes. le réceptacle floral est nu avec 2 à 5 fleurs jaunâtres par capitules toutes hermaphrodites (**Pottier-Aiapetite, 1981**).



Figure 04: Aspect morphologique de l'espèce *Artemisia herba alba* Asso.

2.1.2. Systématique

La classification botanique d'*Artemisia herba-alba* est la suivante (Boulos et al., 2002, Valles et al., 2003):

Tableau 2 : Systématique de l'espèce *Artemisia herba alba* Asso

Royaume	<i>Plantae</i>
Sous-Royaume	<i>Tracheobionta</i>
Superdivision	<i>Spermatophyta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Asteridae</i>
Ordre	<i>Asterales</i>
Famille	<i>Asteraceae</i>
Sous-famille	<i>Asteroideae,</i>
Tribu	<i>Anthemideae</i>
Sous-tribu	<i>Artemisiinae</i>
Genre	<i>Artemisia L.</i>
Sous-genre	<i>Seriphidium</i>
Espèce	<i>Artemisia herba-alba</i> Asso.

2.1.3. Habitat

Le genre *A. herba-alba* est un arbuste nain médicinal et aromatique qui pousse à l'état sauvage dans les zones arides du Bassin méditerranéen, s'étendant jusqu'au nord-ouest de l'Himalaya. Cette plante est abondante dans la péninsule ibérique et atteint une population plus élevée dans le centre de l'Espagne s'étendant de l'est au sud-est. Ce taxon pousse à l'état sauvage sur des substrats nitrofilés et riches en gypse (Salido et al., 2004 ; Dunn et al., 1996).

L'armoise blanche est largement répandue aussi depuis les îles canariennes jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan), et à travers l'Afrique du nord (

Nabli , 1989).

2.1.4. Usage

Artemisia herba-alba Asso, également connue sous le nom d'absinthe du désert (connue en arabe sous le nom de shih, Armoise blanche (Segal et al.,1987) a été utilisée en médecine populaire par de nombreuses cultures depuis l'Antiquité, utilisée en médecine traditionnelle marocaine pour traiter l'hypertension artérielle et/ou le diabète (Ziyyat et al.,1997 ;Zeggwagh et al,2008). La tisane de cette espèce a été utilisée comme agent analgésique, antibactérien, antispasmodique et hémostatique (Laid et al.,2008). Lors d'une étude ethnopharmacologique enquête menée parmi les Bédouins du désert du Néguev, il a été constaté que *l'Artemisia herba-alba* soulage les troubles de l'estomac (Friedman et al.,1986). Cette plante est également suggérée pour être importante comme fourrage pour les moutons et pour le bétail dans les régions des plateaux d'Algérie où il pousse abondamment (Fenardjiet al.,1994;Benmansour et al.,1998). *Ascaridae* de porcs et de vers terrestres ont été tués par l'huile de *l'Artemisia. herba-alba* provenant de la Lybie en peu de temps . (Callegari et Rossi , 1939).

2.2. *Artemisia campestris* L.

2.2.1. Description botanique

C'est un arbuste, qui a de longues tiges d'une hauteur d'environ 30 à 80 cm et formé de très petites capitules de fleurs de forme ovale ou conique et très étroites, à involucre scarieux , contient un petit nombre de fleurs de (3à8), de couleur jaunâtre bordées de rouges, et à pédoncule muni de poils blanchâtres à brunâtre, des feuilles glabres de couleur verte foncée mais les inférieurs sont dipennatiséquées, et les supérieurs pennatiséquées, les basales pétiolés et auriculés ainsi que les tiges sont ligneuses à base striée ; (Quezel et Santa , 1962 ; Ozenta p , 1983 ; David A, Hervé M , 1994) .



Figure 05: Aspect morphologique de l'espèce *Artemisia campestris* L.

2.2.2. Systématique de *Artemisia campestris* L (Caratini , 1971)

Tableau 3 : Systematique de l'espèce *Artemisia campestris* L.

Règne	<i>Plantae</i>
Sous règne	<i>Tracheobionta</i>
Embranchement	<i>Spermatophyta</i>
Sous embranchement	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliophyta</i>
Sous Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Ordre	<i>Asteridae</i>
Famille	<i>Asterales</i>
Sous famille	<i>Asteraceae</i>
Tribu	<i>Asteroidae</i>
Sous tribu	<i>Anthemidae</i>
Genre	<i>Artemisia</i>

Espèce

Artemisia campestris L

2.2.3. Habitat et distribution

Le genre *Artemisia* contient un grand nombre d'espèces qui poussent de façon spontanée dans plusieurs régions de l'hémisphère nord de la terre, dans le bassin méditerranéen et dans les zones semi-arides et l'Himalaya (**Vernin et al, 1995**), dans l'hémisphère sud en Australie, Afrique de sud, Amérique de sud (**Kyong, 2007**)

2.2.4. Usage

Depuis des milliers d'années l'*Artemisia campestris L.* a été utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies et symptômes tels que les troubles digestifs, les ulcères, les douleurs menstruelles (**Dob et al., 2010**), aussi pour traiter les brûlures, morsures de serpents, eczéma, gastroentérite, la dysenterie, la fièvre, la toux et les infections urinaires (**Ben sassi et al., 2007**).

2.3. *Rosmarinus tournefortii* de Noé

2.3.1. Description botanique

Rosmarinus tournefortii de Noé est un arbuste odorant, d'une hauteur de 1,5 jusqu'à 2 m, leurs feuilles persistantes sans pétiole longues et larges, aux bords enroulés d'une couleur verte sombre luisant sur le dessus, et blanchâtres en dessous (**Jekka Mc Vicar, 2006**), avec des fleurs groupées en grappe d'une couleur variant entre le bleu pâle et violet, leur calice est velu à dents bordées de blanc (**Jekka Mc Vicar, 2006**).



Figure 06 : Aspect morphologique de l'espèce *Rosmarinus tournefortii* de Noé.

2.3.2. Systématique de *Rosmarinus tournefortii*

Tableau 4 : Systématique de l'espèce *Rosmarinus tournefortii* de Noé

Règne	Plantae
Embranchement	<i>Spermaphytes</i>
Classe	<i>Dicotylédones</i>
Ordre	<i>Lamiales</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Genre	<i>Rosmarinus</i>
Espèce	<i>Rosmarinus tournefortii</i> de Noé

2.3.3.Habitat

L'origine principal de RT de Noé est du bassin méditerranéen, généralement dans les terrains arides et ensoleillés (**H.panda , 2009**).

2.3.4. Usage

Le Romarin est largement utilisé en cuisine, ainsi que dans les domaines d'industrie agroalimentaire et cosmétique, et surtout pour préparer la marinade et pour la fabrication de parfum (**Comilleknockaert, 2002**), Il favorise les fonctions d'élimination rénale et digestive et dans le traitement Symptomatique de troubles digestifs (**Bruneton, 1993**).

2.4. *Thymus hirtus* Willd.

Parmi les plantes aromatiques appartenant à la famille des Lamiacées, le genre *Thymus* se distingue par les nombreuses espèces et variétés de plantes sauvages. Ce genre comprend environ 400 espèces de plantes herbacées vivaces aromatiques, persistantes ou semi-persistantes avec de nombreuses sous-espèces, variétés, sous-variétés et forme. (**De Martino et al .,2009**).

2.4.1.Description botanique

Thymus hirtus Willd produit 2 types d'individus, certains avec des fleurs femelles sans étamines et d'autres avec des fleurs hermaphrodites. (**Guesmi et al.,2019**).



Figure 07 : Aspect morphologique de l'espèce *Thymus hirtus* Willd.

2.4.2. Classification

D'après Stahl Biskup et Saz.,2002, la classification de *Thymus hirtus* willd est la Suivante :

Tableau 5 : Systématique de l'espèce *Thymus hirtus* Willd

Règne	<i>Plantae</i>
Classe	<i>Menthea</i>
Famille	<i>Lamiaceae</i>
Sous famille	<i>Neptoidae</i>
Genre	<i>Thymus</i>
Espèce	<i>Thymus hirtus willd.</i>

2.4.3.Habitat

distribue du bioclimat subhumide au bioclimat aride inférieur à une altitude allant de 120 à 1100m.(**pottier-Alapetit.,1981 ;Nabli.,1995**),Il pousse sur des marnes calcaires, rocheuses et occasionnellement sur des sols gypsifères faisant partie des formations arbustives ouvertes et vit dans des conditions climatiques extrêmes concernant la température et l'approvisionnement en eau.(**Morales.,1996**)

2.5. Usage

L'huile de thymus est parmi les dix meilleures huiles essentielles au monde, affichant des propriétés antimicrobiennes (**Amarti F et al.,2008**),antimycosique, antioxydant (**Zouari .,2011**)conservateur alimentaire, antifongique (**Teimouri M .,2012**),elle est utilisée comme ingrédients aromatiques dans une grande variété de produits alimentaires, de boissons et de confiserie, ainsi qu'en parfumerie pour parfumer les savons et lotions. En raison de leurs propriétés antiseptiques, antispasmodiques et des propriétés antimicrobiennes, ils sont également utilisés à des fins médicinales (**El-Hela,2007 ; Cosentino ,1999**).

Ces dernières années, plusieurs rapports ont été publiés concernant la composition et/ou la propriétés biologiques des huiles essentielles de thymus. Ces études ont souligné l'existence de différences chimiques entre les huiles extraites de différentes espèces ou variétés. Plus de 20 indispensables des chémotypes d'huile ont été observés chez différentes espèces du genre *Thymus* (**Lawrence ,2002**), mais, en revanche, différents les chémotypes peuvent pousser dans le même habitat, donc l'étude de ce genre pourrait être intéressante (**Ložiene.,2005**)

Chapitre 2 :

Matériel et Méthodes

L'objectif de notre travail est l'étude de l'activité antibactérienne d'un mélange de 4 huiles essentielles des plantes : *Artemisia herba alba* Asso, *Artemisia campestris* L, *Rosmarinus tournefortii* de Noé et *Thymus hirtus* willd.

La partie expérimentale a été réalisée aux laboratoires du Hall technologique, de l'**Université Abbés Laghrou – Khenchela**, elle comprend toutes les techniques et les expérimentations à savoir l'extraction de l'huile essentielle et l'étude de l'activité antibactérienne par méthode de diffusion par disque, technique de microdilution pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI), et finalement la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).

1. Préparation du matériel végétal

Nous avons travaillé sur la partie aérienne (tiges, feuilles, et fleurs), de la plante *Thymus hirtus* willd., dont l'identification botanique a été faite par Pr. OUDJEHIH Bachir, du Département d'Agronomie, Université Batna 1. Ensuite, cette plante disponible à l'état sauvage a été collectée durant le mois de Mars dans la région de Bouleuf, commune de Fesdis wilaya de Batna, à l'est de l'Algérie, puis séchée à l'ombre et à l'aire libre pendant 20 jours. Ensuite, un broyage de la plante a été réalisé pour passer à l'extraction des huiles essentielles. Le reste des huiles essentielles formant les mélanges étudiés ont été fournis par Dr. BERTELLA Anis.



Figure 08 : Carte géographique de la wilaya de Batna ; commune de Fesdis, Bouielf



Plante séchée



Plante broyée

Figure 09 : Préparation du matériel végétale de la plante *Thymus hirtus* Willd.

2. Extraction de l'huile essentielle

L'huile essentielle de *Thymus hirtus* Willd a été extraite selon la technique décrite par (Outaleb et al., 2020), elle a été obtenue par Hydro-distillation dans un appareil de type Clevenger, où 50 g de plante est introduite dans un ballon de 1 litre, puis rempli de 0,5 L de l'eau distillée. Le temps de l'extraction est estimé à 3 h (Figure (A)). L'huile essentielle est distinguée de l'hydrolat (eau aromatique) par différence de densité et par sa couleur jaunâtre, ensuite, elle est récupérée par décantation (Figure (B)) et séchée par l'ajout du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), enfin conservée dans un flacon fermé et stocké dans un endroit frais (4°C) à l'abri de la lumière (Figure (C)).

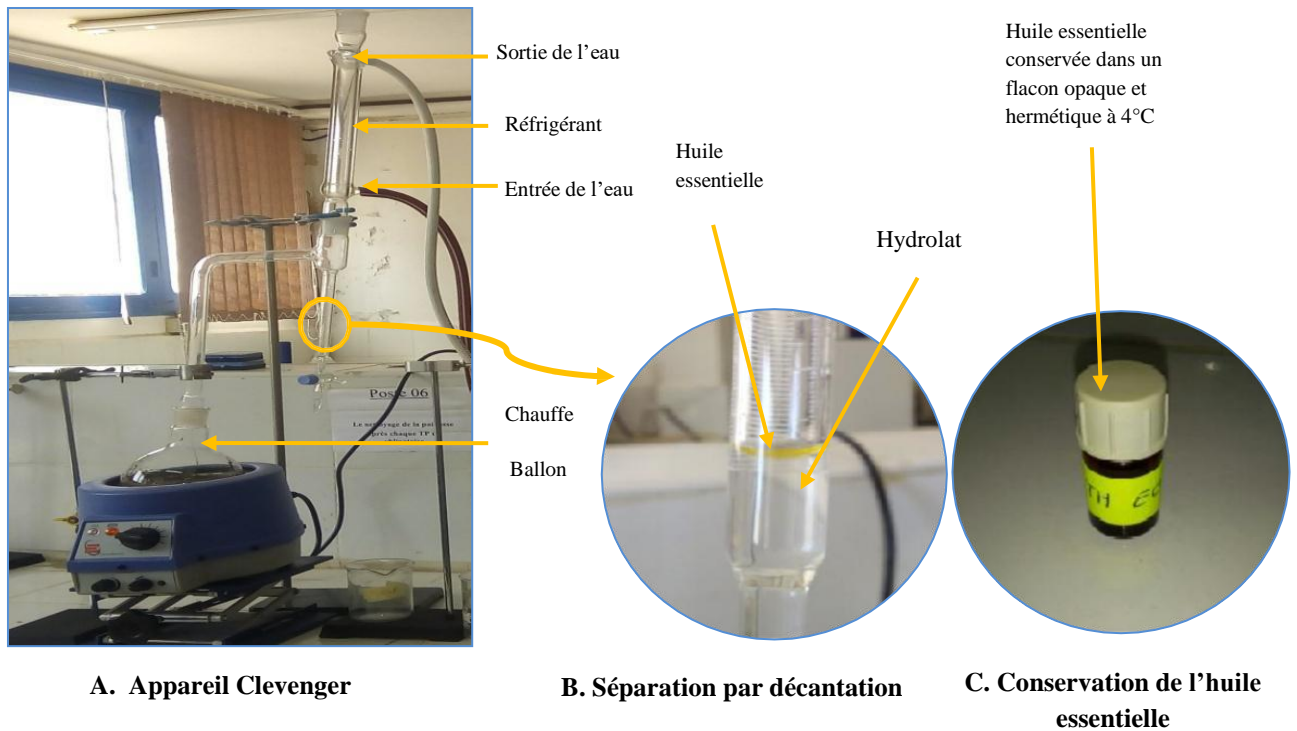


Figure 10: Procédé d'extraction de L'huile essentielle par hydro distillation

3. Détermination du rendement en huile essentielle

Le rendement en l'huile essentielle (RHE) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal et il est souvent obtenu par la formule ci-dessous décrite par **Adda et al., (2020)**:

$$\text{RHE \%} = (\text{MHE} / \text{MEV}) \cdot 100$$

- RHE: Rendement en huile essentielle en (%);
- MHE : La masse de l'huiles essentielle (g);
- MEV : masse du matériel végétal (g).

4. Etude de l'activité antibactérienne

Le test d'activité antibactérienne a été faite pour les huiles essentielles seules d'*Artemisia herba alba* , *Artemisia campestris* ,*Rosmarinus tournefortii* et *Thymus hirtus* ,ensuite en combinaison (mélange) par 5 ratios différents selon : la méthode de diffusion sur disque , la méthode de microdilution sur plaque pour déterminer la concentration minimale inhibitrice et

dernièrement la détermination minimale bactéricide en milieu solide.

4.1.Souches bactériennes

L'activité antibactérienne de notre mélange d'huile essentielle a été testée sur un ensemble de bactéries, qui sont responsables des infections nosocomiales et dont certaines d'entre eux sont résistantes aux antibiotiques voir même multi résistantes comme *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus*. (Elamri et al., 2014), certains sont résistantes comme *Klebsiella pneumoniae* (Saeed et al., 2013) et d'autres sont sensible comme *Escherichia coli* (Akinyemi et al., 2006).

Ces souches ont été fournies par le laboratoire d'analyse médical s services bactériologiques de Batna et kenchela. Vous pouvez ajouter le profil d'antibiogramme.

Tableau 06 : Les souches bactériennes

Bactéries	Gram	Nature du prélèvement clinique
<i>Escherichia coli</i>	-	Urine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Pus
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	Urine
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Urine
<i>Enterococcus sp</i>	+	Urine

Au cours de notre expérimentation, on a préparé chaque jour les milieux de culture suivants:

- Gélose nutritive (GN) : milieu d'isolement et de conservation non sélectif.
- Gélose Mueller Hinton (MHS) : milieu pour l'étude de la sensibilité des bactéries.
- Bouillon Mueller Hinton (MHB) plus Tween 80 (0,01%) v/v: milieu pour l'étude de la concentration minimale inhibitrice, ainsi le rôle de Tween 80 est pour solubiliser l'huile essentielle.

Tous les milieux sont autoclavés à 121°C pendant 20 minutes.

4.2.Repiquage des souches bactériennes

L'activité antibactérienne a été réalisée sur des cultures jeunes en phase de croissance exponentielle, alors un repiquage des souches bactériennes est effectué en prenant un volume couvrant la boucle de l'anse de platine que l'on a ensemencé sur des boites de pétri contenant de la gélose nutritive, tout en travaillant dans des conditions aseptiques. Puis

incubées à 37°C pendant 24h.

4.3.Préparation de l'inoculum bactérien

Avec une anse de platine stérile et à partir des cultures précédemment préparées, On a pris 2 à 4 colonies bien isolées et on les a déposés dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau physiologique stérile. Après on a fait une homogénéisation de la suspension bactérienne à l'aide d'un vortex elle a été ajustée à une densité de 0,5 McFarland (1.10^7 UFC /ml)

4.4.Préparation des mélanges des huiles essentielles

La préparation des mélanges des huiles essentielles a été faite selon l'ordre des huiles comme suit : *Rosmarinus tournefortii* ,*Artemisia herba alba* , *Thymus hirtus*,*Artemisia campestris*, cette préparation comprend 5 mélanges avec différents ratios.

A l'aide d'une balance précise et une micropipette on a pesé le volume de premier huile après on a ajouté le volume de deuxième huile ensuite en a continué jusqu'a on obtient un poids finale d'un mélange de 4 huiles essentielles.

	RT	AHA	TH	AC
Mélange (M1)	200	200	200	200
Mélange (M2)	350	50	50	50
Mélange (M3)	50	350	50	50
Mélange (M4)	50	50	350	50
Mélange (M5)	50	50	50	350

Figure 11 : Les volumes des mélanges des huiles essentielles préparés par μ l

Les résultats des poids des mélanges des huiles sont regroupé dans le tableau ci-dessous

Tableau 07 : les mélanges des huiles essentielles

Mélanges	Ratio <i>RT,AHA,TH,AC</i>	<i>RT</i>		+ <i>AHA</i>		+ <i>TH</i>		+ <i>AC</i>	
		V(µl)	P(g)	V(µl)	P (g)	V(µl)	P(g)	V(µl)	P(g)
M1	1 :1 :1 :1	200	0,1766	200	0,1682	200	0,0779	200	0,2504
M2	7 :1 :1 :1	350	0,3119	50	0,0424	50	0,0210	50	0,0490
M3	1 :7 :1 :1	50	0,0432	350	0,2870	50	0,0459	50	0,0511
M4	1 :1 :7 :1	50	0,0436	50	0,0450	350	0,2961	50	0,0564
M5	1 :1 :1 :7	50	0,0460	50	0,0434	50	0,0443	350	0,3089

RT : *Rosmarinus turneforii* de Noé ; *AHA* : *Artemisia herba alba* ; *TH* : *Thymus hirtus* willd ; *AC* : *Artemisia campestris* L ; **V** : Volume ; **P** : Poids

4.5. Préparation des disques

Les disques servant à l'étude de l'activité antibactérienne par diffusion sur disque ont été préparé préalablement, cette préparation est faite à partir du papier filtre qui est découpé en disques de 6 mm de diamètre, ensuite ces disques sont placés dans un tube eppendorf pour la stérilisation à l'autoclave pendant 25 mn à 120°C.

4.6. Méthode de diffusion sur disque

L'activité antibactérienne a été étudiée en premier lieu par la technique de L'aromatogramme décrite par (khrich et al., 2018). Par conséquent, dans des conditions aseptiques et à la surface de boites contenant la gélose Muller Hinton préalablement coulée, on a écouvillonné la suspension bactérienne en surface partout et autour du bord du milieu, ensuite à l'aide d'une pince stérile on a déposé au centre de la boîte un disque stérile de papier filtre d'un diamètre de 6 mm et imbibé de 6 µl d'huile essentielle pure. Après, on a laissé les boites de pétri à une température ambiante pendant 15 minutes pour une pré-diffusion. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

La lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition l'aide d'une règle graduée en millimètre (mm).

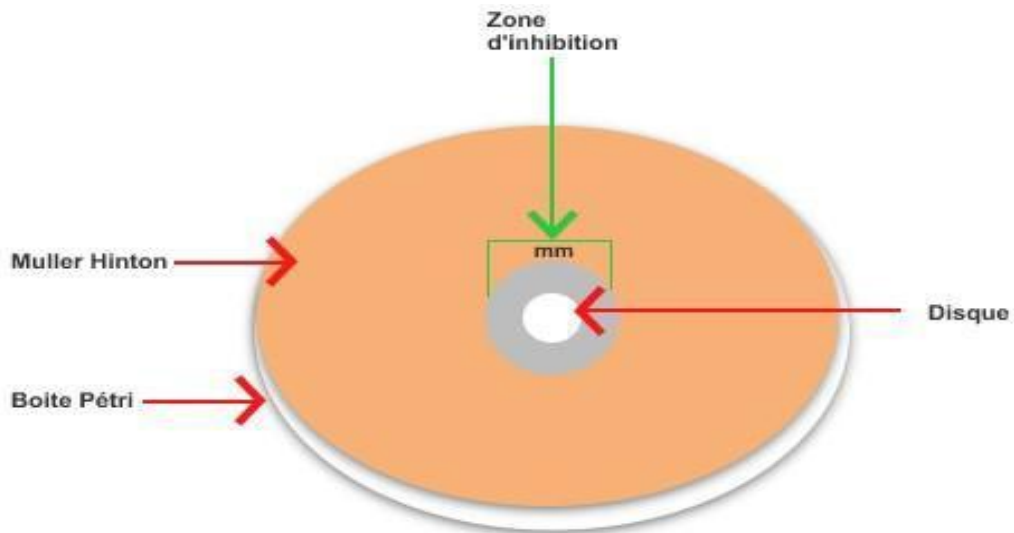


Figure 12: Schéma d'un aromatochrome par méthode de diffusion sur disque

4.7. Préparation des dilutions des huiles essentielles V/V

Les dilutions des huiles essentielles *Artemisia herba alba*, *Artemisia campestris*, *Rosmarinus tournefortii*, *Thymus hirtus willd* et les mélanges M1, M2, M3, M4 et M5 a été faite dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 40% (diluée dans de l'eau distillée, v/v), pour obtenir des concentrations finales de 80, 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25 et 0,625 mg/ml.

Alors à l'aide d'une balance précise et une micropipette, on a pesé premièrement 0,64 g de l'huile essentielle que l'on ajoutée à 1,36 g de DMSO pour obtenir une huile diluée.

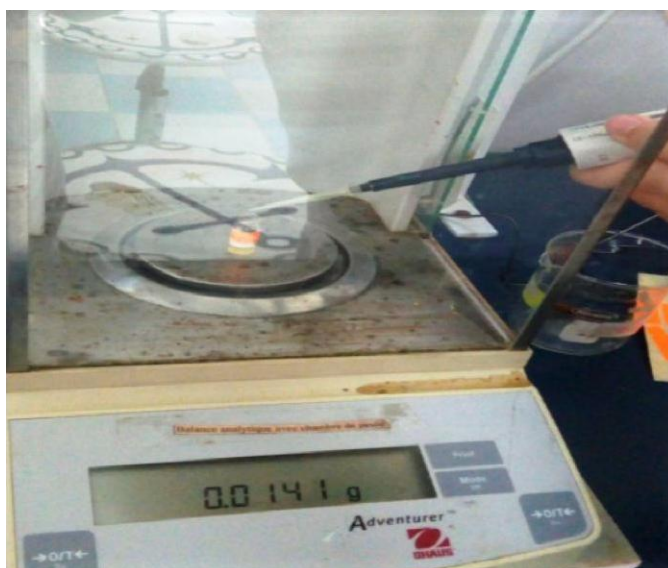
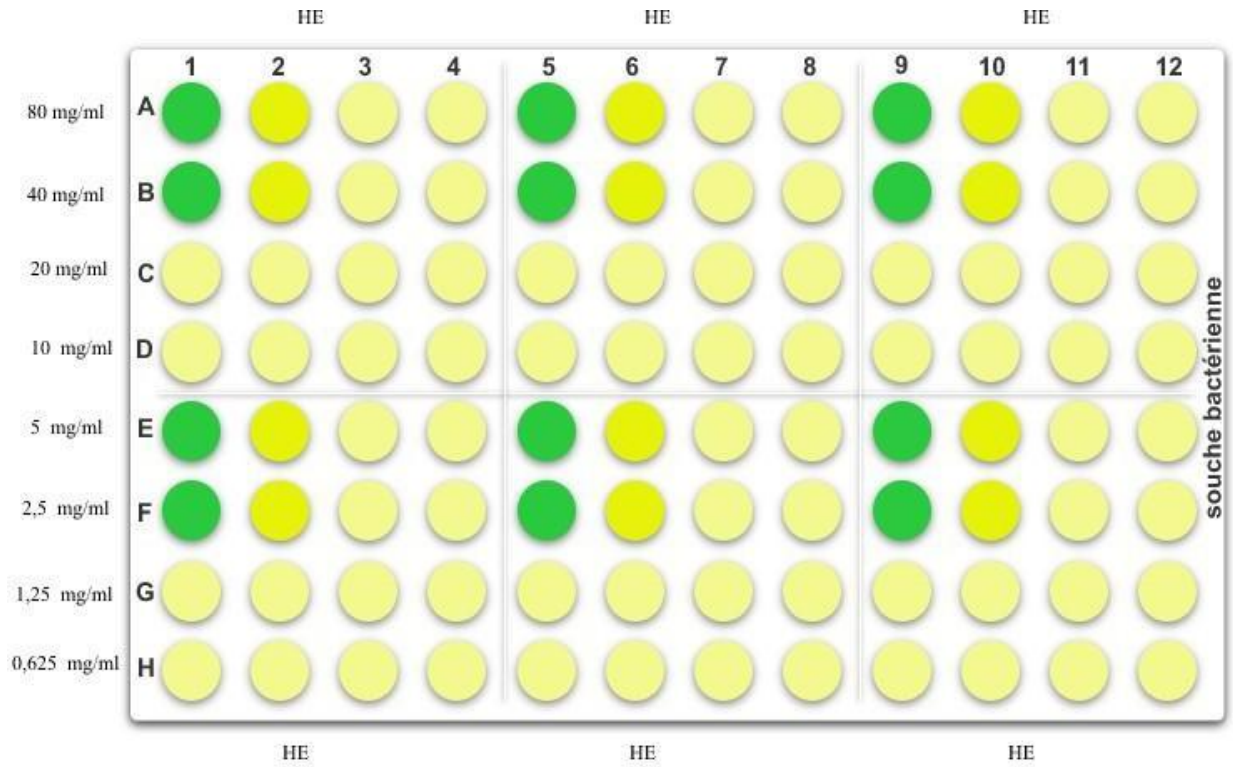


Figure 13: Préparation de la dilution des huiles essentielles par pesage

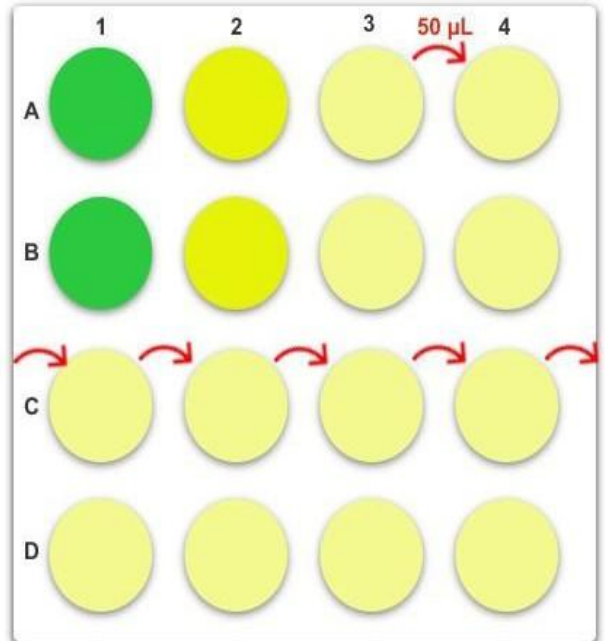
4.8. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La technique de détermination de la CMI est décrite par **Bardaweel et al., 2015**, c'est une valeur qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance de 80% de la population microbienne.

Dans notre cas, nous avons effectué l'expérimentation dans une microplaque de 96 puits, selon la méthode suivante (Figure 6): 50 µl de l'huile essentielle diluée sont déposés dans les puits, sur lesquels on a ajouté 50µl de DMSO, ensuite on a ajouté dans chaque puits 200 µl de BMH plus Tween 80 (0,01%) v/v inoculé avec la suspension bactérienne pour obtenir un volume totale de 300 µl par puits, Ensuite et après une incubation à 37 °C pendant 18 h, la lecture a été effectuée selon la méthode décrite par Elof (1998), en ajoutant à chaque puits 50 µl d'indicateur coloré le 2, 3,5-diphényltétrazolium chloride (TTC) diluée dans de l'eau distillée à l'ordre de 0,2 g/ml. Les microplaques sont laissées à température ambiante pendant 15 min, ensuite on note la présence de bactéries vivantes révélée par l'apparition d'une coloration rouge en présence de TTC.



- 1** 50 μ L DMSO + 200 μ L (SB +BMH)
 Témoin
- 2** 50 μ L HE + 200 μ L (SB +BMH)
- 3** 50 μ L HE + 50 μ L DMSO + 200 μ L (SB +BMH)
- 4** 50 μ L (50 μ L HE + 50 μ L DMSO) + 200 μ L (SB +BMH)



SB:Suspension bactérienne;HE:Huille essentielle;BMH: Bouillon muller Hinton;DMSO:Dimethylsulfoxyde.

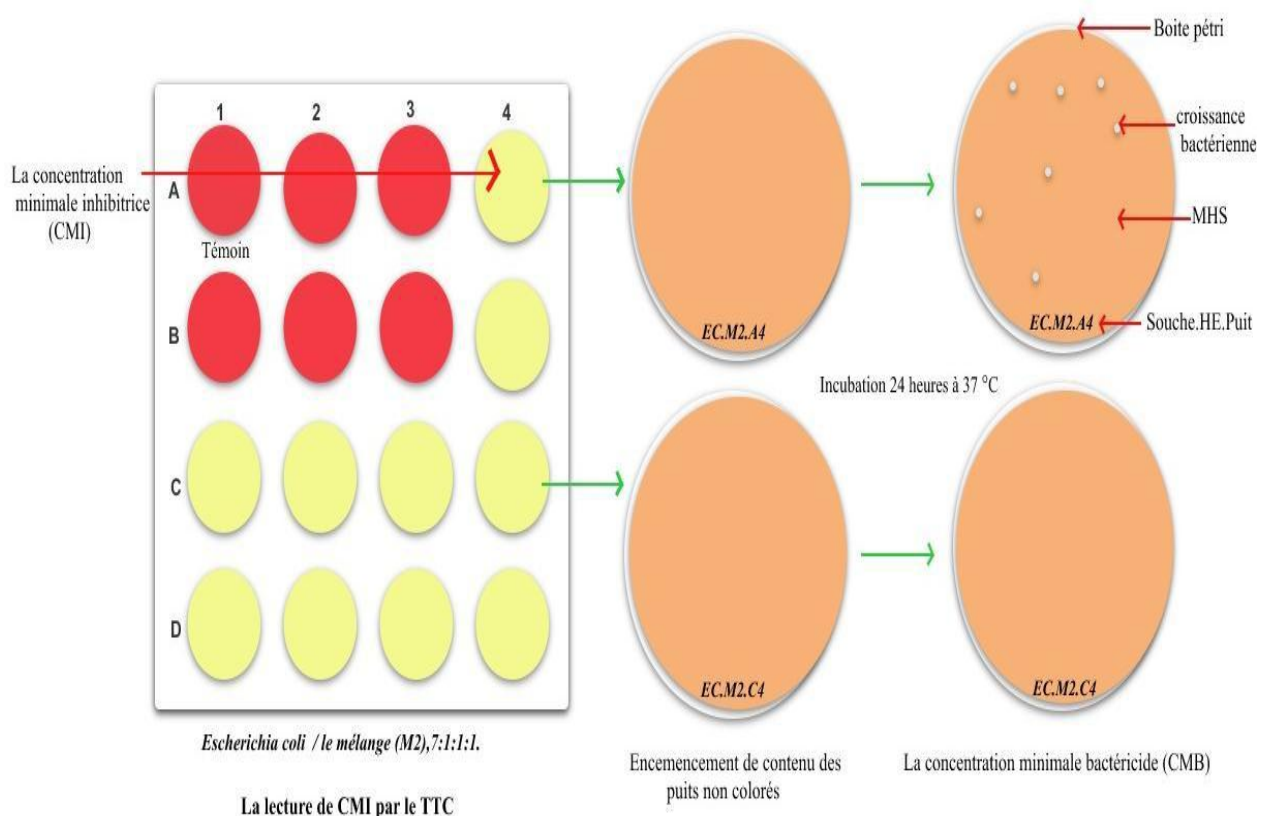
Figure 14 : La technique de Micro dilution par microplaque (dessinée par InvisionStudio)

4.9. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide est décrite par **Bouzid et al., 2021**, elle correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9% de l'inoculum microbien initial.

Pour déterminer la CMB, nous avons prélevé 5 µl de chaque puits n'ayant pas présenté de culture bactérienne après révélation avec le TTC (2, 3,5-diphényltétrazolium chloride) à l'aide d'une micropipette et on les a mis dans des boîtes pétri contenant la gélose Muller Hinton, ensuite ces boîtes ensemencées sont incubées pendant 24 heures à 37 °C.

La lecture des valeurs de la CMB a été faite par observation à l'œil nu, et elle a été déduite à partir de la première boîte qui n'a pas présenté de culture bactérienne.



TTC : le 2, 3,5-diphényltétrazolium chloride ; **MHS** : Muller Hinton solide ; **HE** : huile essentielle

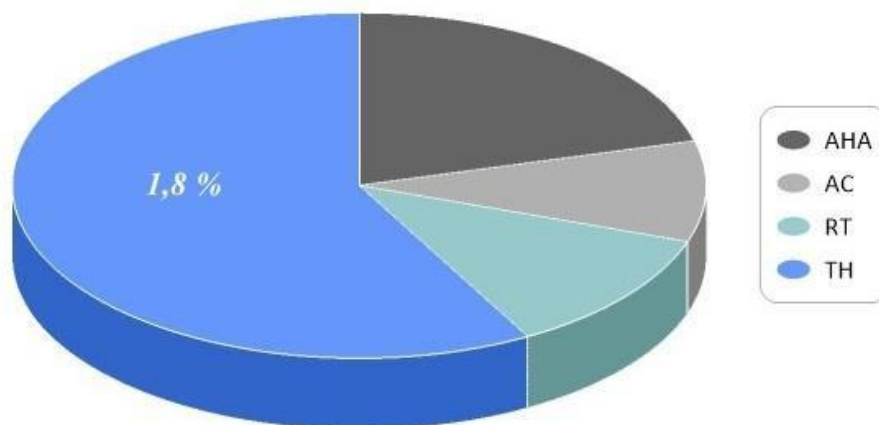
Figure 15: La détermination de concentration minimale inhibitrice et bactéricide

Chapitre 3: Résultats et discussion

1. Rendement

L'huile essentielle a été obtenue à partir l'extraction de la plante de *Thymus hirtus* Willd. par l'hydro distillation selon l'appareil de type Clevenger, elle a été séchée par l'ajout du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄).

Le rendement en l'huile *thymus hirtus willd* a été calculé selon le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse du matériel végétal, dont le rendement de notre huile essentielle été plus important estimé de **1,08 %**.



AHA: Artemisia herba alba Asso., AC: Artemisia campestris L., RT: Rosmarinus tournefortii de Noë., TH: Thymus hirtus Willd

Figure 16 : Le rendement de l'huile *Thymus hirtus* willd.

2. Méthode de diffusion sur disque

La méthode de diffusion sur disque a été utilisée pour évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles seules et en combinaison, ce test effectué sur 5 souches bactériennes différentes.

2.1. Les huiles essentielles seules et en combinaison

Les résultats de l'activité antibactérienne des huiles essentielles par méthode de diffusion sur disque, exprimé par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition sont regroupés dans le tableau 1 ci-dessous:

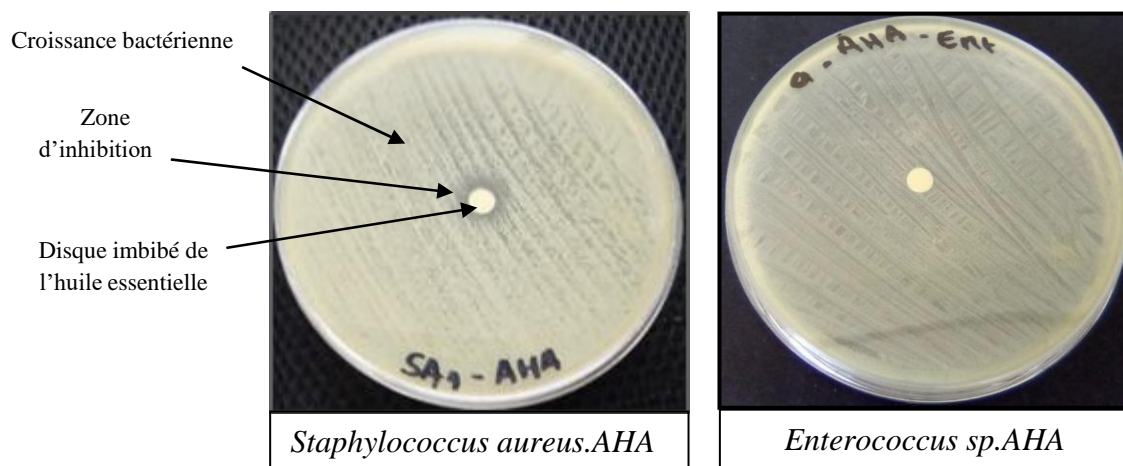
Tableau 8: Diamètres des zones d'inhibitions des Bactéries testés vis-à-vis des huiles essentielles

Bactéries testées	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
	AHA	AC	RT	TH
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,5 0,7	6,5 0,7	7,5 0,7	13,5 0,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12,33	< 6 0	13 1,4	11,66 1,15
<i>Escherichia coli</i>	11,5 0,7	6,5 0,7	15 4	11,5 0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	< 6 0	6,33 0,57	4,94	< 6 0
<i>Enterococcus sp</i>	< 6	6	6 0,7	< 6 0

AHA : *Artemisia herba alba* Asso; AC : *Artemisia campestris*; RT : *Rosmarinus tournefortii* de Noé; TH : *Thymus hirtus* Willd.

Valeurs représentées en moyenne écart type calculées par le logiciel RSTUDIO.

La sensibilité des souches bactérienne vis-à-vis des huiles essentielles est très variable, selon Franchomme, 2001; Durrafourd, 2002, cette sensibilité permet de classer les bactéries en fonction du diamètre de la zone d'inhibition, alors on note des souches **non sensible (-)** ou **résistante**: un diamètre inférieur à 8 mm, **modérément sensible (+)** pour un diamètre de 8 à 14 mm, **sensible (++)** si le diamètre est compris entre 14 et 20 mm et **très sensible (+++)** dans le cas des diamètres supérieurs à 20 mm, cette échelle a été utilisée pour décrire la sensibilité des souches bactérienne vis à-vis nos huiles essentielles étudiées.



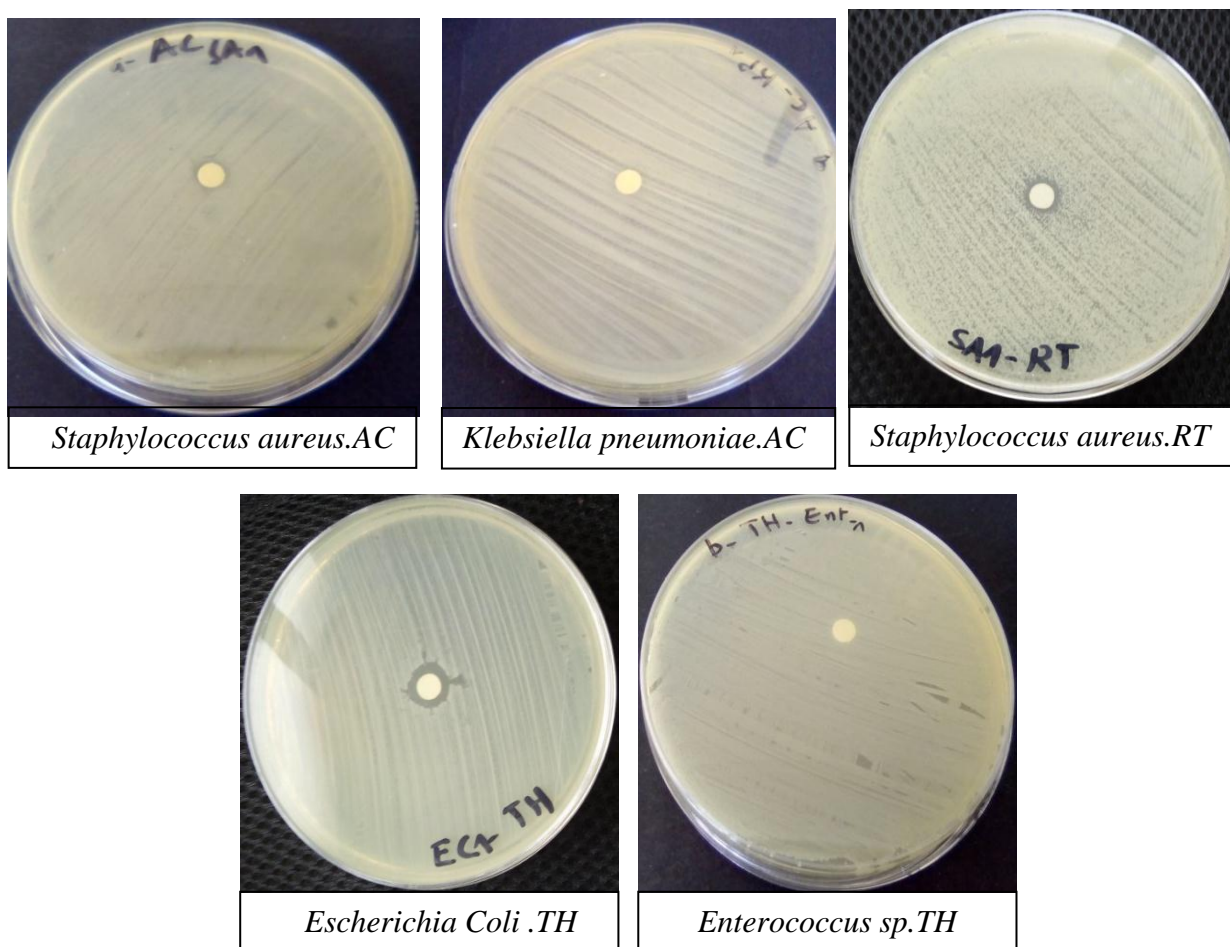


Figure 17: Effet des huiles *Artemisia herba alba* (AHA) ; *Artemisia campestris* (AC) ; *Rosmarinus tournefortii* (RT) ; *Thymus hirtus willd* (TH) sur la croissance des bactéries

D'après les résultats obtenus, nous constatons que l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* est dotée d'une activité inhibitrice modéré sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli* et *Klebsiella pneumoniae* traduite par des diamètres de la zone d'inhibition de 11,5 mm et 12,33 mm respectivement, elles sont modérément sensible, alors que la souche de *Pseudomonas aeruginosa* est trouvée résistante.

Cependant aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée pour l'huile essentielle d'*Artemisia campestris* sur les souches bactériennes étudiées.

Notre huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* a présenté des activités variables, une activité inhibitrice modéré sur *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres de 13 mm et 9,5 mm, une activité inhibitrice importante sur *Escherichia Coli* traduite par un diamètre de 15 mm.,elle est sensible à cette huile . Néanmoins aucune activité inhibitrice n'a été enregistrée sur *Staphylococcus aureus*.

Quant à l'huile *Thymus hirtus* willd, elle a une activité inhibitrice modérée sur *Escherichia Coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition allant de 11,5 à 13,5 mm, elle sont modérément sensible Alors que *Pseudomonas aeruginosa* est résistante avec un diamètre d'inhibition de inférieur à 6 mm.

Finalement, nos résultats obtenus montrent que la souche *Enterococcus* sp est la seule souche résistante à toutes les huiles essentielles étudiées séparément. Et cela confirmé qu'elle est résistante.

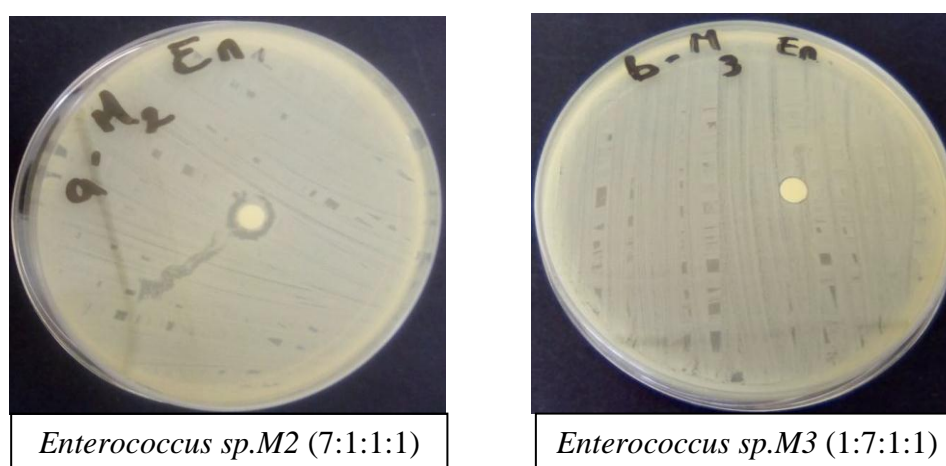


Figure 18: Effet des mélanges des huiles essentielles sur la croissance des bactéries

En ce qui concerne les mélanges des huiles essentielles que nous avons préparés, les résultatsregroupés dans le tableau 2, montrent une grande différence d'activité antibactérienne.

Tableau 9 : Diamètres des zones d'inhibitions des bactéries testées vis-à-vis des mélanges des huiles essentielles

Bactéries testées	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)				
	M1	M2	M3	M4	M5
<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5 0,7	14,5 0,7	16 1,4	15 1,4	8 1,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9 0	8 1,4	9,5 0,7	7 0	7,5 0,7
<i>Escherichia coli</i>	16 0	<6 0	<6 0	14 0	8,5 0,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7 0	<6 0	7,5 0,7	<6 0	<6 0
<i>Enterococcus</i> sp	11 0	8,5	6,5	12,5 2,1	11,5 2,1

MI: 1:1:1:1; M2 : 7:1:1:1; M3 : 1:7:1:1; M4 : 1:1:7:1; M5 : 1:1:1:7 (RT: AHA: TH: AC).

Valeurs représentées en moyenne écart type calculés par le logiciel RSTUDIO.

Il est important de rappeler que les mélanges d'huile essentielle ont été préparés à raison de plusieurs combinaisons, en prenant différentes quantités d'huile essentielle de *Rosmarinus Tournefortii*, *Artemisia herba alba*, *Thymus hirtus willd.* et *Artemisia Campestris*.

Le mélange (**M1**) d'huiles essentielle contenant des ratios de **1:1:1:1** de chaque huile essentielle est caractérisé une activité inhibitrice importante sur *Escherichia coli* avec un diamètre de 16 mm, elle est sensible , ainsi une activité inhibitrice modérée sur *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus sp* avec des diamètres des zones d'inhibition allant de 9 a 12,5 mm.

Relativement à les mélange (**M2**) et (**M3**) composés avec des ratios de **7:1:1:1** et **1:7:1:1** ont montrés des activités inhibitrice modéré et importante sur *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* respectivement, traduites par des diamètres de 14,5 et 16 mm. Alors qu'aucune activité n'a été trouvée sur *Escherichia coli*.

En définitive par les mélanges (**M4**) et (**M5**) préparés avec des ratios de **1:1:7:1** et **1:1:1:7**, les souches *Escherichia coli* et *Enterococcus sp*. Ont été inhibés modérément avec des diamètres de 14 et 8,5 mm, cependant aucune activité n'est trouvée sur *Klebsiella pneumoniae*.

Le mélange (**M4**) qui a présenté une activité inhibitrice importante sur *Staphylococcus aureus* exprimée par 15 mm de diamètre tandis que le mélange (**M5**) a une activité inhibitrice modérée sur cette même souche. Alors, sur l'ensemble des résultats obtenus *Pseudomonas aeruginosa* a marqué une résistance contre tous les mélanges des huiles essentielles.

Nos résultats de l'étude de pouvoir antibactérienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso ., *Artemisia campestris L.*, *Rosmarinus tournefortii* de Noé et *Thymus hirtus* Willdet leurs combinaisons avec différentes ratios sur 5 souches bactériennes sont similaires à plusieurs études et différentes à d'autres.

En premier lieu ,Nous rappelons que le rendement en huile essentielle de *Thymus hirtus* Willd était 1,8%, ce rendement était largement important de celui trouvé par **Mighri et al.,2009** , qui était 0,35% ,cependant notre rendement était faible par rapport de celui révélé par Semeniuc et al.,2017 qui était 2,20 %.

Le rendement des huiles essentielles est influencé par la saison de récolte, l'engrais et le pH des sols, le choix et le stade des conditions de séchage, la situation géographique, le chémotype, le choix de la partie de la plante ou du génotype et la méthode d'extraction. **Al-Shuneigat et al.,2015**

D'après **Dorman et al, (2000)**, l'activité antibactérienne des huiles essentielles est liée à leur composition respective, la configuration structurale et les groupes fonctionnels de leurs constituants ainsi que l'interaction synergique possible entre les composants, ce qui explique la variabilité des résultats obtenus, qui diffèrent d'une huile à une autre et par rapport à chaque souche bactérienne étudiée, pareil pour les mélanges préparés qui présument une éventuelle synergie entre les différents composants.

En comparant nos résultats de l'activité antibactérienne de l'huile d'*Artemisia herba alba* par méthode de disque, nous constatons qu'ils sont similaires aux résultats trouvés par **Akrout et al 2010; Mighri et al., (2010)**, là où une activité inhibitrice modérée sur *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 12 mm est notée, alors qu'aucune activité inhibitrice sur *Pseudomonas aeruginosa* n'a été observée. En plus, les résultats rapportés par **Sbayou et al, (2014)** sur *Staphylococcus aureus* dont le diamètre d'inhibition a été trouvé 11 mm. Ainsi pour *klebsiella pneumoniae* notre résultat est presque similaire à celui trouvé par **Al-Shuneigat et al., 2015** avec un diamètre de 11 mm.

Le résultat trouvé dans notre étude ne concorde pas avec l'étude de **Al-Shuneigat et al.,2015** pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, dont l'huile a révélé une activité importante et modérée avec des zones d'inhibition de 18 et 9 mm respectivement. Cependant cette huile n'a montré aucune spécificité vis-à-vis des bactéries Gram-positives ou Gram-négatives, et cela correspond à notre résultats.

Notre huile *Artemisia campestris* a présentée des résultats similaires à **Baykan erel et al.,2012** duquel aucune activité antibactérienne sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus sp* avec des zones d'inhibition inférieure de 8, pourtant notre résultats de cette huile sont différentes de celui trouvé dans l'étude de **Akrout et al., 2010**, dont une faible activité contre *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 10 mm, une activité importante sur *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 18 mm, Alors que les études de **Al Jahid et al.,2016**, sur *Artemisia campestris*, ont révélées des résultats différentes que nous, l'huile a présenté des activités fortes, importantes et modérées

sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *pseudomonas aeruginosa* respectivement avec des diamètres de 31 , 15 et 10.3 mm.

Le pouvoir antibactérienne de *Rosmarinus tournefortii* dans notre étude est différent de celui trouvés par **Tahri et ces collaborateurs., 2015**, par lequel une activité modérée sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, dont les zones d'inhibition de 10 et 9 mm respectivement, ce pouvoir est dépend à des principaux composants le 1,8-cinéole et le camphre. **Sivropoulou et al., 1997**. Plusieurs études montrent que les souches Gram-négatives semblent être plus sensibles que les souches Gram-positives due à leur paroi cellulaire imperméable. **Beneddouche et al., 2011 ; Adwan et al ., 1998** et ça confirme nous résultats pour l'huile de *Rosmarinus tournefortii*.

Quant à l'huile *Thymus hirtus* willd , nous a donnée des résultats approximativement similaires à **Mighri et al., 2009** , duquel les zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* sont 10 et 9 mm respectivement, Alors que nous ne concordent pas pour *Enterococcus sp* et *Pseudomonas aeruginosa* , cette dernière était plus résistante, ce résultat est en accord avec la nature de cette souche reconnue comme multi-résistante contre de nombreux antibiotiques.

Ainsi les zones d'inhibition des différentes souches formant par l'huile de *Thymus hirtus* Willd n'ont pas montré de grande différence dans les diamètres observés pour les souches Gram positives et négatives (**Mighri et al., 2009**)

Finalement les activités antibactériennes des huiles essentielles sont liées à leurs compositions, dont le pouvoir antibactérienne de l'huile essentielle d'*Artemisia herba alba* est liée a la présence d'une teneur élevée en mono terpènes oxygénés (thuyones, camphre et 1,8-cinéole) **Akrout et al., 2010** , et également liées à la présence des composants principaleaux chrysanthénol, cis-limonène et α -terpinéol. **Al-Shuneigat et al., 2015**. Quant à le l'action d'*Artemisia campestris* est attribuée à la présence de limonène, -terpinène, p-cymène, terpinen-4ol et α -terpinéol même en quantités relativement faibles et les composées d'hydrocarbures monoterpéniques. **Akrout et al., 2010** et aussi sont liées à la présence de certains composés bioactifs majeurs contenus, tels que le germacrène D et le -pinène. **Silva., 2012 ; judeau., 2002**.

Notre résultats des mélanges des huiles essentielles sont presque similaires à d'autre mélanges des huiles de lavande et clary sage ,ylang et jasmin , petigrain et clary sage et

jasmine avec un ratio de 3:4:3 dans les études de **Tadtong et al ,2012** dont la souche *Pseudomonas aeruginosa* est résistante aux deux mélanges et la souche *Escherichia coli* est inhibée modérément avec des zones d'inhibition de 10 ,1 et 12 ,4 mm ,ces valeurs sont très proche de notre mélanges (M4) et (M5), ainsi les deux mélanges ont montrés une activité antibactérienne sur Gram positive que Gram négative.

Egalement à les études de **Kon et Rai , 2012** sur des mélanges de famille Lamiaceae de *Rosmarinus officinalis* et *Thymus Vulgaris* , *Mentha piperita* et *Thymus Vulgaris* ,*Pogestemon patchouli* et *Thymus Vulgaris* avec un ratio de **1 :1** , les deux premiers mélanges sont dotées une activité inhibitrice importante sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* traduite par des diamètres allant de 14,6 à 18,9 mm , ces valeurs sont très proche de notre mélanges (M2) et (M1), alors que le dernier mélange exhibé une activité inhibitrice importante et modéré sur les souches précédentes avec des zones de 18,3 et 12,4 mm ,ces diamètres sont très proche de notre mélanges (M3) et (M4) sur les mêmes souches respectivement .

3.Détermination de concentration minimale inhibitrice et bactéricide CMI et CMB

Pour évaluer le pouvoir antibacterieen des huiles essentielles seules et en combinison on alancé la détermination des concentration minimale inhibitrice en milieu liquide le muller Hinton plus Tween 80 (0,01%) v/v dans plaque de 96 puits et bactéricide sur le muller Hinton solide.

3.1.Les huiles essentielles seules et les mélanges

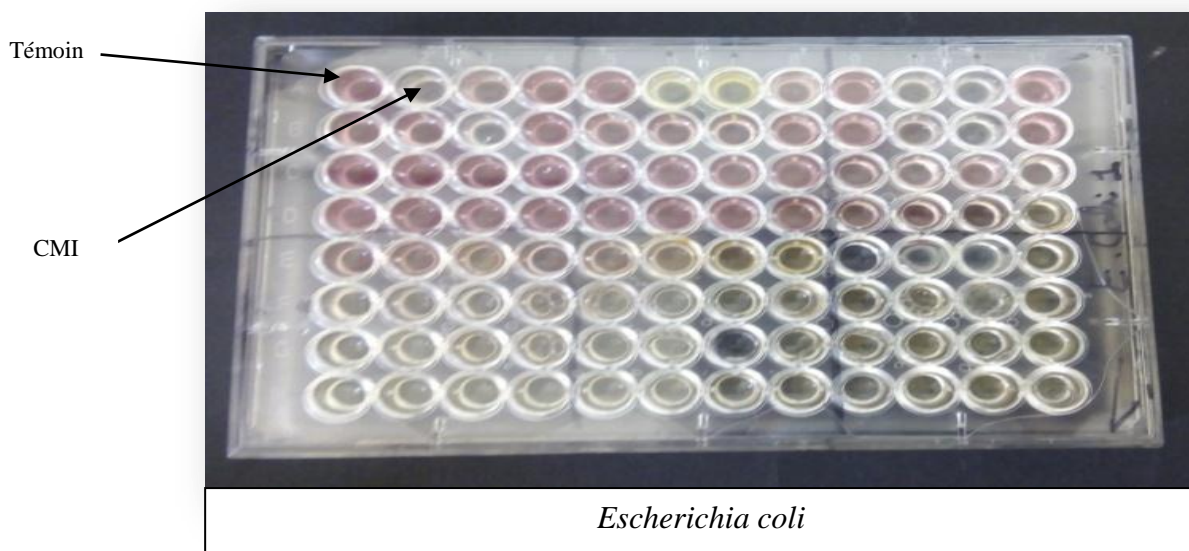


Figure 19: La lecture de concentration minimale inhibitrice



Figure 20: La lecture de concentration minimale inhibitrice

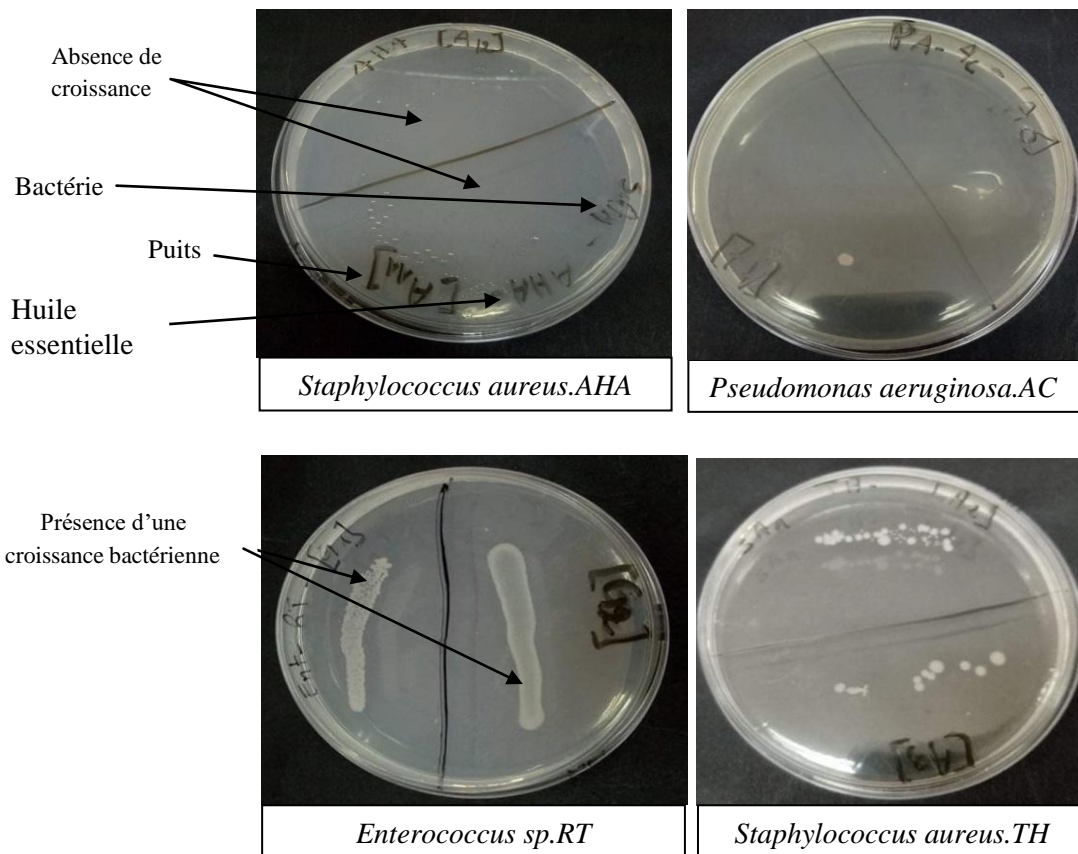


Figure 21: La lecture de concentration minimale bactéricide des huiles essentielles

Les résultats de CMI et CMB des huiles essentielles sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 08 : Concentrations minimales inhibitrice et bactéricide des huiles essentielles

Bactéries testés	AHA		AC		RT		TH	
	C MI mg/ml	C MB mg/ml	C MI mg/ml	C MB mg/ml	C MI mg/ml	C MB mg/ml	C MI mg/ml	C MB mg/ml
Gram +								
<i>Staphylococcus aureus</i>	80	80	80	80	5	+	80	+
<i>Enterococcus sp</i>	40	80	80	80	2,5	+	20	40
Gram -								
<i>Escherichia coli</i>	20	40	40	40	10	40	5	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80	80	80	80	5	5	80	80
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	40	40	80	5	+	40	80
+ : Croissance								

Les huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris*, ont présentées une concentration minimale inhibitrice et bactéricide élevée de 80 mg/ml pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, les autres souches ont été inhibées par des CMI allant de 20 à 40 mg/ml.

L'huile essentielle de *Rosmarinus tournefortii* à munie des faibles CMI de 5 mg/ml et 2,5 mg/ml pour *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus sp*, ainsi cette huile n'a aucune activité bactéricide sur *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* et *Klebsiella pneumoniae*.

Quant à l'huile *Thymus hirtus Willd*, les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont été inhibées à une concentration de 80 mg/ml, du moment que *Escherichia coli* est été inhibée à 20 mg/ml.

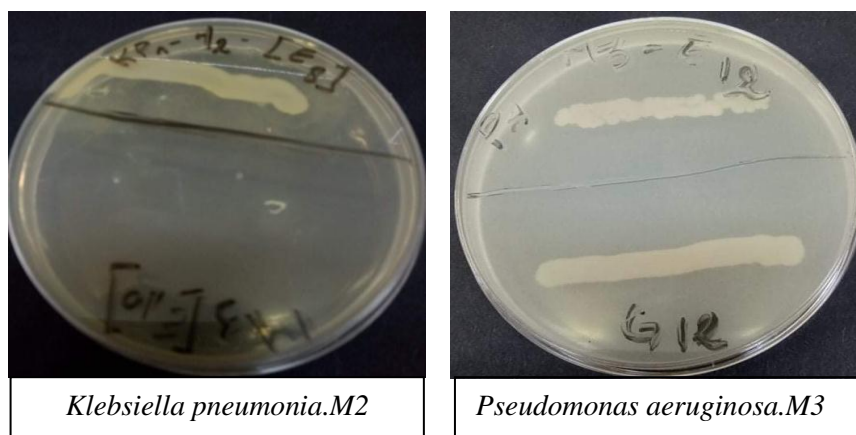


Figure 22: La lecture de CMB des mélanges des huiles essentielles

Tableau 11: les valeurs de CMI et CMB des mélanges des huiles essentielles

Bactéries testées	M1 1:1:1:1		M2 7:1:1:1		M3 1:7:1:1		M4 1:1:7:1		M5 1:1:1:7	
	C MI mg/ml	C MB mg/ml	C MI mg/ml	C MB mg/ml	C MI mg/ml	C MB mg/ml	C MI mg/ml	C MB mg/ml	C MB mg/ml	C MB mg/ml
Gram +										
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	20	5	+	5	+	10	40	20	40
<i>Enterococcus sp</i>	20	40	5	+	5	5	10	20	40	80
Gram -										
<i>Escherichia coli</i>	20	40	10	40	10	20	10	20	10	20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80	+	5	5	5	+	40	+	40	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	80	5	+	5	+	20	40	40	80
+ : Croissance										

Le mélange (**M1**) des huiles essentielles avec un ratio de **1:1:1:1** est montré des concentrations minimales inhibitrices faibles de 5 mg / ml pour *Staphylococcus aureus*, et autres élevées atteint 80 mg/ml pour *Pseudomonas aeruginosa*, comme ceci des concentrations inhibitrices bactéricides allant de 20 à 80 mg/ml sur les souches testées tandis que l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* reste résistante.

A l'égard des mélanges (**M2**) et (**M3**), ont exhibés des faibles CMI de 5 mg/ml pour tout les souches à l'exception de *Escherichia coli* qui a été inhibée à 10 mg / ml, de même les espèces *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus sp* sont tuées par une concentration de 5 mg/ml de (**M2**) et (**M3**) respectivement. Les souches *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae* sont résistantes aux ces deux mélanges.

Dernièrement les mélanges (**M4**) et (**M5**), sont capables d'inhiber les souches bactériennes par des concentrations minimales compris entre 10 et 40 mg/ ml, du quelle l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est reste résistante contre les deux mélanges.

L'effet antibactérien a été considéré bactéricide ou bactériostatique en fonction du rapport : CMB/CMI.

En effet, CMB/CMI près de 1 l'effet est bactéricide et si CMB/CMI supérieur de 4, l'effet est bactériostatique. **Pankey et al .,2004**

Tableau 12: les valeurs de CMB/ CMI des huiles essentielle et des mélanges

Bactéries testées	CMB/ CMI								
	AHA	AC	RT	TH	MI	M2	M3	M4	M5
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	-	-	4	-	-	4	2
<i>Enterococcus sp</i>	2	1	-	2	2	-	1	2	2
<i>Escherichia coli</i>	2	1	4	4	2	4	2	2	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	1	1	1	-	1	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1	-	2	2	-	-	2	2

Notre résultats des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de notre huiles essentielles *Artemisia herba alba.*, *Artemisia campestris.*, *Rosmarinus tournefortii* et *Thymus hirtus Willd.*, et leur combinaisons avec différente ratios était similaire à plusieurs étude et différentes par rapport à d'autres.

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides d'*Artemisia herba alba* sont plus élevées que celles rapportés par **Sbayo et al., 2014**, dont les CMI et CMB supérieure de 20 mg/ml pour *Pseudomonas aeruginosa* et les CMI et CMB entre 2,5 et 10 mg/ ml été enregistrés pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus sp*. Egalement à les résultats de **Amri et ces collaborateurs., 2013** sont importants que notre, en effet cette huile a inhibée les souches *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* de 50 à 100 mg/ml et plus .

Cette activité inhibitrice est probablement liée à la teneur élevée en monoterpénoïdes oxygénés (78,6%), car le camphre, le 1,8-cinéole et la thuyone sont trois monoterpènes aux propriétés antibactériennes bien documentées. **Imelouane et al., 2010** et encore le α -thujone , qui est peut-être le responsable sur l'effet bactéricide

Notre résultats de CMI de l'huile essentielle d'*Artemisia Campestris* était élevée que les résultats de **Al-Jahid et al., 2016**, pour la souches *Staphylococcus aureus* qui a été inhibée à 25 mg/ ml , et un peu similaire pour *Pseudomonas aeruginosa* qui a été inhibée à 100 mg/ml et faibles par rapport à *Escherichia coli* qui a été inhibée à 100 mg/ ml.

L'huile *Rosmarinus tournefortii* a présentée des résultats de CMI et CMB faibles par rapport a l'étude de **Outaleb et al., 2020**, dont *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*

Klebsiella pneumoniae et ont été inhibées à 10 à 20 mg/ml et les CMB étant de 20 mg/ml et plus, cette inhibition dépend de présence d'une quantité élevée de camphre.

Quant à l'huile de *Thymus hirtus willd.*, à exhibée des CMI élevées par rapport à celui trouvées par **Mighri et ses coopérateurs, 2009**, dont HE montrée une CMB de 10 mg/ml et CMI de 1 mg/ml contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et une moyenne CMI de 10 mg/ml contre *Pseudomonas aeruginosa*, cette huile a montré des valeurs intéressantes de CMI est CMB.

Ce qui concerne la combinaison des huiles essentielle, notre résultats étant similaire à des certaines études et différentes par rapport à d'autre, Ainsi des études de **Tadtong et al., 2012** sur des mélanges des huiles essentielles de lavande et clary sage et ylang, petitgrain et clary sage et jasmine avec un ratio de 3:4:3, le premier mélange à montré des concentrations minimales inhibitrices de 50 et 10 mg/ml sur la souche *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*, cette dernière est similaire à notre mélange (M4), et le deuxième mélange inhibe à 10 et 100 sur les mêmes souches. Cependant les CMI des mélanges trouvées par **Rai et Kon., 2012** sont faibles que notre entre 0,1 et 5,5 mg/ml sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

Notre mélange (M4) avec un ratio de 1 : 1 : 7 : 1 a montré une faible CMB de 5 mg/ml qui est très proche de celui trouvées dans les études de **Brochot et al., 2017** sur *Pseudomonas aeruginosa*, dont la CMB était 6 mg/ml. Cependant leur mélanges ont révélées des CMI et CMB très faibles par rapport à notre entre 0,38 et 1,50 mg/ml sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, ainsi deux souches gram négatives étaient résistantes.

D'après **Tadtong et al., 2012** l'effet antimicrobien différentiel des mélanges des huiles ou des huiles essentielles seuls peut être influencé par les quantités de composants actifs, ainsi les huiles essentielles ont une plus grande activité que les mélanges de leurs principaux composants (**Gill ; Mourey et Canillac., 2002**), duquel la combinaison de ces grands composants avec d'autres constituants peut entraîner un effet synergique, additif ou antagoniste (**Ultee et al., 2000**)

En effet, un effet additif est observé lorsque l'effet combiné est égal à la somme des effets individuels. L'antagonisme est observé lorsque l'effet d'un ou des deux composés est moindre

lorsqu'ils sont appliqués ensemble que lorsqu'ils sont appliqués individuellement. La synergie est observée lorsque l'effet des substances combinées est supérieur à la somme des effets individuels **Burt, 2009**.

Les effets de synergisme, addition et antagonisme dépendent des interactions des composés des mélanges des huiles essentielles **Kon et Rai, 2012** du quelle les études de **Bassolé et ses collaborateurs, 2010** a présentés une activité synergétique du carvacrol and eugenol, carvacrol et thymol, carvacrol et linalool, , menthol et eugenol, eugenol et thymol, eugenol et linalool sur *Escherichia coli*, Cependant la combinaison de carvacrol et thymol a présenté un antagonisme sur *Escherichia coli*. **Requena et al, 2019**, et les mêmes composant ont présentés un synergisme, Ainsi que la combinaison de carvacrol et menthol a présenté un effet additif sur *Escherichia coli*.

En outre les études de **Gallucci et al., 2009; Rivas et al., 2010** n'exhibées pas des résultats positives entre les composés qui ont des effets antibactérien prouvés. Les différentes interactions de carvacrol and thymol sont liées à la similarité de la structure des molécules, donc un mécanisme similaire d'action.

L'effet antagoniste a été attribué à l'interaction entre les hydrocarbures monoterpéniques non oxygénés et oxygénés **Hammer et al 1999, Goñi, 2009** encore entre eugenol/carvacrol qui dépend au leurs ratios **Requena et al., 2019**, de plus un effet synergétique est présenté entre thymol and cymene, dans différentes huiles essentielles, ces deux composant ont la même structure, sauf le cymen a un faible groupe de hydroxyl, sont hydrophobes elles accumulent dans la membrane de cellule puis pénétrer dans le cytoplasme. **Delgado et al., 2004**.

La plupart des études ont attribué des effets additifs et synergiques aux composés phénoliques et alcooliques. En général, les composés ayant des structures similaires présentent un effet additif plutôt que synergique. L'apparition d'interactions additives de certaines huiles essentielles a été liée à leurs principaux composés phénoliques (carvacrol et thymol) **Baipai, 2012; Lambert et al., 2001 et Azeredo, 2011**.

En effet, La détermination de effet synergétique, additif et antagoniste se fait par le calcul de l'index concentration inhibitrice fractionnaire (FIC_{index}), dont $FIC_{index} = 1$ effet est additif; inférieur de 1 effet est synergétique et supérieur de 1 effet est antagoniste (**Bell, 2005; Krepker et al., 2017; Pei et al., 2009**)

$$\text{FIC}_{\text{index}} = \text{FIC}(\text{HE1}) + \text{FIC}(\text{HE2})$$

$$\text{FIC} = \text{CMI de mélange} / \text{CMI d'HE}$$

Selon **Requena et al., 2019**, la méthode facile et rapide pour détecter l'effet antagoniste et synergistique en utilisant le colorant thiazolyl blue tetrazolium bromide colométrique (MTT), la technique est effectuée dans une microplaque de 96 puits dont le principe est d'ajouter 10 µl de MTT dilué dans PBS dans les puits, et incubé à 37°C pendant 4 heures, la transformation de la couleur jaune de MTT en mauve indique les cellules vivantes, c'est-à-dire un antagonisme.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'utilisation inappropriée des antibiotiques pour le traitement des infections bactériennes, conduit à l'apparition de souches multi résistantes, d'où l'importance d'orienter la recherche vers de nouvelles solutions notamment vers la phytothérapie qui a toujours été une source d'inspiration pour de nouveaux médicaments.

Les huiles essentielles des plantes médicinales jouent un rôle crucial surtout les activités antimicrobiennes de ces composants, dont plusieurs études ont prouvées l'efficacité des huiles et leur combinaison contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Cependant plusieurs études sont contre la combinaison des huiles en raison des interactions entre les composants.

Notre travail d'actuelle destiné à l'évaluation de l'activité antibactérienne d'un mélange de 4 huiles essentielles : *Artemisia herba alba* asso., *Artemisia campestris* L., *Rosmarinus tournefortii* de Noé et *Thymus hirtus* Willd.

L'activité antibactérienne a été déterminée sur cinq souches bactériennes selon trois techniques ; la méthode de disque, la détermination de concentration minimale inhibitrice sur milieu liquide et bactéricide sur milieu solide.

Les résultats des huiles essentielles indiquent que l'huile de *Rosmarinus tournefortii* a une activité inhibitrice importante sur *Escherichia coli* avec un diamètre de zone d'inhibition de 15 mm , les deux huiles *Artemisia herba alba* et *Thymus hirtus* Willd ont moindre activité inhibitrice traduite par un diamètre de 13,5 et 12,33 mm sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Alors que l'huile d'*Artemisia campestris* n'a aucune activité sur les souches testées.

Le rapport CMB/CMI permet de déterminer l'effet bactéricide ou bactériostatique des huiles essentielles, duquel les HEs *Artemisia herba alba* et *Artemisia campestris* ont exhibées une activité bactéricide avec un ratio CMB/CMI de 1 sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, durant que les HEs *Rosmarinus tournefortii* et *Thymus hirtus* Willd ont montrées un effet bactériostatique sur *Escherichia coli* avec un ratio de CMB/CMI de 4. La souche *Staphylococcus aureus* résiste contre RT et TH.

Quant à le mélange des huiles essentielles, les résultats à révélés que le mélange (M1) des huiles RT: AHA: TH: AC avec un ratio de 1:1:1:1 est doté une activité importante sur *Escherichia coli* traduite par un diamètre de 16 mm, ainsi le mélange (M2) avec un ratio de 7:1:1:1 a une moindre activité ne dépasse pas 14,5 mm de diamètre de la zone d'inhibition sur *Staphylococcus aureus*.

Pour les mélanges (M3) et (M4) avec des ratios de 1:7:1:1 et 1:1:7:1 ont prouvés une activité inhibitrice importante allant jusqu'à 16 mm de diamètre de la zone d'inhibition sur *Staphylococcus aureus*. En définitive, le mélange (M5) avec un ratio de 1:1:1:7 a démontré une activité inhibitrice modéré avec 11,5 mm de la zone d'inhibition sur *Enterococcus sp*. La seul souche résiste contre tous les mélanges est *Pseudomonas aeruginosa*.

Un effet bactériostatique avec un ratio de CMB /CMI de 2 a été remarqué pour les mélanges (M1), (M4) et (M5) sur les souches *Enterococcus sp* et *Klebsiella pneumoniae*, encore un effet bactéricide de 1 sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus sp* des mélanges (M2) et (M3) respectivement.

Bien que les mélanges n'ont pas une activité bactéricide contre certaines souches testées, ça n'élimine pas leurs activités bactéricides contre les autres souches résistantes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus sp*.

En conclure que la combinaison des huiles essentielle offrent un moyen efficace et approche économiquement réalisable dans la lutte contre les bactéries résistantes aux antibiotiques. Notre résultats encouragent et motivent les chercheurs qui refusent la combinaison des huiles comme un agent antibactérien de faire des expériences profondes in vitro et in vivo a l'avenir avec prend au sérieux l'étude des interactions entre les composants d'un mélange des huiles essentielles.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Adam K., Sivropoulou A., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, *Salvia fruticosa*.(1998).essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.*,46:1739-1745.
- Adda M., Adda A., Othmane M. (2020).Comportement d'une population algérienne de coriandre (*coriandrum sativum* L.) pour le rendement et la composition chimique des huiles essentielles des fruits mûrs. *Revue Agrobiologia* .,10(1): 1797-04
- Adwan K., Abu-hasan N.,(1998).Gentamicin resistance in clinical strains of Enterobacteriaceae associated with reduced gentamicin uptake. *Folia Microbiologica.*, 43: 438-440.
- AFNORE., 2000 : Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1. Echantillonnage et méthode d'analyse 471P. Tome 2. Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles 323P. Tome 2 Monographie relative aux huiles essentielles 663.
- Agisho, H., Osie, M. & Lambore, T. (2014). Traditional medicinal plants utilization, management and threats in Hadiya Zone, Ethiopia. *J. Med. Plant Stud.* 2: 94–108.
- Akinyemi,K.O., Oluwa,K.O., Omomigbehin,E.O.(2006).Antimicrobial activity of crude extracts of three medicinal plants used in South–West Nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens.*Afr.J.Trad.Compl.Altern.Med.*3(4):13– 22
- Akrouf A.,El jani H., Amouri S., Neffati M.(2010).Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *artemisia campestris* L., *artemisia herba alba* asso, & *thymus capitatus* hoff. et link. growing wild in the southern of tunisia. *ethnomedicine, pharmacy & pharmacology.*, 2(1): 29–39
- Al Jahid A., Essabaq S., Elamrani A., Blaghen M.,Jamal J.(2016).Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil and the Hydro-alcoholic Extract of *Artemisia campestris* L. Leaves from Southeastern Morocco: *TBAP* 6 (5 & 6) 2 pp : 393 - 405
- Aljaafari M., ObaidAlAli A., Baqais L., Alqubaisy M., AlAli M., Molouki A., Ong-Abdullah J., Abushelaibi A.,Lai K.S., Erin Li S.H.(2021).An Overview of the Potential Therapeutic Applications of Essential Oils.*Molecules.*, 26, 628.
- Alqethami A., Hawkins J.A., Teixidor-Toneu, I. (2017). Medicinal plants used by women in Mecca: urban, Muslim and gendered knowledge. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 13 (1) :62.
- Al-Shuneigat J.,Al- Sarayreh S ., Al-Qudah M., Al-Tarawneh I., Al–Sarairah Y ., Al-Qtaitat A. (2015). GC-MS Analysis and Antibacterial Activity of the Essential Oil Isolated from Wild *Artemisia herba-alba* Grown in South Jordan. *BJMMR*, 5(3): 297-302.

- Amarti F., Satrani B., Aafi A., Ghanmi M., Farah A., Aberchane M., El Ajjouri M., El Antry S., Chaouch A.(2008).Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus capitatus* et de *Thymus bleicherianus* du Maroc. *Phytother Res*, 6:342–347.
- Amri I., De Martino L., Marandino A., Hamrouni L., Mohsen H, Scandolera E., De Feo V., and Mancini E.(2013).Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil from *Artemisia herba-alba* Growing Wild in Tunisia.*Natural Product Communications* ., 8(3) : 407-410.
- Anthony J.P., Fyfe L., Smith H. (2005). Plant active components: a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol.*, 21: 462-468.
- Anton R..Lobstein A. *Plantes aromatiques*. 2005 : E pices, aromates, condiments et huiles essentielles. Tec & Doc, Paris, 522
- Bajpai V.K., Baek K.-H., Baek S.C.(2012). Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Res. Int.*, 45 :722–734.
- Bakkali F., Averbeck S ., Averbeck Da., Idaomar M.(2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology.*,46:446–475.
- Bako S.P., Bakfur M.J., John, I., Bala, E.I.(2005). Ethnomedicinal and Phytochemical profile of some savanna plant species in Nigeria. *Int. J. Botany* 1 (2) :147–150.
- Bardaweel SK, Hudaib MM, Tawaha KA, Bashatwah RM.(2015).Studies on the in vitro antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, and acetylcholinesterase inhibition activities associated with *Chrysanthemum coronarium* essential oil. *Evid Based Complement Alternat Med.*,790838.
- Baser KHC., Demici B., Demici F et al. (2000).Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea multifida*. *Planta Med* 68(10): 941-3
- Bassolé I.H.N., Lamien-Meda, A.,Bayala B.,Tirogo S., Franz C.,Novak, J., Nebié R.C., Dicko M.H.,(2010).Composition and antimicrobial activities of *Lippia multi- flora* Moldenke, *Mentha piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. *Molecules.*,15 :7825–7839.–354.
- Baykan erel S., Reznicek G., ŞENOL G ., Yavasogulu N., Konyalioglu S., Zeybek A. (2012) Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia:*Turk J Biol* 36:75-84.
- Begamboula CF., Uyttendaele M., Debevere J.(2003) Antimicrobial effect of spices and herbs on *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *J. Food Prot.*, 66: 668-674.
- Bektas, E.,Daferera D.,Sökmen M., Serdar G.,Erturk M., Polissiou M.,Sökmen A.(2016).In Vitro Antimicrobial, Antioxidant, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from *Thymus Nummularis* M. Bieb.*Indian J. Tradit.Knowl.*,15 :403–410.
- Bell A. (2005). Antimalarial drug synergism and antagonism: Mechanistic and clinical significance. *FEMS Microbiology Letters.*,253(2) :171–184.
- Bellakhdar, H ., pharmacopée marocaine traditionnelle, 1997 : Ed IBIS Press, paris.

- Ben Bnina S., Hammami M., Daami-Remadi, I., Hajjlaoui C .H., M Ben Said., Mighri Z.(2009).Composition and Antimicrobial Activities of Essential Oils From the Aerial Parts and Flowers of *Thymus hirtus* W. Growing in Tunisia :Journal of Essential Oil Research/56l, 21.
- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., and Aouni M. (2007). Investigation of some medicinal
- Bendeddouchea M.S., Benhassainia H., Zouaoui H., Romaneb A.(2011). Essential Oil Analysis and Antibacterial Activity of *Rosmarinus tournefortii* from Algeria. *Natural Product Communications.*, 6 (10).
- Benmansour et S. A. talebBendiab.(1998). Comparative investigation of proteins and amino acids in *Artemisia herba-alba* residues and Algerian date stones.Proposal to use them as additional feed for livestock.*J. de la SocieteAlgerienne de Chimie*, 8(1):67-71.
- Benmeddour T., Zeraib A., Laouer H., Lahmar Z.(2019).Chemical Composition and Antifungal Activity of the Essential Oils of Algerian *Vitex agnus-castus* and *Artemisia Herba-alba*.*Asian J. Applied Sci.*, 12 (3): 114-122
- Böhme K.,Barros-Velázquez J., Calo-Mata P., Aubourg S.P.(2014) Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activity of Essential Oils: Mechanisms and Applications. In *Antimicrobial Compounds: Current Strategies and New Alternatives*; Villa, T.G., Veiga-Crespo, P., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany., 51–81.
- Borokini T.I., Omotayo F.O.,(2012). Phytochemical and ethnobotanical study of some selected medicinal plants from Nigeria. *J. Med. Plants Res.* 6 (7) :1106–1118.
- Boulos L.(2002), *Flora of Egypt*, vol. III. Al-Hadara publishing, Cairo, Egypt.
- Bouzid D.,Merzouki S., Boukhebt H., Zerroug M.M.(2021).Various Antimicrobial Agent of Ozonized Olive Oil. *The Journal of the International Ozone Association.* 1893151.
- Bruneton J., 1999 : *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3ème édition, Lavoisier Techniques & Documentation, Paris.
- Bruneton J. (1993) :*Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Techniques et Documentation. Ed. Lavoisier. Paris, p 274-285.
- Buronzo A. M. (2008). *Grande guide des huiles essentielles santé beauté Marocaine :moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires*.
- Burt S. (2004).Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in foods: A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 223–253.
- Burt S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94 :223–253.
- Callegari L et A. Rossi (1939). The active principles of Lybian *Artemisia herba-alba* and their pharmacological action.*ArchivioItaliano di ScienzeFarmacologiche.*,8:145-60.
- Carson F. A. et Hammer K. (2011). *Chemistry and Bioactivity of Essential Oils*. In:
- Chamberland M (1887) Les essences au point de vue de leurs propriétés antiseptiques. *Ann Inst Pasteur* 1: 153–4.

- Chemat F et Fernandez X.,2012. La chimie des huiles essentielles. Édition : Octobre 2012.p : 288 ;9782311010282
- Cosentino C., Tuberoso C.I.G.,Pisan B., Satta M., Arzedi E., Palmas F.(1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Lett. Appl. Microbiol.,29:130–135.
- Da Silva A.C.R., Lopes P.M., De Azevedo M.M.B., Costa D.C.M., Alviano C.S., Alviano, D.S. (2012). Biological Activities of α -pinene and β -pinene Enantiomers. Molecules., 17: 63056316.
- David A., Hervé M. (1994). Flore de la suisse. Ed Du Griffon Neuchâtel. Suisse. 428p.
- De Azeredo G.A., Stamford T.L.M., Nunes P.C., Neto N.J.G., de Oliveira M.E.G., de Souza E.L.(2011). Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. Food Res. Int., 44, 1541–1548.
- De Billerbeck VG., Roques CG., Vanière P et al. (2002) Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Hygiènes (revue officielle de la Société française d'hygiène hospitalière) 10: 248-51.
- De Martino L.,Bruno M ., Formisano C., De Feo V.,Napolitano F , Rosselli S., Senatore F.(2009). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from Two Species of Thymus Growing Wild in Southern Italy.Molecules., 14 :4614-4624.
- Delgado B., Fernández P.S.,Palop A.,Periago P.M. (2004) Effect of thymol and cymene on *Bacillus cereus* vegetative cells evaluated through the use of frequency distribution. Food Microbiol., 21:327–334.
- Dorman H.J.D., Deans S.G.(2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbiol., 88: 308-316.
- Dorman HJD., Deans SG.(2000).Antimicrobial agents from plants: antimicrobial activity of plant volatile oils. J Appl Microbiol 88: 308-16.
- Dunn C .E, R. R. Brooks, J. Edmondson, M. Leblanc and R. D. Reeves (1996). Biogeochemical studies of metal-tolerant plants from southern Morocco. Journal of Geochemical Exploration, 56 (1) :13-22.
- Durrafourd C., Lapraz J.C., Reynier J .(2002) .Traité de phytothérapie clinique: endobiogénie et médecine, Masson, Paris, France.
- El amri J., Elbadaoui K., Zair T., bouharb H., chakir S., Alaoui T.L.(2014) . Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées. Journal of Applied Biosciences.,82:7481– 7492.
- El-Hela, A.A.A.(2007).Chemical composition and biological studies of the essential oil of *Thymus decussatus* Benth growing in Egypt. Egypt. J. Biomed. Sci., 23, 146–153

- Eloff JN (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* .,64: 711–3.
- Fenardji F., Klur M., Mrs. Furlon C., Ferrando R.(1974). White artemisia, (*Artemisia herba-alba*), *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux.*, 27(2) : 203-6.
- Franchomme P., Jollois R. &Penoel D. (1990). *L'aromathérapie exactement : Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle* (R.Jollois Ed. Limoges, France ed.).
- Franchomme P.,Jollois P., Pénoél D . (2001) .aromathérapie exactement . RogerJollois,Limoges,France.
- Gallucci M. N., Oliva M., Casero C., Dambolena J., Luna A., Zygodlo J., et al. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. *Flavour and Fragrance Journal.*, 24(6) :348.
- Garneau F.-X. (2005). *Le matériel végétal et les huiles essentielles* (Laseve-UQAC, Chicoutimi ed.)
- Gavanji S.,Sayedipour S.S., Larki B., Bakhtari A.(2015).Antiviral Activity of Some Plant Oils against Herpes Simplex Virus Type 1 in Vero Cell Culture. *J. Acute Med.*,5 :62–68.
- Gill A. O., Delaquis P., Russo P., Holley R. A. (2002). Evaluation of antilisterial
- Goñi P., López P., Sánchez C., Gómez-Lus R., Becerril R., Nerín, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chem.* 2009, 116 :982–989.
- Grand Wald.,2007. *Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation.* Ed. Encyclopédie des médecines naturelles, Paris, France, pp. 2-20
- Guesmi F.,Saidi I.,Bouzenna H.Hfaiedh N.,Landoulsi A.(2019) Phytocompound variability, antioxidant and antibacterial activities, anatomical features of glandular and aglandular hairs of *Thymus hirtus* Willd. *Ssp. algeriensis* Boiss. and Reut. over developmental stages.*South African Journal of Botany.*, 127 : 234-243.
- Guinoiseau E ., Luciani A., Rocca Serra D., Quilichini Y., Berti L., et al.(2015). Primary Mode of Action of *Cistus ladaniferus* L. Essential Oil Active Fractions on *Staphylococcus aureus* Strain. *Advances in Microbiology, Scientific Research Publishing*, 5 (13) :881-890.
- Guynot ME., Ramos AG., Seto L., Purroy P., Sanchis V., Marin S.(2003).Antifungal activities of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products.*J. Appl. Microbiol.* 94: 893-899.
- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V.(1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 86 :985–990.
- Harris, 2007. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* Vol. 86, Issue 6: pp.985-990.
- Hercules S.,Chrissanthy P.(2017).Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils.*J. Microbiol. Biotechnol.*,27(3): 429–438.

- Hu Y., Zhang J., Kong W., Zhao G., Yang M.(2017).Mechanisms of Antifungal and Anti-Aflatoxicogenic Properties of Essential Oil Derived from Turmeric (*Curcuma longa* L.) on *AspergillusFlavus*. *Food Chem.*,220: 1–8.
- Imelouane B., El Bachiri A., Ankit M., Khedid K., Wathelet J.P., Amhamdi H. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Artemisia herba alba* asso grown in Morroco. (2010).*Banats Journal of Biotechnology* ., I(2).
- Juliana Loureiro., Almeida Campos., Ulysses Paulino Albuquerque.(2021).Indicators of conservation priorities for medicinal plants from seasonal dry forests of northeastern Brazil.*Ecological indicators* ; 1470-160.
- Juteau, F., Masotti, V., Bessièrè, J.M., Dherbomez, M., Viano, J. (2002). Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. *Fitoterapia* .,73: 532-535.
- Keville K. et Green M.(1995). *Aromatherapy: A complete guide to healing art*, Ed 1: The Crossing Press., p: 120-140.
- Khalfi-habes O., Boutekedjir C. & Sellami S. (2014). Etude des huiles essentielles de la plante mentha piperita et tester leurs effets sur un modèle biologique des infusoires. Institut National Agronomique EI-Harrac.
- Khribch J., Nassik S., El houadfi M., ZRIRA S., Oukessou M.(2018).Activité antibactérienne de l’huile essentielle d’origan et du carvacrol sur des souches d’*Escherichia coli* d’origine aviaire.301Rev. Mar. Sci. Agron. Vét. 6 (3): 300-307.
- Kimbaris A ., Siatis N., Daferera D., Tarantilis P., Pappas C., Polissiou M.(2006).Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*) *Ultrasonics Sonochemistry*.,13 :54–60.
- Kon K., Rai M.(2012). Antibacterial activity of thymus vulgaris essential oil alone and in combination with other essential oils. *nugantara bioscience*.,52 4 (2): 50-56.
- Krepker M., Shemesh R., Poleg Y. D., Kashi Y., Vaxman A., Segal E. (2017). Active food packaging films with synergistic antimicrobial activity. *Food Control*.,76 :117–126.
- Kumar, V.(2011).Antimicrobial Activity of Essential Oils. *Int. J. FOOD Ferment. Technol.*, 1, 161–172.
- KundanS., and Anupam S. (2010). The Genus *Artemisia*: A Comprehensive Review. *J. Pharm. Biol.*pp:1-
- Kyeong W.Y., Anwar M., and Jong H.K. (2007). Effects of the Aqueous Extract from *Artemisia camp-estris* ssp. *caudata* on Mycorrhizal Fungi Colonization and Growth of Sand Dune Grasses. *J. Plant. Biology*. 50 (3): 358-36.
- Lahlou M., (2004) Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytother. Res.*, 18, 435-448.
- Laid M., Hegazy ME-F., Ahmed A.A. (2008). Sesquiterpene lactones from Algerian *Artemisia herba alba*. *Phytochemistrylett.*, 1:85-88.

- Lamarti A., Badoc A. & Carde J.P., 1994. Etude chromatographique de l'huile essentielle de la plantule de fenouil amer (*Foeniculum vulgare* Mill.) ; caractéristiques spectrales (UV, IR, SM) de ses constituants. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 132, pp. 73-89.
- Lambert R.J.W., Skandamis P.N., Coote P., Nychas G.J.E.(2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol., 91 :453–462.
- Lambert RJV., Skandamis PN., Coote PJ., Nychas G-JE.(2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91: 453-462.
- Lardry J.-M. & Haberkorn V. (2007). L'aromathérapie et les huiles essentielles.
- Lawrence B.M., Tucker A.O.(2002).The genus *Thymus* as a source of commercial products. Med. Arom. Plants – Ind. Prof.,24 :252–262.
- Lianet M., Oswald A., Setzer W.(2012).Antiprotozoal Activity of Essential Oils.Agriculturae Conspectus Scientificus .,77 (4):167-175.
- Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents.(Ed. Thormar H.).John Wiley& Sons. Islande. 336p.
- Lopez-Romero J.C., González-Ríos H., Borges A., Simões M.(2015).Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus*. Evid. Based Complement. Alternat. Med., 9.
- Ložiene K., Venskutonis P.R.(2005).Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. Biochem. Syst. Ecol.,33 : 517–525.
- Lucchesi, M.-E. (2005).Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de la Réunion
- Mahizan, N.A., Yang S.-K., Moo C.-L., Song A.A.-L., Chong C.-M., Chong C.-W.,Abushelaibi A., Lim S.-H.E., Lai K.-S.(2019).Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. Molecules ., 24, 2631.
- Maksimovi´c M., Vidic D., Miloš M., Šoli´c M.E., Abadžić S., Siljak-Yakovlev S.(2018).Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. Bioch. Syst. Ecol., 35 : 473–478
- Mastinu A.,Bonini S.A., Premoli M., Maccarinelli G., Mac Sweeney E., Zhang L.,Lucini, L., Memo M..(2021).Protective Effects of *Gynostemma pentaphyllum* (var. *Ginpent*) against Lipopolysaccharide-Induced Inflammation and Motor Alteration in Mice. Molecules, 26, 570.
- Mérillon J.-M., Rivière C.(2018). Natural Antimicrobial Agents. Springer International Publishing AG; Cham, Switzerland.
- Mighri H., Hajlaoui H , Akrouf A ., Hanen Najjaa ., Mohamed Neffati.(2010) Antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia herba-alba* essential oil cultivated in Tunisian arid zone. C. R. Chimie 13: 380–386.

- Moo C.-L., Yang S.-K., Osman M.-A., Yuswan M.H., Loh J.-Y., Lim W.-M., Lim S.-H.-E., Lai K.-S.(2020).Antibacterial Activity and Mode of Action of β -Caryophyllene on *Bacillus Cereus*. *Pol. J. Microbiol.*,69 :1–6.
- Morales R.Studies of the genus *Thymus* L. *Lamiales. Newsletter* 1996, 4:6–8.
- Mourey A., Canillac N. (2002). Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13(4–5): 289–292.
- Nabli M.A., (1995). Essai de synth?ese sur la v?eg?etation et la phyto?ecologie tunisiennes. II et III. Le milieu physique et la v?eg?etation. *Ecol. V?eg. Appl.* 5, 542.
- Nazzaro F.,Fratianni F.,Coppola R.,De Feo.(2017).Essential Oils and Antifungal Activity. *Pharmaceuticals.*,10, 86.
- Oussalah M., Caillet S., Saucier L., Lacroix M.(2006) .Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science.*, 73/ 236-44
- Outaleb T., Yekkourb A.,Hazzita M., Zitounic A ., Sabao N. (2020). Phytochemical profiling, antioxidant and antimicrobial effectiveness of *Rosmarinus tournefortii* De Noe extracts issued from different regions of Algeria. *journal of essential oil researc.*, . 32.(3) :247–259.
- Ozenda P. (1983). *Flore du Sahara* Ed : éditions du centre nationale de la recherche.
- Pájaro-Castro N., Flechas M.C., Ocazonez R., Stashenko E., Olivero-Verbel J.(2015) Potential Interaction of Components from Essential Oils with Dengue Virus Proteins. *BoletínLatinoam. Caribe Plantas Med. Aromáticas.*,14 :141–155.
- Pankey G.,Sabath L.(2004).Clinical relevance of Bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram positive bacterial infections.*Clin Infect Dis.*, 38 : 64-70.
- Paris : MPC-Vidéom, 1985 ; 57-63.
- Pascal., 2005. *Les Huiles Essentielles : principes d'utilisation.*
- Pei R.S., Zhou F., Ji B.P., Xu, J. (2009) Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved Method. *J. Food Sci.*, 74: 379–383.
- Pottier-Aiapetite G.(1981). *Flore de Ia Tunisia ; Angiospermes - Dicotyledones, 2 : Gamopetales.* Programme Flore et Vegetation Tunisiennes, Publications scientifiques tunisiennes, 539p.
- Prakash B., Singh P., Kedia A., Dubey N.K.(2012).Assessment of Some Essential Oils as Food Preservatives Based on Antifungal, Antiaflatoxin, Antioxidant Activities and in Vivo Efficacy in Food System. *Food Res.*,49 :201–208.
- Quezel et Santa. (1962). *Nouvelle flore de l'Algérie* Ed : éditions du centre nationale.
- Rahal,2004, *Le Grand Guide des Huiles Essentielles: Santé, Beauté, Bien être ;* Ed : Hachette Pratique, p: 14- 4.

- Rahman A., Al-Reza S.M., Kang S.C.(2011).Antifungal Activity of Essential Oil and Extracts of Piper Chaba Hunter against Phytopathogenic Fungi. JAOCS J. Am. Oil Chem. Soc. Champaign .,88:573–579.
- Raut J.S., Karuppayil S.M. (2014). A Status Review on the Medicinal Properties of Essential Oils. Ind. Crops Prod., 62 :250–264
- Requena R.,Vargas M., Chiralt A. (2019) . Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. LWT - Food Science and Technology 101 : 183–190.
- Richard , 1992,Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles Lavoisier Ed., Illkirch. Pp. 429 -435
- Rivas L., McDonnell M. J., Burgess C. M., O'Brien M., Navarro-Villa A., Fanning S.(2010). Inhibition of verocytotoxigenic Escherichia coli in model broth and rumen systems by carvacrol and thymol. International Journal of Food Microbiology .,139(1–2) :70–78.
- Saad B., Said O.(2010).Tradition and Perspectives of Greco-Arab and Islamic Herbal Medicine. Herb – Suppl.
- Saeed M.,Nadeem M.,Khan M.R.,Shabbir M.A.,Amir R.M.(2013).Antimicrobial activity os Syzygium aromaticum extracts against food Spoilage bacteria.Afr.J.Microbiol.Res.7(41) :4848–4856.
- Salido S., Valenzuela LR., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A.,E. Cano.(2004). Composition and infraspecific variability of Artemisia herba-alba from southern Spain.Biochem. Syst. Ecol., 32 :265-277.
- Santoyo S., Cavero S., Jaime I., Ibañez E., Seña F.J., Reglero G. (2005).Chemical Composition and Antimicrobial Activity of RosmarinusofficinalisL. Essential Oil Obtained via SupercriticalFluid Extraction. Journal of Food Protection.,68(4):790–795.
- Sartoratto A., Machado ALM., Delarmelina C., Figueira GM., Duarte MCT., Rehder VLG.(2004).Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz. J. Microbiol.,35: 275-80.
- Sbayou H., Ababou B., Boukachabine K., Manresa A., Zerouali K., Amghar S., (2014). Chemical composition and antibacterial activity of Artemisia herba-alba and Mentha pulegium essential oils. J. Life Sci., 8 (1) :35-41.
- Sbayou H.,Ababou B., Boukachabine K., Manresa A., Zerouali K., Amghar S. (2014).Chemical Composition and Antibacterial Activity of Artemisia herba-alba and Mentha pulegium Essential Oils. Journal of Life Sciences January., 8(1), pp. 35-41.
- Schnitzler, P.(2019).Essential Oils for the Treatment of Herpes Simplex Virus Infections. Chemotherapy., 64: 1–7.
- Segal R, Feuerstein L., Danin A (1987). Chemotypes of Artemisia herba-alba in Israel based on their sesquiterpene lactone and essential oil constitution. Phytochemistry, 15(4): 411-416.

- Semeniuc .CA ., Pop CR., Rotar AM.(2017).Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Journal of food and drug analysis* .,25:403 408-405.
- Sergio A-O., Chacón-Vargas KF., Luvia Enid Sánchez-Torres., Blanca Estela Rivera-Chavira ., Nogueta-Torres B., Nevárez-Moorillón G.V . (2021).Differential Antimicrobial Effect of Essential Oils and Their Main Components: Insights Based on the Cell Membrane and External Structure.*Membranes*., 11, 405
- Sikkema J., De Bont J., Poolman B.(1995).Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons.*Microbiol. Rev.* 59: 201222.
- Sivropoulou A., Nikolaou C., Papanikolaou E., Kokkini S., Lanaras T., Arsenakis M. (1997).Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 :197–3201.
- Stahl Biskup E et Saz .(2002).Thyme.US.International standard book.13:978-203-216859.
- Stringaro A., Colone M., Angiolella L. (2018).Antioxidant, antifungal, antibiofilm, and cytotoxic activities of *Mentha* spp. essential oils. *Medicines*.,5,112.
- Tadtong S., Suppawat S., Tintawee A., Saramas P., Jareonvong S., Hongratanaworakit T.(2012).Antimicrobial Activity of Blended Essential Oil Preparation. *Natural Product Communications*., 7 (10).
- Tahri M., Imelouane B., Amhamdi H., Fauconnier M.L., Elbachiri A.(2015).The Chemical compositions and the Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of Rosemary Leaves from Eastern Morocco. *J. Mater. Environ. Sci.* 6 (3) : 666-672.
- Teimouri M.(2012).Antimicrobial activity and essential oil composition of *Thymus daenensis* Celak from Iran. *J Med Plants Res.*, 6:631–635.
- Thomford N.E., Dzobo K., Chopera D., Wonkam A., Skelton M., Blackhurst D., Chirikure S. & Dandara, C.(2015). Pharmacogenomics implications of using herbal medicinal plants on African populations in health transition. *Pharmaceuticals (Basel)* 8(3): 637–663
- Tian J.,Ban X., Zeng H., He J., Huang B., Wang Y.(2011).Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Cicuta Virosa* L. Var. *Latisecta* Celak.*Int. J. Food Microbiol.*,145 : 464–470.
- Tonneau M.(2007).Infections nosocomiales: des huiles essentielles en prévention. *Santé magazine* (375): 92-3
- Ueda-Nakamura T., Mendonça-Filho R. R., Morgado-Díaz J. A., Korehisa Maza P.,Prado Dias Filho B., Aparício Garcia Cortez D., Nakamura C. V. (2006).Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*.*Parasitol. Int.*, 55(2): 99-105.
- Ultee A., Kets E. P. W., Alberda M., Hoekstra F. A.,Smid, E. J. (2000). Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*.,174(4):233–238.

- Valles J, M. Torrell, T. Garnatje, N. Garcia-Jacas, R. Vilatersana and A. Susanna (2003). The genus *Artemisia* and its allies: phylogeny of the subtribe Artemisiinae (Asteraceae, Anthemideae) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). *Plant Biology* (Stuttgart, Germany), 5(3), 274-284.
- Vasinauskienė M., Radušinė J., Zitikaitė I., Survilienė E.(2006).Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Gentiana asclepiadea* L. *Agronomy Res.* ,4: 437.
- Walsh SE., Maillard JY., Russell AD., Catrenich CE., Charbonneau DL., Bartolo RG.(2003). Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on gram-positive and -negative bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 94: 240-247.
- Wang, L. Li. T. Ding, x. Zhou, L. Wang, Zhang, L. Liu, Y. Li, Z. Liu, H.Wang, H. Zeng, H. He, J. Chrom .A, (2006).
- Zeggwagh N-A., Farid O., Michel J-B., Eddouks M., Moulay I. (2008).Cardiovascular effect of *Artemisia herba-alba* aqueous extract in spontaneously hypertensive rats.Methods and findings in experimental and clinicalpharmacology, 30(5):375-81.
- Zhiri A. (2006). Aromathérapie : un peu d'histoire.... *Natura News : Science,Nutrition,*
- Ziyyat., Legssyer A., Mekhfi H., Dassouli A., Serhrouchni M., Benjelloun W.(1997). Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *J. of Ethnopharmacol.*, 58(1):45-54.
- Zouari N., Fakhfakh N., Zouari S., Bougatef A., Neffati M., Ayadi MA.(2011).Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food Bioprod Process*,89:257–265.
-