



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 de mélange  
d'huiles essentielles de quelques plantes  
médicinales**

Présenté par :

M<sup>elle</sup> **REZAIMIA Wafa**

M<sup>elle</sup> **AGGOUN Nour Elhouda**

Jury de soutenance :

Président : **M. RAHAL K** (MAA) Univ. Abbès Laghrou -Khenchela  
Examineur : **M. BOUSSAA AH.** (MAA) Univ. Abbès Laghrou -Khenchela  
Encadreur : **Dr. ZERAIB A.** (MCB) Univ. Abbès Laghrou- Khenchela

Année universitaire 2018 - 2019

# Remerciements

« La connaissance est la seule chose qui s'accroît lorsqu'on la partage ».

Nous remercions **ALLAH** tout puissant qui nous a donné le courage et la volonté et de nous avoir bénie jusqu'à la réalisation de ce modeste travail.

J'adresse mes sincères remerciements à mon encadreur  
M<sup>r</sup> **zraïb**...Merci d'avoir accepté de diriger ce travail,  
Merci pour votre encadrement sans faille tout au long du période de réalisation de ce travail.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de

## Jury:

Mr **RAHAL** maître assistant à l'Université Abbés Laghrour Khenchela qui a honoré ce travail en acceptant de présider le jury. On l'en remercie profondément.

Mr **BOUSSAA** maître assistant à l'Université Abbés Laghrour Khenchela, nous vous sommes très reconnaissantes d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions aussi tous ceux qui, tout au long de ces années d'études, nous ont observé, aidé, conseillé et même supporté. Que ce soit depuis toujours, depuis plusieurs années ou quelques mois seulement, nombreux sont celles et ceux qui ont participé à notre épanouissement. Nous les en remercions sincèrement.



Merci ♥

## *Dédicaces*

*Je remercie tout d'abord **mon Dieu** de m'avoir donné courage, patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail Je dédie ce travail*

*à **Mon père Amer** , pour ses encouragements incessant et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour*

***Mon adorable mère Hakima**, qui est toujours présente à coté de moi,. Que dieu te protège et te donne santé et je te serai reconnaissante toute ma vie*

***A mes chers frères Lyes et Fadi**, pour leur gentillesse et confiance .*

***A mon binôme wafa.***

***À tous mes amies : , fatima, khawla , zakia***

***\*Nour elhouda\****

## *Dédicaces*

*Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir donné courage, patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail Je dédie ce travail*

*à Mon père , pour ses encouragements incessant et son soutien moral aux moments difficiles qui furent pour moi les meilleurs gages de réussite. Qu'il trouve dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour*

*Mon adorable mère , qui est toujours présente à coté de moi,. Que dieu te protège et te donne santé et je te serai reconnaissante toute ma vie*

*A mes chers frères LINDA et ABDARAOUF, ISLAM pour leur gentillesse et confiance*

*À tous mes amies : , fatima, khawla , zakia*

*A mon binôme Nour elhouda*

*\*WAFA\**

# Sommaire

## Sommaire

Remerciement .....	i
Dédicaces .....	ii
Liste des Tableaux.....	iii
Liste des figures.....	iv
Liste des Abréviations .....	v

### Chapitre 1 Partie bibliographique

Introduction.....	01
-------------------	----

### Chapitre 2 Matériels et méthodes

II. matériel et méthodes.....	05
II.1.matériel.....	05
II.1.1. Matérielvégétal.....	05
II.1.2. Souches bactériennetestée.....	07
II.1.3. Milieux de culture.....	08
II.2.Méthodes.....	08
II.2.1.Echantillonnage.....	08
II.2.2.Extraction deshuile essentielles.....	09
II.2.2. Procédure microbiologie.....	11
II.2.2.1. Méthode de déffusionsur disques.....	11
II.2.2.2. Méthode demicrodilution.....	13
II.2.3. Plan expérimental.....	15
II.2.3.1. Contrainte fondamentale des mélanges.....	15
II.2.3.2. Stratégie expérimentale.....	16
II.2.3.3. Facteurs étudiés.....	18

## Sommaire

II.2.3.4. Réponses étudiées et mesures de ces réponses.....	18
II.2.3.5. Modèle mathématique.....	19
II.2.3.6. Etude graphique des réponses – Courbes d’isoréponses.....	19
II.2.4. L’analyse statistique.....	19
<b>Chapitre 3 Résultats et discussions</b>	
III .1. Extraction des huiles essentielles.....	20
III.1.1. Caractères organoleptique.....	20
III.1.2. Rendement en huiles essentielles.....	21
III.2. Détermination de l’activité antimicrobienne des huiles essentielles.....	22
III.2.1. L’activité antibactérienne des huiles essentielles seules.....	22
III.2.1.1. L’aromatogramme (méthode des disques).....	22
III.3.1.2. L’activité antibactérienne par la méthode de microdilution.....	25
III.3. L’activité antibactérienne des huiles essentielles en combinaison.....	27
III.4. L’optimisation de l’activité antibactérienne par le plan de mélange.....	30
III.4.1. Modélisation de l’activité anti <i>E. coli</i> .....	31
III.4.1.1- Diamètre de la zone d’inhibition.....	31
4.1.1.1-L’analyse de la variance et la régression linéaire.....	32
4.1.1.2-La validité de model.....	33
4.1.1.3-Le model mathématique.....	33
4.1.1.4-L’optimisation de diamètre de la zone d’inhibtion d’ <i>E. coli</i> .....	34
III.4.1.2- Modélisation de la concentration minimale inhibitrice.....	36
III.4.1.3- Modélisation de la concentration minimale bactéricide.....	41
III.4.2. Modélisation de l’activité anti <i>L. monocytogenes</i> .....	46
III.4.2.1- Diamètre de la zone d’inhibition.....	46

## **Sommaire**

<b>4.2.2- Modélisation de la concentration minimale inhibitrice.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.3- Modélisation de la concentration minimale bactéricide.....</b>	<b>47</b>
<b>Conclusions .....</b>	<b>49</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>50</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>51</b>
<b>Résumé arabe.....</b>	<b>52</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>53</b>
<b>Référencesbibliographique.....</b>	<b>54</b>

## Liste des tableaux

N°	Titre du tableau	Page
01	souche bactériennes testées	07
02	Lieux et dates d'échantillonnage	09
03	Matrice du plan de mélange utilisé noté {3,4}	17
04	Caractères organoleptique des huiles essentielles	20
05	Rendements moyens en huiles essentielles de différentes plantes étudiées	21
06	Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disques	23
07	Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de microdilution	25
08	Résultats de l'activité anti <i>E. coli</i> des huiles essentielles en combinaison	27
09	Résultats de l'activité anti <i>L. monocytogenes</i> des huiles essentielles en combinaison	28
10	Comparaison entre les résultats prévus et mesurés du diamètre de la zone d'inhibition de l' <i>E. coli</i> .	31
11	L'analyse de la variance pour le diamètre de la zone d'inhibition d' <i>E. coli</i> .	32
12	Résumé de l'ajustement de model de l'effet anti <i>E. coli</i> par la méthode de diffusion des disques sur gélose.	33
13	Estimations des coefficients de la réponse DZI d' <i>E. coli</i>	34
14	Comparaison entre les résultats prévus et mesurés du diamètre de la zone d'inhibition de l' <i>E. coli</i> .	37
15	L'analyse de la variance pour la CMI d' <i>E. coli</i> .	37
16	Résumé de l'ajustement de model de l'effet anti <i>E. coli</i> par la méthode microdilution	38
17	Estimations des coefficients de la réponse CMI d' <i>E. coli</i> .	39
18	Comparaison entre les résultats prévus et mesurés du diamètre de la zone d'inhibition de l' <i>E. coli</i> .	42
19	L'analyse de la variance pour la CMI d' <i>E. coli</i>	42
20	Résumé de l'ajustement de model de l'effet anti <i>E. coli</i> par la méthode microdilution	43
21	Estimations des coefficients de la réponse CMB d' <i>E. coli</i> .	44
22	L'analyse de la variance pour la CMI d' <i>L. monocytogenes</i> .	47
23	L'analyse de la variance pour la CMBs de <i>L. monocytogenes</i>	48

## Liste des figures

---

N°	Titre de la figure	Page
01	<i>Juniperus phoeniceae</i> dans son milieu naturel	05
02	photos de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	06
03	photos de l'espèce <i>Artemisia herba alba</i>	07
04	Image satellitaire de la localisation des stations de collecte des plantes étudiées (Google Earth)	08
05	Montage de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (clevenger)	10
06	Plaque de Mueller-Hinton à ensemercer en stries avec l'écouvillon sur toute la surface	12
07	Protocole opératoire du test de l'activité antibactérienne par la méthode des disques	13
08	Plan de mélanges en réseaux (Simplex lattice designs) {3, 4}.	18
09	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des zones d'inhibition d' <i>E.coli</i> .	33
10	Courbes iso-réponses de diamètre de la zone d'inhibition d' <i>E. coli</i>	35
11	Courbes iso-réponses de diamètre de la zone d'inhibition d' <i>E. coli</i>	36
12	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMI's d' <i>E. coli</i> .	38
13	Courbes iso-réponses de la concentration minimale inhibitrice d' <i>E. coli</i>	40
14	Profileur de prévision de la concentration minimale inhibitrice d' <i>E. coli</i>	41
15	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMI's d' <i>E. coli</i> .	43
16	Courbes iso-réponses de la concentration minimale inhibitrice d' <i>E. coli</i>	45
17	Profileur de prévision de la concentration minimale bactéricide d' <i>E. coli</i>	46
18	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMI's de <i>L.monocytogenes</i> .	47
19	Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMB's d' <i>L.monocytogenes</i>	48

## Liste des abréviations

---

MHA	agar Mueller Hinton
HE	Huile essentielle
OE	Essential oil
BMH	Bouillon Mueller Hinton
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMB	Concentration minimale bactéricide
UFC	Unité Formant Colonie
AFNOR	Association française de normalisation
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

# *Introduction*

## Introduction

Les antibiotiques sont des médicaments antibactériens d'origine naturelle, produits à partir des champignons ou des bactéries ou obtenus par synthèse ou semi-synthèse (Merad et Merad, 2001). La pénicilline est le premier antibiotique inventé en 1928 par Alexander Fleming. Depuis cette date, plusieurs antibactériens et de nouvelles classes thérapeutiques ont été découvertes et ont permis de traiter un plus grand nombre de maladies liées aux infections bactériennes.

Actuellement, plusieurs questions se sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés en médecine. Comme pour tout médicament actif, les antibiotiques sont susceptibles de provoquer des accidents plus ou moins importants, parmi lesquels on peut citer des accidents qui peuvent être dus au médicament lui-même par son activité pharmacodynamique, ce qui nécessitera une attention particulière lors de l'utilisation du produit (Merad et Merad, 2001).

Durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminué. Les bactéries en sont devenues de plus en plus résistantes (Kheyaret al., 2014). Ce phénomène de résistance est dû à plusieurs facteurs tels que : l'utilisation intense et sub-optimale des antibiotiques au cours des traitements ; l'hospitalisation prolongée ; la longue durée des séjours et les comorbidités ; le non-respect des pratiques hygiéniques et le transfert des malades entre les hôpitaux (Bouyahya et al., 2017).

L'émergence de la résistance bactérienne est également naturelle. En effet, des travaux ont pu mettre en évidence que certaines bactéries exposées au stress peuvent échanger spontanément des gènes de résistance. Ces échanges sont dits horizontaux, car ils ne mettent pas en jeu de transmission descendante générationnelle, et induisent l'apparition de bactéries « multi résistantes » puisqu'elles portent plusieurs gènes de résistance pour différents antibiotiques (Aouniet al., 2013).

***Alors, la recherche d'autres approches afin de diminuer ou d'éliminer les infections sans l'utilisation des produits synthétiques, est devenue une nécessité si on ne dit pas une obligation.***

## Introduction

Environ 66 à 85% de la population mondiale, principalement celle des pays en voie de développement dont l'Afrique sub-saharienne, ont directement recours aux plantes comme alternative pour se soigner (**Manzoet al., 2017**) pour leurs propriétés thérapeutiques, cosmétiques, chimiques, diététiques, pharmaceutiques, agro-alimentaires et industrielle (**Lahsissene et al., 2009**). Les molécules qui constituent le principe actif chez les plantes médicinales appartiennent majoritairement aux métabolites secondaires tels que les polyphénols, les huiles essentielles et les alcaloïdes (**Barrero et al., 2006**).

La recherche sur ces substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et les laboratoires pharmaceutiques sont toujours prêts à l'élaboration de nouveaux composés actifs, à l'identification, à la caractérisation des molécules naturelles et à la mise au point des médicaments qui ont pour origine des substances naturelles. Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques les plus modernes n'ont fait que confirmer les bienfaits des vertus thérapeutiques des plantes médicinales (**Lansing et al., 2003**).

Les huiles essentielles (HE) sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes synthétisées par les plantes aromatiques comme métabolites secondaires (**Bouyahya et al., 2016**). Le terme "huile" vient de leur caractère hydrophobe et de leur propriété de se solubiliser dans les graisses, alors que le terme "essentielle" fait référence à l'odeur dégagée par la plante productrice (**Bouhdid et al., 2012**).

Ces HE sont biosynthétisées par des plantes caractérisées par la présence de structures sécrétrices bien spécialisées telles que les poils sécréteurs (Lamiaceae), les poches sécrétrices (Myrtaceae) et les canaux sécréteurs (Apiaceae) (**Bouyahya et al., 2017**) qui sont impliquées dans le stockage de ces huiles essentielles (**Bouhdid et al., 2012**) et souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante. Les huiles essentielles sont liquides, volatiles, limpides et rarement colorées, solubles dans les lipides et les solvants organiques de densité généralement inférieure à celle de l'eau. Elles peuvent être synthétisées par tous les organes de la plante, c'est-à-dire bourgeons, fleurs, feuilles, tiges, brindilles, graines, fruits, racines, bois (**Bakkali et al., 2008**).

Les HE sont obtenues par différents procédés, distillation (ou hydrodistillation) à la vapeur d'eau dans un alambic pour des plantes aromatiques et médicinales, (**Aboughe Angone et al., 2015**), qui est la méthode la plus utilisée (**Bouhdid et al., 2012**) ; par expression à froid pour les essences d'agrumes et par enfleurage pour les parties fragiles de la plante

## Introduction

telles que les fleurs (**AbougheAngone *et al.*, 2015**). La composition chimique des huiles essentielles varie en fonction du climat, de l'altitude, de la nature du sol et son pH, de la période de récolte et de la technique de séchage et d'extraction (**Atailia *et Djahoudi*, 2015**). Elles sont constituées principalement par des terpénoïdes, en particulier les monoterpènes (C10) et sesquiterpènes (C15), et également les diterpènes (C20). D'autres variétés de molécules peuvent aussi être rencontrées, tels que les acides, les alcools, les aldéhydes, les esters, les hydrocarbures aliphatiques acycliques ou les lactones; rarement de l'azote et des composés contenant du soufre, des coumarines, et des homologues de phénylpropanoïdes (**Bouyahya *et al.*, 2017**).

Le rôle exact que pourraient jouer les HE dans la plante n'a pas été encore bien élucidé et reste à définir, néanmoins certaines suggestions ont donné quelques éléments de réponse. En effet, il a été démontré que les HE attirent des animaux qui servent à la pollinisation et à la dispersion des graines (**Bouyahya *et al.*, 2016**), un effet allélopathique et servent également de moyen de défense contre les organismes phytopathogènes (**Bouhdid *et al.*, 2012**).

Les huiles essentielles sont progressivement étudiées à des fins d'utilisation industrielle (chimique, cosmétique, alimentaire, parfumant et pharmaceutique) en raison de leur potentiel bioactif; antioxydant, répulsif, antifongique, analgésique, anti-inflammatoire, antihypertenseur, Antibactérien (**Popović *et al.*, 2019**). En effet les propriétés antibactériennes des HE sont connues depuis longtemps et aujourd'hui, un bon nombre de publications importantes ont confirmé leur effet bactériostatique et bactéricide contre des souches bactériennes pathogènes même parfois à de très faibles concentrations (**Bouyahya *et al.*, 2017**).

L'activité antibactérienne d'une huile essentielle est à mettre en relation avec sa composition chimique, les groupes fonctionnels des composés majoritaires (alcool, phénols, composés terpéniques et cétonique) ou ceux susceptibles d'être actifs. Mais, il est probable que cette activité dépende aussi de composés minoritaires qui agissent d'une manière synergique (**Kheyar *et al.*, 2014**). D'autre part, elle est influencée par des facteurs tels que le génotype de la plante et les conditions environnementales (**Popović *et al.*, 2019**), la méthode expérimentale utilisée et la souche bactérienne testée (**Bouyahya *et al.*, 2017**).

La combinaison des huiles essentielles avec une approche thérapeutique aux antibiotiques pourrait conduire à de nouvelles façons de traiter les maladies infectieuses. (**Moussaoui *et Alaoui*, 2016**). En effet, les thérapies combinatoires peuvent être

## Introduction

moins vulnérables au développement de la résistance aux médicaments et peuvent augmenter l'efficacité thérapeutique, leurs effets synergiques potentiels fournissent des fenêtres pharmacologiques plus larges et des toxicités plus faibles(**Khoury et al., 2019**).

Plusieurs travaux ont été menés sur l'effet de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques (**Bassolé et Juliani, 2012; Langeveld et al., 2013 ; Fadli et al., 2014 ; Mikulášová et al., 2016 ; Alaoui Jamali et al., 2018 ; Moteriya et al., 2017; Boudjedjou et al., 2018 ; Boudjedjou et al., 2019**). Cependant peu de travaux se sont intéressés à la synergie des mélanges des HE et à l'optimisation de cette activité microbiocide. Dans le cadre de ce travail, nous avons réalisé une étude préliminaire portant sur l'évaluation et l'optimisation des effets antibactériens du mélange des huiles essentielles extraites à partir de la partie aérienne de trois espèces végétales qui sont très utilisées dans la médecine traditionnelle locale.

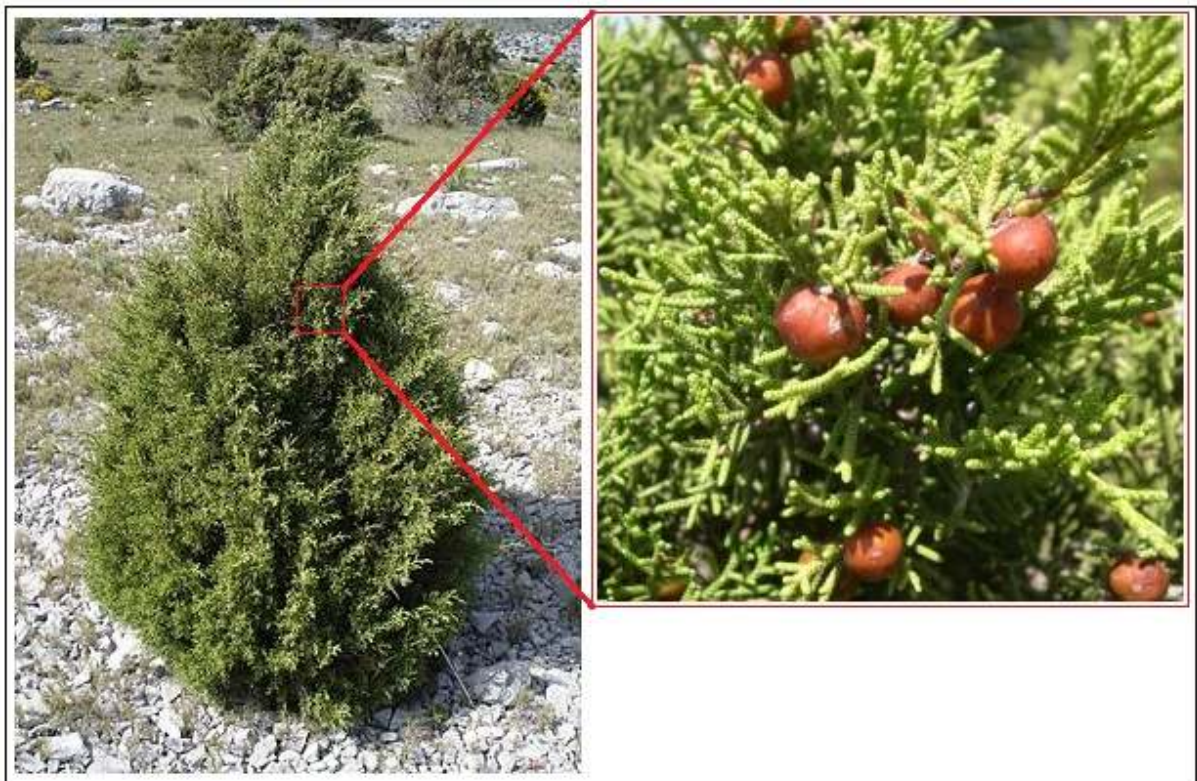
*Matériels et  
méthodes*

## II.1. Matériel

### II.1.1. Matériel végétal

Trois espèces médicinales utilisées largement dans la médecine traditionnelle et appartenant à trois familles botanique différentes ont été sélectionnées dans cette étude ;

- ✚ *Juniperus phoenicea* ou le Genévrier rouge appartient à la famille des Cupressaceae, et à la section Sabina, du genre *Juniperus*. Arbuste ou petit arbre de forme conique, fastigié. Feuilles écailleuses. Fruits globuleux, de 8 à 10 mm, rouge foncé (**figure 1**). Espèce monoïque qui a une croissance lente. Originaire du Sud de l'Europe, Afrique du Nord jusqu'à l'Arabie Saoudite (**Adams, 2011**). Vit dans les broussailles xériques, les crêtes rocheuses et les fissures, jusqu'à 1800 m d'altitude. En Algérie, l'espèce est présente depuis les dunes littorales jusqu'aux limites sahariennes (Cet arbre constitue au côté du cèdre, la principale couverture végétale dans les montagnes des Aurès) (**Quezel et Santa, 1962**).



**Figure 1** : *Juniperus phoenicea* dans son milieu naturel.

## Matériel et Méthodes

✚ *Thymus algeriensis* (famille des Lamiaceae), est l'une de 400 espèces du genre *Thymus* et de 26 espèces de ce genre qui poussent en Algérie. C'est une endémique du Nord d'Afrique, une plante sous-ligneuse, odorante qui forme des touffes compactes très ramifiées qui s'élèvent à une vingtaine de centimètres au-dessus du sol. Il pousse de façon spontanée sur les coteaux secs et rocaillieux et dans les garrigues. Les feuilles du thym sont plus ou moins contractées et les inflorescences sont en faux verticilles. Le calice quant à lui est tubuleux et la corolle est plus au moins exserte (**figure 2**) (Quezel et Santa, 1963). Toutes les espèces du genre *Thymus* produisent des huiles essentielles et se caractérisent par une grande variabilité chimique (Dobet *al.*, 2006).



**Figure 2** : photo de l'espèce *Thymus algeriensis*.

✚ *Artemisia herba-alba* L'Artemisia Herba Alba ; en français l'Armoise herbe blanche est une plante mensuelle très répandue dans les zones arides à semi-aride. C'est une espèce du genre Artemisia (Armoise) qui appartient à la famille des Astéracées. Herbacée et peut mesurer de 30cm à 50cm de haut. Ses tiges sont florifères et élancées, un peu velues et ses feuilles sont oblongues, découpées en segments de couleur vert foncé sur la face et blanc cotonneux sur leur partie inférieure, elle possède aussi des petites fleurs tubuleuses

## Matériel et Méthodes

jaunes(**figure3**);elledégage une odeur très forte, parfois désagréable(**Ozenda, 1983**).



**Figure 3** :photos de l'espèce *Artemisia herba alba*.

### **II.1.2. Souches bactériennes testées**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites à partir de la partie aérienne des trois espèces ; *J. phoenicea*, *A. herba-alba* et *Th. algeriensis* seules et en combinaison a été évaluée sur deux souches bactériennes (**tableau 1**).

**Tableau 01**: Les souches bactériennes testées.

<b>souche</b>	<b>Gram</b>	<b>Référence</b>	<b>Famille</b>
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 25922	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Positif	ATCC 25922	<i>Listeriaceae</i>

### **II.1.3.Milieus de culture**

Trois milieux de culture ont été utilisés:

- ❖ La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes .
- ❖ Gélose de muller-Hinton pour le test de la diffusion surgélose .

En effet la gélose de muller-Hinton est le seul milieu de culture solide pour l'étude de la sensibilité antibactérienne qui a été validé selon les directives internationales par NCCLS.

- ❖ Le bouillon Mueller Hinton (BMH) pour la détermination de la concentration minimale Inhibitrice CMI et la concentration minimale bactéricide (CMB) par la méthode de microdilution.

## **II.2. Méthodes**

### **II.2.1.Echantillonnage**

L'échantillonnage a été réalisé dans trois régions différentes, T'kout (*Artemisiaherbaalba*) et Arris (*Juniperusphoeniceae*) à Batna et Ain Mimoun (*Thymusalgeriensis*) à kenchela, durant le mois d'avril 2019(**figure 4et tableau 2**).



**Figure 4 :** Image satellitaire de la localisation des stations de collecte des plantes étudiées (Google Earth)

**Tableau 2 :** Lieux et dates d'échantillonnage.

Espèce	Région	La date de récolte	La latitude	La longitude
<i>A. herba alba</i>	T'kout	Avril 2019	35.669 <sup>0</sup> N	6.153 <sup>0</sup> E
<i>J. phoeniceae</i>	Ar'ris	Avril 2019	35.163 <sup>0</sup> N	6.244 <sup>0</sup> E
<i>Th. algeriensis</i>	Ain Mimoune	Avril 2019	35.283 <sup>0</sup> N	6.594 <sup>0</sup> E

Dans chaque stations les parties aériennes de cinq individus au minimum ont été prélevées au hasard, suivant un échantillonnage aléatoire.

Les échantillons ont été transportés dans des sacs en plastique étiquetés. L'identification des espèces a été effectuée à l'aide de la flore de **Quezel et Santa (1962,1963)**, et confirmée par Dr. ZERAIB Azzeddine, botaniste à la faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Abbes Laghrour, Khenchela.

Après la récolte et l'identification, le matériel végétal est nettoyé des impuretés, séché à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 15 jours, puis conservé dans des sachets en papier pour servir à l'extraction des huiles essentielles.

### **II.2.2.Extraction des huiles essentielles**

L'extraction des huiles essentielles à partir des parties aériennes des espèces choisies à été réalisée par la méthode d'hydrodistillation par entraînement à la vapeur d'eau (**figure5**).

La distillation a été réalisée par ébullition pendant 3 h. 1,5 L d'eau distillée est mis dans un ballon de 2 L surmonté d'une verrerie contenant 300 g de matériel végétal séché et coupé en petit morceaux puis un clevenger qui composé d'une colonne reliée à un réfrigérant. La vapeur d'eau entraîne les molécules volatiles qui se condensent dans le tube réfrigérant et le mélange huile-eau est recueilli dans une petite colonne à décanter liée au réfrigérant dans laquelle le mélange se sépare en deux phases non miscibles par la différence de leur densité. Une phase aqueuse (inferieure) et une phase huileuse (supérieure).



**Figure 5** : Montage de la distillation par entraînement à la vapeur d'eau (clevenger).

Après leur séparation, les huiles essentielles sont conservées à 4°C dans des flacons en verre emballés avec du papier aluminium jusqu'au moment de l'utilisation.

Selon la norme AFNOR (1986), le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la

$$\text{RHEs\%} = \frac{M'}{M} \times 100$$

masse de la matière végétale utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante:

RHE : Rendement en huile essentielle en % ;

M' : Masse d'huile essentielle en gramme ;

## Matériel et Méthodes

M : Masse de la plante en gramme.

### **II.2.2.Procédure microbiologique**

Deux méthodes différentes sont employées pour l'évaluation de l'effet antibactérien des huiles essentielles extraites :

Dans une première étape un test de la sensibilité des souches bactériennes en utilisant la méthode de diffusion sur disque, suivie d'une deuxième étape en déterminant la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB), et quantifiant les effets des produits bioactifs .

#### **II.2.2.1. Méthode de diffusion sur disques**

La méthode des disques est une méthode de diffusion des produits à tester à partir d'un disque de papier qui permet de mesurer qualitativement la sensibilité des souches aux effets antimicrobiens des huiles essentielles, grâce aux diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des disques mesurés en millimètres (**Aouni et al., 2013**).

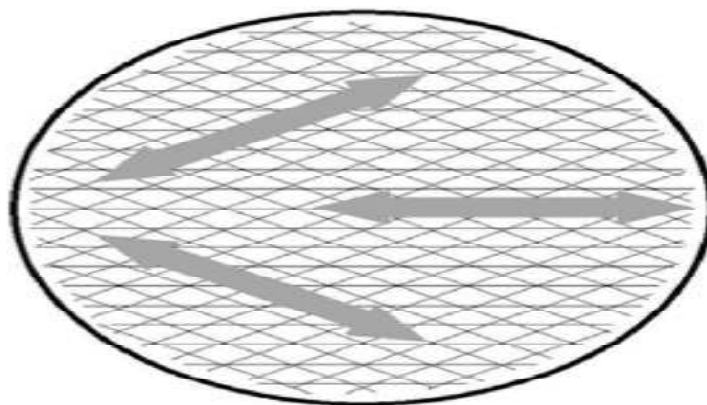
La méthode des disques a été choisie dans cette étude pour sa fiabilité et sa simplicité.

#### **Préparation de l'inoculum**

Chaque culture de souche à étudier est ensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice pour obtenir des colonies isolées. Après incubation pendant 18 heures à 37°C, quatre à cinq colonies bien isolées sont prélevées avec une anse stérile, puis transférées dans un tube de l'eau physiologique stérile. Une quantité suffisante de culture bactérienne est ensuite émulsionnée dans la solution (eau physiologique). La turbidité de la suspension est comparée à celle du standard McFarland en mesurant la densité optique (**Aouniet al., 2013**).

#### **Procédure d'inoculation**

Quinze minutes après l'ajustement de la turbidité de la suspension servant d'inoculum , on trempe un écouvillon de coton dans la suspension , qui est pressé fermement contre la paroi intérieure du tube, juste au-dessus du niveau du liquide et tourné afin d'enlever les liquides excédentaires. Le prélèvement est ensuite étalé à l'aide de l'écouvillon à trois reprises sur la surface entière de la gélose, en tournant la boîte d'environ 60° après chaque application pour obtenir une distribution égale de l'inoculum (**Aouniet al ., 2013**)



**Figure 6 :** Plaque de Mueller-Hinton à ensemercer en stries avec l'écouvillon sur toute la surface.

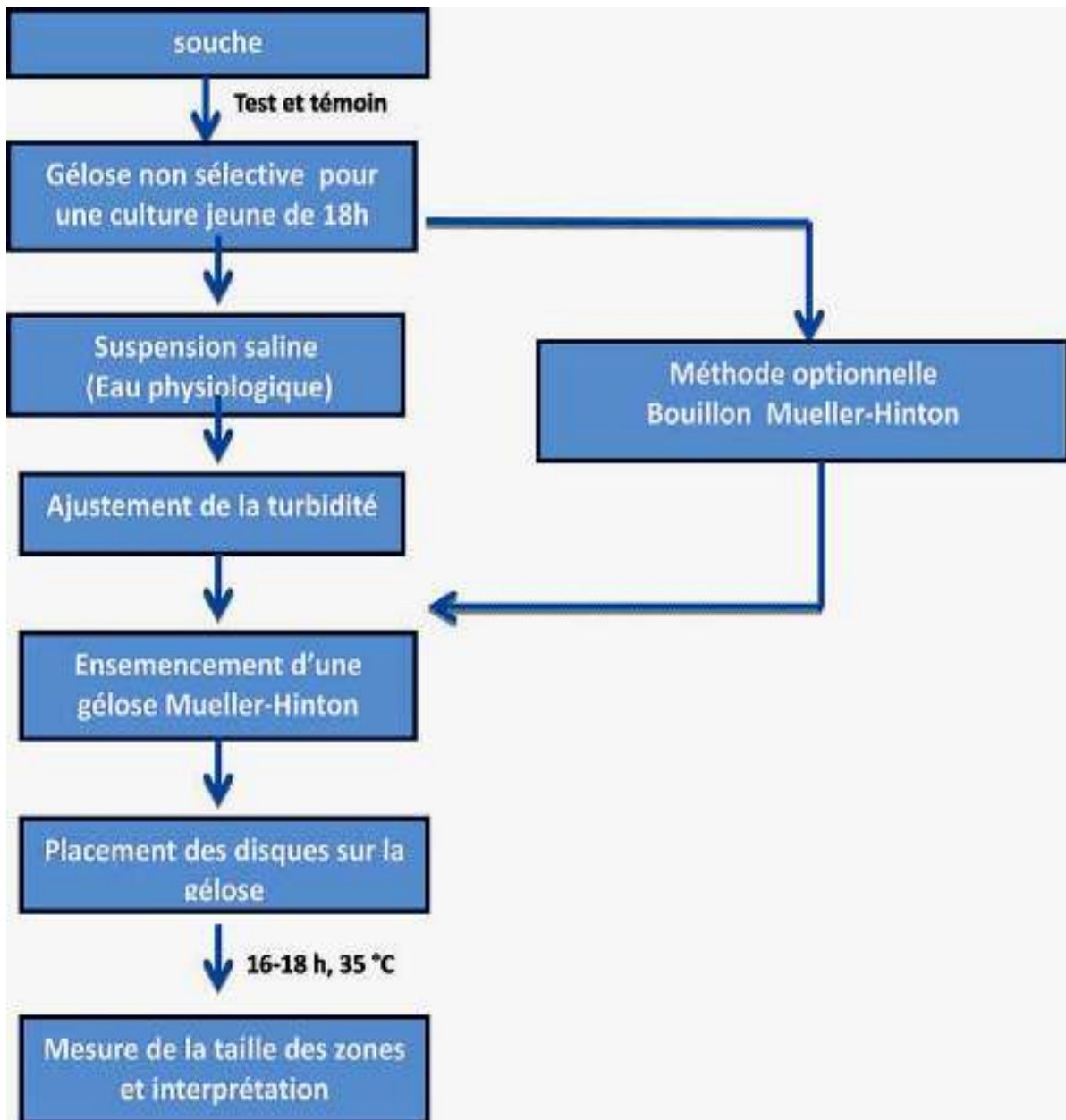
### **Mode opératoire**

Une suspension microbienne ayant une turbidité de 0,5 unité McFarland a été répartie sur une boîte de Petri contenant de l'agar Mueller-Hinton (MHA) à l'aide d'un coton-tige stérile. Des disques stérilisés (diamètre 6 mm) ont été imprégnés avec 10  $\mu$ l du mélange des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea*, *Thymus algeriensis* et *A. herba alba*, puis les disques ont été placés sur des plaques de gélose inoculées.

Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 °C pendant 18 h. L'activité antibactérienne de mélange a été déterminée en fonction du diamètre de la zone transparente autour du disque (zone d'inhibition). La zone d'inhibition a été interprétée comme:

- non sensible = diamètre total <8,00 mm.
- Sensible = diamètre total de 8-14 mm;
- Très sensible = diamètre total de 15–19 mm;
- Extrêmement sensible = diamètre total > 20 mm .

Chaque expérience a été réalisée en triple, et les résultats ont été exprimés en tant que moyenne  $\pm$  erreur type moyenne (**strains et al ., 2017**)



**Figure 7 :** Protocole opératoire du test de l'activité antibactérienne par la méthode des disques.

#### II.2.2.2. Méthode de microdilution

##### a- La concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode de la micro-dilution. Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentrations décroissantes des produits testés. Après incubation, l'observation de la plaque permet d'accéder à la CMI, la plus faible concentration du produit testé capable d'inhiber la croissance bactérienne (Khayet *al.*, 2016).

## Matériel et Méthodes

### **Mode opératoire**

La microdilution est réalisée dans des plaques de 96 puits à partir de la solution mère du mélange des 3 HEs dit «C1=D1», sept séries de dilution de l'extrait des 3 HEs à tester sont préparées dans les puits de la plaque.

La prise initiale de l'échantillon est de C1= 100 µl d'HE ,C1 est la concentration mère composée du mélange des 3HEs selon des proportions brevetées et confidentielles.

D1= 1/2= C1= 100µl d'HE

D2= 1/4

D3=1/8

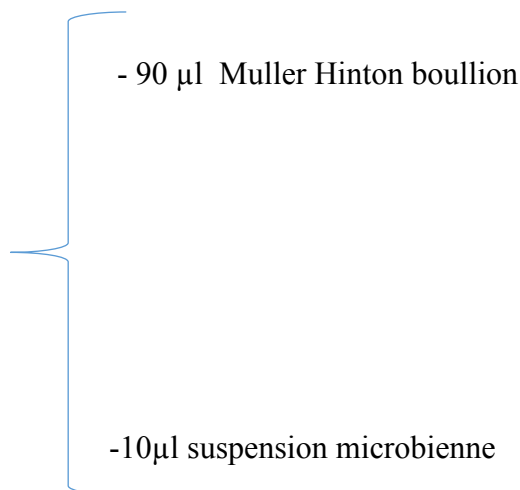
D4=1/16 +

D5=1/32

D6=1/64

D7=1/128

D8= 1/256



Ces puits sont inoculés à partir d'une solution de culture microbienne, en phase de croissance, en vue d'obtenir une concentration cellulaire finale d'environ  $10^5$  CUF/ml, concentration nécessaire pour former une colonie. Des puits sans échantillon d'HE servent de contrôle négatif. Dans les puits, les différentes souches sont soumises à des concentrations différentes du mélange des 3 HEs, de manière à mettre en évidence le pouvoir antimicrobien et le niveau d'inhibition. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 h et les valeurs de CMI ont été déterminées comme la concentration la plus faible des échantillons (correspond à un niveau de 99 % d'inhibition de la croissance) (Aouniet *al.*, 2013)

### **b- Concentration minimale bactéricide(CMB)**

Elle correspond à la plus petite concentration qui laisse survivre au plus 0,01% des germes de la suspension de départ en 24 heures (Traoré *et al.*, 2012).

Pour la détermination de la CMB, 100 µL de l'échantillons provenant de puits sans croissance visible ont été transférés sur bouillon Mueller Hinton (MHB) et ont été incubés pendant 24 h à 37 ° C. La plus faible concentration de l'échantillon qui pourrait tuer

## Matériel et Méthodes

touteLa population bactérienne initiale est rapportée sous forme de CMB (**Mazareiet rafati., 2019**).

Par ailleurs, le rapport CMB/CMI de chaque extrait a été calculé afin d'apprécier son pouvoir antibactérien, lorsque le rapport CMB/CMI d'une substance est inférieur ou égal à 4, cette substance est jugée bactéricide tandis qu'elle est dite bactériostatique, si ce rapport est supérieur à 4 (**Traoré et al., 2012**).

### **II.2.3. Plan expérimental**

La méthode de plans d'expériences a été utilisée pour trouver la formulation optimale en minimisant le nombre d'expériences. Cette stratégie permet de déterminer la relation existante entre les variables (les huiles essentielles des trois espèces choisies) et les réponses expérimentales mesurées (Zone d'inhibition, la concentration minimale inhibitrice et concentration minimale bactériostatique). La conception la plus simple possible à mettre en place lorsque les variables de processus sont des ingrédients ou des proportions est une conception de mélange (plan de mélange) (**Goupy et Creighton, 2007**).

Après la conception et la validation de plan expérimental, différentes réponses avec différentes combinaisons de constituants ont été estimées afin d'optimiser la composition des mélanges et de choisir les meilleures variantes de ces mélanges(**Khokhar et al., 2010**).

Dans notre cas, l'optimisation antibactérienne visait à trouver les constituants de la formulation donnant la meilleure combinaison possible de HE menant à une activité antibactérienne plus élevée.

#### **II.2.3.1. Contrainte fondamentale des mélanges**

Dans les plans d'expériences classiques (plans factoriels, plans pour surfaces de réponse) les facteurs sont indépendants. Cela signifie que l'on peut choisir en toute liberté le niveau d'un facteur quels que soient les niveaux déjà attribués aux autres facteurs. Par exemple, si, pour un plan  $2^4$ , on a choisi les niveaux des trois premiers facteurs, on pourra encore choisir librement les niveaux du quatrième facteur. Cette liberté n'existe pas lorsque l'on étudie des mélanges car, en général, on étudie les réponses en fonction des proportions des constituants du mélange(**Goupy et Creighton, 2007**).

Dans ce cas les facteurs d'étude sont les proportions des constituants du mélange. Comme la somme de ces proportions est toujours égale à 100 %, le pourcentage du dernier

## Matériel et Méthodes

constituant est imposé par la somme des pourcentages des premiers composés du mélange. Dans cette situation les facteurs ne sont pas indépendants et cela entraîne des problèmes particuliers. C'est à cause de cette contrainte que les mélanges doivent être étudiés à part car les représentations géométriques des plans de mélanges sont différentes des représentations utilisées pour les plans d'expériences classiques et les modèles mathématiques sont eux aussi profondément modifiés. (Goupy et Creighton, 2007).

### II.2.3.2. Stratégie expérimentale

Durant les années 1958-1962, plusieurs types de plans de mélanges ont été introduits par Scheffé suivant l'emplacement des points représentatifs des compositions. On distingue:

- les plans en réseaux ;
- les plans de mélanges centrés ;
- les plans de mélanges centrés augmentés.

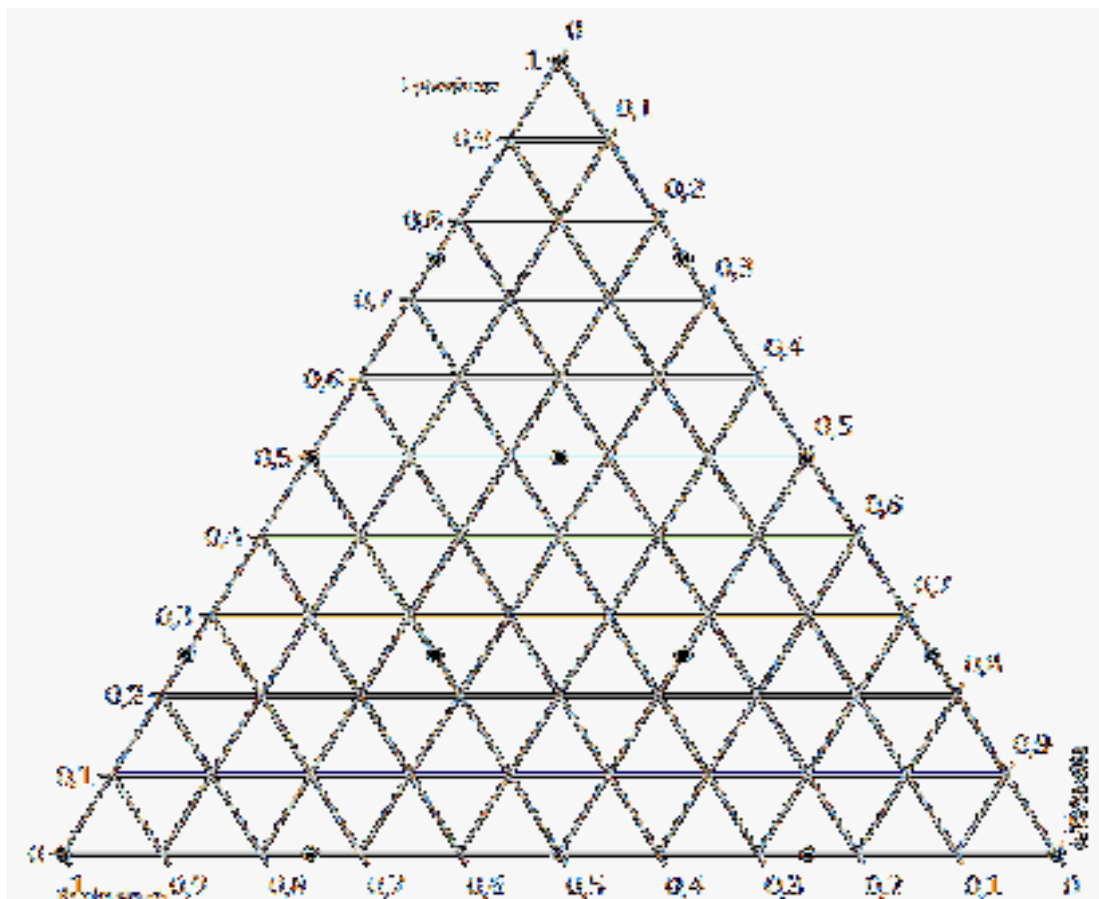
Dans cette étude on a choisi le plan en réseaux (*Simplex lattice designs* dans la littérature anglo-saxonne) à  $q$  constituants purs ( $q=3$  huiles essentielles) et la longueur de pas est égale à  $1/m = 4$ . Pour un plan  $\{q, m\}$ , le nombre total de compositions différentes est égal à :

$$C = \frac{(q + m - 1)!}{(m)! (q - 1)!}$$

Ces plans consistent à tester les constituants purs (les points : 1, 5 et 15), puis les mélanges des constituants pris deux à deux (50–50) (les points : 3, 10 et 12) et le mélange des trois constituants à différentes proportions dépend de la longueur de pas (0 %, 25 %, 50% et 75 %). Les points d'expériences sont reportés dans le **Tableau 3** et sur la **Figure 8**.

**Tableau 3 :** Matrice du plan de mélange utilisé noté {3,4}.

<b>Points</b>	<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>X3</i>
<b>1</b>	0	0	100
<b>2</b>		25	75
<b>3</b>		50	50
<b>4</b>		75	25
<b>5</b>	0	100	0
<b>6</b>	25	0	75
<b>7</b>	25	25	50
<b>8</b>	25	50	25
<b>9</b>	25	75	0
<b>10</b>	50	0	50
<b>11</b>	50	25	25
<b>12</b>	50	50	0
<b>13</b>	75	0	25
<b>14</b>	75	25	0
<b>15</b>	100	0	0



**Figure 8:** Plan de mélanges en réseaux (Simplex lattice designs) {3, 4}.

(●) points d'expérience (les mélanges)

### II.2.3.3. Facteurs étudiés

Les trois composants sont nommés facteurs et correspondent aux trois huiles essentielles étudiées ( $X_1$  : *J. phoenicea*,  $X_2$  : *Th. algeriensis* et  $X_3$  : *A. herba alba*).

### II.2.3.4. Réponses étudiées et mesures de ces réponses

Dans notre étude le plan de mélange en réseaux a été utilisé pour l'optimisation de de l'activité antibactérienne des mélange des trois huiles essentielles en utilisant six réponses, à savoir: la zone d'inhibition de l'*E. coli*(**Réponse  $Y_1$** ), la zone d'inhibition de *L.monocytogenes*(**Réponse  $Y_2$** ), la concentration minimale inhibitrice de l'*E. coli*(**Réponse  $Y_3$** ) la concentration minimale inhibitrice de *L.monocytogenes*(**Réponse  $Y_4$** ), la concentration minimale bactéricide de l'*E. coli*(**Réponse  $Y_5$** )et la concentration minimale bactéricide de *L.monocytogenes*(**Réponse  $Y_6$** ).

### II.2.3.5. Modèle mathématique

Pour ce type de plan, les fonctions généralement choisies sont des polynômes et leurs équations sont données sous forme canonique (Marti-Mestres *et al.* 1998). Pour exprimer les réponses en fonction des variables indépendantes basées sur la méthode de mélange, nous avons utilisé le modèle de régression quadratique:

$$Y = \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_3 X_3 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{13} X_1 X_3 + \alpha_{23} X_2 X_3$$

Avec :  $0 \leq X_i \leq 1$  pour  $i = 1, \dots, q$  ;  $\sum_{i=1}^q X_i = 1$  ou  $q = 3$  composants ;

Y : les réponses mesurées ;

$\alpha_1, \alpha_2$  et  $\alpha_3$  : sont des coefficients de termes linéaires ;

$\alpha_{12}, \alpha_{13}, \alpha_{23}$  : sont des coefficients de termes d'interaction ;

### II.2.3.6. Etude graphique des réponses – Courbes d'isoréponses

En utilisant le modèle choisi, les courbes d'isoréponses sont construites à intervalles réguliers. La finalité de l'étude est d'obtenir ces courbes de surface qui traduisent les variations de nos réponses c'est-à-dire la zone d'inhibition, la CMI et la CMB chez les deux souches testées *E. coli* et *L. monocytogenes*.

### II.2.4. L'analyse statistique

Tous les tests de cette études ont été triplés, et les résultats ont été exprimés en tant que moyenne  $\pm$  écart-type. Pour l'étude de l'optimisation de l'activité antibactérienne, les calculs et l'étude statistique sont réalisés à l'aide de **JMP13**. Une analyse de la variance à un seul facteur a été réalisée pour tester l'effet de la combinaison des huiles essentielles en utilisant le logiciel **Statistica08**.

# *Résultats et discussion*




### III- Résultats et discussion .

#### III .1.Extraction des huiles essentielles

##### III.1.1. Caractères organoleptique

L'hydro-distillation par entraînement à la vapeur d'eau de la partie aérienne des espèces étudiées a donné des huiles essentielles liquide à température ambiante, visqueux, volatiles, à une odeur forte et leur densité sont en général inférieure à celle de l'eau (**Tableau 4**).

**Tableau 4:**Caractères organoleptique des huiles essentielles étudiées.

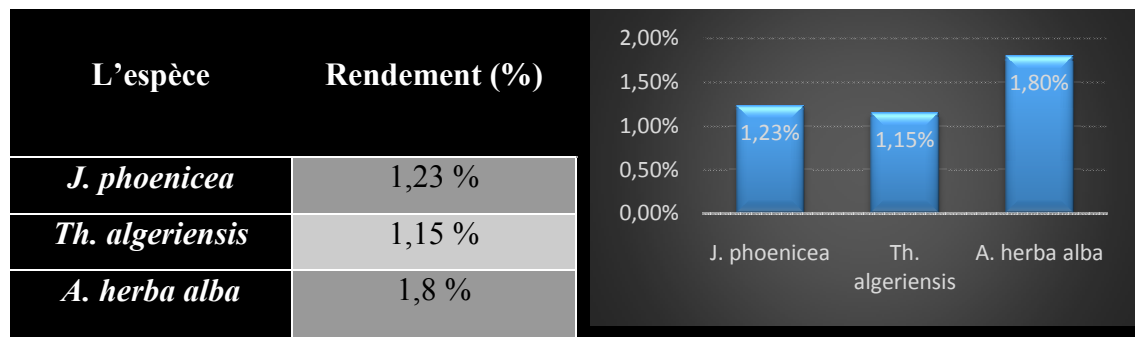
<b>Origine d'HE</b>	<b>Couleur</b>	<b>Odeur</b>	<b>Aspect</b>	<b>Photos</b>
<i>A. Herba alba</i>	Jaune verdâtre	Forte odeur rappelant l'odeur des feuilles	Liquide	
<i>J. phoenicea</i>	verdâtre	forte	Liquide	
<i>Th. algeriensis</i>	jaune	Epicée	Liquide	

### III- Résultats et discussion

#### III.1.2. Rendement en huiles essentielles

Cependant le rendement en huile essentielle a été calculé selon la norme AFNOR (1986) décrite précédemment et les résultats sont présentés dans le **tableau 5**.

**Tableau 5:** Rendements moyens en huiles essentielles de différentes plantes étudiées.



Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés en fonction de la matière végétale sèche de la partie aérienne de la plante. Les échantillons d'*A. herba-alba* ont fourni un taux d'environ (1,8 %) plus élevé que celui obtenu à partir de *J. phoenicea* (1,23 %) et *Th. algeriensis* (1,15 %).

Le rendement obtenu avec nos échantillons de *J. phoenicea* est largement plus important que celui signalés par d'autres travaux menés sur la même espèce de régions différentes. ceux de Tunisie par (Bouzouita *et al.*, 2008) (0,5%), la Grèce (0,21 %) , Espagne (0,30 %), Portugal (0,41 %) par (Adams *et al.*, 1996), et Égypte (0,30 %) par (El-Sawi *et al.*, 2007).

Le rendement en huile essentielle de *Th. algeriensis* de notre étude a été plus élevé que celui trouvé au Maroc 0,3 % par (Amarti *et al.*, 2010) et comparativement aux résultats trouvés par (Dob *et al.*, 2006) qui est de 0,13 % , nos échantillons ont fourni un rendement moyen très proche de référence (date) qui de xxx%, tandis que elle relativement présent un taux très faible par rapport d'autre travaux tel que (Zayyad *et al.*, 2014) qui est de 2,96 %.

Les échantillons d'*A. herba alba* présentent un taux très élevés par rapport à ceux de la même espèce récoltée dans la région de Matmata en Tunisie (0,65%) (Akrouf, 2004), de Djelfa (0,65 %) (Touil & Benrebiha, 2017), de Biskra (0,95%) (Bezza *et al.*, 2010) et de M'sila (1,02%) (Dob & Benabdelkader, 2006) en Algérie.

### III- Résultats et discussion

Cependant, le rendement obtenu est similaire à celui de la Jordanie (1,3%) (**Hudaiba & Aburjai 2006**) et du Maroc (1,2 %) (**Zaim et al. 2012**). Par contre, il est inférieur à celui rapporté dans les travaux de **Houari & Ferchichi (2009)** (1,93%) et de **Salido et al. (2004)** (2,30 %) à partir de la même espèce provenant de la Tunisie et de l'Espagne respectivement.

Le taux de rendement de l'huile essentielle de l'espèce *Artemisia herba-alba* varie en fonction de la période de récolte dans la région du Guerçif au Maroc; il est entre 0,56% et 1,23% (**Ghanmi et al., 2010**); en Espagne, il varie selon les provenances, de 0,41% à 2,30% (**Salido et al., 2004**); de même en Tunisie, il varie de 0,68 % à 1,93 % (**Houari & Ferchichi, 2009**). Le rendement peut varier en fonction de l'organe; en Tunisie les rendements étaient respectivement de 1,86%, 0,42%, 0,25% et 0,1% pour les feuilles, les feuilles/tiges, les tiges, et les racines (**Bellili et al., 2016**).

#### **III.2. Détermination de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles**

##### **III.2.1. L'activité antibactérienne des huiles essentielles seules**

L'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites a été évaluée vis-à-vis deux souche bactériennes de référence ATCC (*Listeria monocytogene*, et *Escherichia coli*), cette activité a été réalisée par la méthode d'aromatogramme (diffusion des disques sur milieu gélosé) pour vérifier qualitativement si le produit testé présentait un effet sur la croissance microbienne et suivie par un deuxième test plus spécifique permettant d'évaluer quantitativement l'effet antimicrobiens et bactéricides par la méthode de dilution.

##### **III.2.1.1. L'aromatogramme (méthode des disques)**

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces par la méthode de diffusion de disques sur milieu gélosé, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le **tableau 6**

### III- Résultats et discussion

**Tableau 6:** Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion sur disques.

HE	Bactérie	ZI en (mm)
<i>A. herba alba</i>	<i>E. coli</i>	11±1
	<i>L. monocytogenes</i>	8,67±0.58
<i>J. phenicea</i>	<i>E. coli</i>	15.33±0.58
	<i>L. monocytogenes</i>	8.67±0.58
<i>Th. algeriensis</i>	<i>E. coli</i>	9.33±0.58
	<i>L. monocytogenes</i>	7.67±0.58
<b>HE, huile essentielle ; ZI, Zone d'inhibition.</b>		

Les résultats du test d'aromatogramme montrent une variation dans l'efficacité des huiles essentielles testées vis-à-vis les deux souches bactériennes : *E.coli*, et *L. monocytogenes*

Il est important de noter que l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *J. phenicea* vis-à-vis l'*E.coli* est plus importante comparativement aux autres huiles essentielles testées qui a donné un diamètre de zone d'inhibition égale à 15.33±0.58 mm. Suivi par l'effet antibactérien de l'huile essentielle de l'*A. herba alba* (11±1). Cependant, les huiles essentielles de *Th. algeriensis* ont montré une activité antibactérienne faible vis-à-vis de l'*E. coli*. D'autre part, il s'est avéré que les essentielles des trois espèces étudiées sont inefficaces contre *L. monocytogenes*.

**Derwich et al. (2010)** ont rapporté que l'*E. coli* était la souche la plus sensible testée par l'huile essentielle de *J. phoenicea* avec la zone d'inhibition la plus forte (34 mm), alors que des zones d'inhibition de 24 mm étaient mesurées pour *S. aureus*.

D'autre part, nos résultats ne concordent pas avec ceux trouvés par **Ait-Ouazzouet al ., (2012)** sur l'activité antibactérienne de l'huile essentiel de *J. phenicea* vis-à-vis *L. monocytogenes* qui a donné une zone d'inhibition égale à ( 14.3±1.7). **Angioni et al. (2003)** ont également signalé que les HE des feuilles de *J. phoenicea* présentaient une faible activité contre *S. aureus* et aucune activité contre *E. coli* ou *P. aeruginosa* n'a été enregistré.

Il est connu que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des

### III- Résultats et discussion

différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y'a une reprise de la croissance bactérienne (**Dorman et Deans, 2000**)

L'activité antibactérienne des huiles essentielles est liée principalement aux composés majoritaires ou bien minoritaires. En effet, l'*E. coli* présentait une sensibilité nettement plus grande à la susceptibilité de certains composés, tels que le terpinène-4-ol ou le linalol (**Derwich et al., 2010**).

D'autres travaux ont suggéré aussi que Cette activité est attribuée principalement à son profil chimique riche en hydrocarbures terpéniques, notamment le  $\delta$ -3-carène et l' $\alpha$ -pinène. Ce dernier présente plusieurs activités biologiques : il est antibactérien, anti-inflammatoire, antiviral, sédatif, herbicide et insectifuge (**Mansouri et al., 2011**).

D'après les résultats obtenus, l'HE d'*A. herba alba* présente un effet antibactérien particulièrement considérable vis-à-vis *E. coli*, cette activité peut être expliquée par leurs richesses en composés oxygénés (chrysothénone, camphre,  $\alpha$ -terpin-7-al et trans- $\beta$ -terpinéol) (**Ghanmi et al., 2010**).

Les mêmes résultats ont été observés dans les travaux de **Zouari et al. (2010)** qui portent sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*A. herba alba* vis-à-vis l'*E. coli*, ils ont trouvé une zone d'inhibition égale à 11,3 mm. Dans les travaux de **Goudjiletal., (2015)**, ils ont montré que les microorganismes les plus sensibles aux huiles essentielles de cette espèce étaient la *salmonellaenterica*, le *Klebsiella pneumoniae* de Gram négatif, le *Listeria monocytogenes* et le *Staphylococcus* sp. de gram positif.

Nos résultats sur l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Th. algeriensis* ne sont pas en accord avec ceux de **Ait-Ouazzou et al., (2011)** qui ont confirmé l'huile de cette espèce a montré une activité antimicrobienne très importante, la zone d'inhibition la plus faible a été enregistré avec l'*E. coli* qui est de  $17.8 \pm 1.7$ mm.

**Amarti et al. (2010)** ont expliqués la faible activité des huiles essentielles de *Th. algeriensis* par sa richesse en monoterpènes hydrocarbones comme l' $\alpha$ -pinène, du  $\beta$ -pinène, et du limonène reconnus pour leur faible activité antibactérienne.

### III- Résultats et discussion

D'après nos résultats, il apparaît que les trois HEs inhibent la croissance d'*E. coli* GRAM(-) avec des degrés de sensibilité très élevés par rapport au *L. monocytogenes* (+), ceux qui ne concordent pas avec ceux trouvés par (Bouzouita *et al.*, 2008 ; Hammer *et al.*, 1999, 2002; Souza *et al.*, 2006; Derwich *et al.*, 2010 et Bari *et al.*, 2010) qui ont confirmé la grande résistance des bactéries G- par rapport aux G+.

L'organisation structurale de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est moins complexe que celle des bactéries à Gram négatif. Cette différence structurale rend moins sensible à l'action des huiles essentielles et des extraits de plantes (Kalemba et Kunicka., 2003).

Et enfin Le comportement des HE et des antimicrobiens peut être sévèrement modifié en présence de solvants ou sous l'influence de facteurs tels que le pH, la capacité du composé antibactérien à diffuser uniformément à travers la gélose, le volume d'HE placé sur le papier disques ou l'épaisseur de la couche de gélose (Angioni *et al.*, 2003).

#### III.3.1.2. L'activité antibactérienne par la méthode de microdilution

Les huiles essentielles des trois espèces étudiées ont été testées également vis-à-vis les deux souches bactériennes *E. coli* et *L. monocytogenes* par la méthode de microdilution pour évaluer leur effet bactéricide. Les résultats sont illustrés dans le **tableau 7**.

**Tableau 7:** Résultats de l'activité antibactérienne par la méthode de microdilution.

HE	Bactérie	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)	CMB/CMI
<i>A. herba alba</i>	<i>E. coli</i>	31,25	500	16 (bactériostatique)
	<i>L. monocytogenes</i>	250	1000	4 (bactériostatique)
<i>J. phenicea</i>	<i>E. coli</i>	125	500	4 (bactériostatique)
	<i>L. monocytogenes</i>	31,25	500	16 (bactériostatique)
<i>Th. algeriensis</i>	<i>E. coli</i>	62.5	500	8 (bactériostatique)
	<i>L. monocytogenes</i>	62,5	62.5	1 (bactéricide)
<b>HE</b> , huile essentielle ; <b>CMI</b> , Concentration minimale inhibitrice ; <b>CMB</b> concentration minimale bactériostatique				

### III- Résultats et discussion

Comme on peut le voir dans le **tableau 7**, les résultats ont montré des degrés variables d'activité antibactérienne contre toutes les souches testées. Les valeurs de CMI vont de 31,25 à 250 µl/ml. Ces valeurs mettent en évidence une faible activité comparativement aux résultats des travaux antérieurs sur les mêmes espèces.

En effet, les valeurs de CMI rapportées dans les travaux d'**Ait-Ouazzou et al.(2011)** sur le *Thymus algeriensis* et de **Goudjil et al. (2015)** sur l'*A. herba alba* vis-à-vis les deux souches bactériennes testées et les travaux d'**Ait-Ouazzou et al.(2012)** sur *J. phoeniceae* vis-à-vis *Listeria monocytogenes* sont comprises entre 0,2 et 1,0 µl /ml. Cependant, la CMI de l'huile essentielle extraite de *J. phoeniceae* vis-à-vis l'*E. coli* est similaire au CMI obtenue dans nos résultats qui est de 30 µl /ml (**Ait-Ouazzou et al.,2012**).

Cette variabilité peut être expliquée par la variation de la composition chimique des huiles essentielles. Les composés majoritaires sont souvent responsables de l'activité antibactérienne observée (**Kalemba et Kunicka, 2003**), mais, les composés moins abondants devraient également être envisagés (**Ultee et al., 2002**). Un effet synergique de tous les composants chimiques présents dans l'huile peut également être impliqué (**Pavithra et al., 2009**).

Les résultats des CMI obtenues par la méthode de microdilution montrent qu'ils ne sont pas corrélés avec ceux obtenus par la méthode des disques; l'activité de l'HE de *Thymus algeriensis* s'avère plus efficace en milieu liquide. Cela peut s'expliquer par la diversité moléculaire des huiles qui ne réagissent pas de la même manière, la composition et la concentration de l'HE et sa solubilité dans le milieu utilisé (propriété hydrophobe des huiles)(**Bekhechi., et al 2008**).

De plus, si les résultats obtenus en milieu liquide sont supérieurs à ceux obtenus en milieu solide, c'est que surtout, en milieu liquide, l'évaporation des huiles essentielles est nulle et donc ces huiles exercent leur activité de manière plus efficace et plus prolongée.

La variabilité des constituants des HEs suggère qu'elles agissent sur plusieurs sites d'action dans les microorganismes, étant donné que chaque composé possède son propre mode d'action (**Burt, 2004**).

### III- Résultats et discussion

#### III.3. L'activité antibactérienne des huiles essentielles en combinaison

Le test de combinaison des huiles essentielles (mélanges) a été effectué par les deux méthodes ; la méthode de diffusion sur disques et la méthode de microdilution sur plaque. Les résultats obtenus sont illustrés dans les tableaux 8 et 9 :

**Tableau 8:** Résultats de l'activité anti *E. coli* des huiles essentielles en combinaison.

La composition du mélange des HE %			L'activité antibactérienne des mélanges			
<i>Juniperus phoenicea</i>	<i>Thymus algeriensis</i>	<i>Artemisia herba alba</i>	ZI (mm)	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)	CMB/CMI
0	25	75	11,67±0,58	62,5	125	2 (bactéricide)
0	50	50	13,00±1	62,5	62,5	1 (bactéricide)
0	75	25	15,33±0,58	62,5	250	4 (bactériostatique)
25	0	75	13,33±0,58	62,5	500	8 (bactériostatique)
25	25	50	12,67±0,58	62,5	250	4 (bactériostatique)
25	50	25	16,67±0,58	62,5	250	4 (bactériostatique)
25	75	0	19,67±0,58	31,25	250	8 (bactériostatique)
50	0	50	13,00±1	125	500	4 (bactériostatique)
50	25	25	17,33±0,83	62,5	125	2 (bactéricide)
50	50	0	21,00±1,0	31,25	500	16 (bactériostatique)
75	0	25	15,67±0,58	125	250	2 (bactéricide)
75	25	0	21,67±0,58	62,5	500	4 (bactériostatique)

HE, huile essentielle ; ZI, Zone d'inhibition ; CMI, Concentration minimale inhibitrice ; CMB concentration minimale bactériostatique

Nos résultats montrent que les mélanges d'huiles essentielles testés ont eu une activité antibactérienne importante en inhibant la croissance des germes bactériens, cette activité varie selon le type et la proportion d'huile essentielle dans le mélange. Les CMI les plus faibles ont été enregistrés dans les mélanges qui constituent des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *Th.algeriensis* pour l'*E. coli* et les mélanges qui constituent des huiles des trois espèces végétales pour *L. monocytogenes*.

### III- Résultats et discussion

**Tableau 9:** Résultats de l'activité anti *L. monocytogenes* des huiles essentielles en combinaison.

La composition du mélange en %			L'activité antibactérienne des mélanges			
<i>Juniperus phoenicea</i>	<i>Thymus algeriensis</i>	<i>Artemisia herba alba</i>	ZI (mm)	CMI (µl/ml)	CMB (µl/ml)	CMB/CMI
0	25	75	9,67±0,58	0,5	0,5	1
0	50	50	11,00±1	0,125	0,5	4
0	75	25	8,33±0,58	0,125	0,25	2
25	0	75	10,67±0,58	0,0625	0,25	4
25	25	50	7,67±0,58	0,03125	0,5	16
25	50	25	10,33±0,58	0,125	0,5	4
25	75	0	8,33±0,58	0,0625	0,5	8
50	0	50	11,33±0,58	0,0625	0,25	4
50	25	25	6,67±0,58	0,125	0,5	4
50	50	0	6,67±0,58	0,25	0,25	1
75	0	25	8,33±0,58	0,0156	0,25	16
75	25	0	7,67±0,58	0,03125	0,25	8

**HE**, huile essentielle ; **ZI**, Zone d'inhibition ; **CMI**, Concentration minimale inhibitrice ; **CMB** concentration minimale bactériostatique

Cependant, Les CMBs les plus faibles ont été enregistré dans les mélanges qui constituent des huiles essentielles de *Th.algerienis* et *A. herba alba* pour l'*E. coli* et les mélanges qui constitue des huiles des trois espèces végétales pour *L. monocytogenes*.

Le mécanisme d'action des huiles essentielles vis-à-vis des micro-organismes est complexe et n'a pas encore été pleinement expliqué (**Kalemba et Kunicka, 2003**), car chaque huile essentielle a une composition chimique particulière et des propriétés biologiques spécifiques, et chaque type de micro-organisme a une sensibilité distincte (**Bouhdid et al., 2012**).

Il existe un nombre limité d'articles traitant le mécanisme d'action de combinaisons des huiles essentielles ou de leurs composants. Cependant, il existe certains mécanismes généralement acceptés d'interaction antimicrobienne qui produisent une synergie. Ils incluent

### III- Résultats et discussion

l'inhibition séquentielle d'une voie biochimique commune, l'inhibition d'enzymes protectrices et l'utilisation d'agents actifs de la paroi cellulaire pour améliorer l'absorption d'autres antimicrobiens (**Santiesteban-Lopez et al., 2017**).

L'effet antibactériens des mélanges qui constituent des huiles essentielles de *J. phoenicea* riche monoterpènes hydrocarbonés (**Ramdani et al., 2013**) et et les huiles essentielles de *Thymus algeriensis* riche en phénols peut être expliqué par l'effet synergique entre le carvacrol et certains hydrocarbures monoterpènes (tels que l' $\alpha$ -pinène, le camphène, le myrcène, l' $\alpha$ -terpinène et le p-cymène), la capacité des hydrocarbures à interagir avec la membrane cellulaire et facilite la pénétration du carvacrol dans la cellule (**Ultee et al., 2000**).

**Pei et al., (2009)** ont émis l'hypothèse que les effets synergiques d'eugénol / carvacrol et d'eugénol / thymol pourraient être dus au fait que le carvacrol et le thymol a désintégré la membrane externe de *E. coli*, ce qui a facilité l'entrée de l'eugénol dans le cytoplasme et sa combinaison avec des protéines. Ils ont également observé l'effet synergique de l'eugénol / cinnamaldéhyde qui est due probablement aux interactions de ces composants avec différentes protéines ou enzymes.

**Zore et al., (2011)** ont proposé deux hypothèses pour expliquer les effets synergiques du cinnamaldéhyde / thymol ou du cinnamaldéhyde / carvacrol sur *S. typhimurium*:

- Le thymol ou le carvacrol pourrait augmenter la perméabilité de la membrane cytoplasmique et probablement permettre au cinnamaldéhyde d'être plus facilement transporté dans la cellule.

- Le thymol ou le carvacrol pourrait augmenter le nombre, la taille ou la durée d'existence des pores créés par la liaison du cinnamaldéhyde aux protéines de la membrane cellulaire, de sorte à produire un effet synergique, lorsque ces deux composants sont utilisés en combinaison.

#### **III.4. L'optimisation de l'activité antibactérienne par le plan de mélange**

L'optimisation par plans d'expérience est moins coûteuse et consomme moins du temps par rapport aux méthodes classiques car plusieurs paramètres sont testés simultanément avec un nombre d'expériences minimale d'une manière à trouver les interactions entre les variables. Ils offrent une grande quantité d'information à partir d'un nombre réduit d'essais (**Montgomery, 2001**). Dans notre étude le plan de mélange en réseaux a été utilisé pour la modélisation et l'optimisation de l'activité antibactérienne de mélange des huiles essentielles de trois plantes médicinales (*J. phoenicea*, *Th. algeriensis* et *A. herba alba*) en mesurant six réponses à savoir:

- le diamètre de la zone d'inhibition de l'*E. coli* (ZI *E. coli*) ;
- le diamètre de la zone d'inhibition de *L. monocytogenes*(ZI *L. monocytogenes*) ;
- la concentration minimale inhibitrice de l'*E. coli* (CMI *E. coli*) ;
- la concentration minimale inhibitrice de *L. monocytogenes*(CMI *L. monocytogenes*) ;
- la concentration minimale bactéricide de l'*E. coli* (CMB *E. coli*) ;
- la concentration minimale bactéricide de *L. monocytogenes*(CMB *L. monocytogenes*).

Pour les six réponses, l'influence et les interactions entre les facteurs indépendants (les différents pourcentage de trois huiles dans le mélange) a été étudiée. La construction de la matrice des expériences nous a donné 15 essais. Les expériences ont été réalisées aléatoirement en triples. Les valeurs trouvées ont été comparées avec les valeurs prévues par le modèle pour vérifier sa performance.

Les résultats des 15 mélanges, statistiquement équilibrés avec les trois facteurs (*J. phoenicea*, *Th. algeriensis* et *A. herba alba*) peuvent bien exploiter les 10 compositions dans l'élaboration des modèles mathématiques. Ces modèles ont facilité la visualisation de l'effet de chaque huile essentielle séparément et en combinaison avec d'autres huiles sur les effets antibactériens, par des diagrammes ternaires avec des courbes iso-réponses.

Après traitement de ces résultats par le logiciel JMP13 et l'application de la modélisation par plan de mélange, nous avons trouvés des modèles mathématiques prédictifs, liant les réponses étudiées aux composants du mélange étudié.

### III- Résultats et discussion

#### III.4.1. Modélisation de l'activité anti *E. coli*

##### III.4.1.1- Diamètre de la zone d'inhibition

Les résultats obtenus du diamètre de la zone d'inhibition de l'*E. coli* sont comparés dans le **tableau10** avec les résultats prévus par le logiciel JMP13.

**Tableau 10:** Comparaison entre les résultats prévus et mesurés du diamètre de la zone d'inhibition de l'*E. coli*.

<i>J. phoenicea</i>	<i>Th. algeriensis</i>	<i>A. herba alba</i>	DZI mesurés(mm)	DZI prévus(mm)
0	0	100	11,00	10,881
0	25	75	11,67	12,394
0	50	50	13,00	12,953
0	75	25	15,33	12,559
0	100	0	9,33	11,211
25	0	75	13,33	11,988
25	25	50	12,67	15,061
25	50	25	16,67	17,180
25	75	0	19,67	18,346
50	0	50	13,00	13,226
50	25	25	17,33	17,859
50	50	0	21,00	21,538
75	0	25	15,67	14,594
75	25	0	21,67	20,787
100	0	0	15,33	16,094
<b>DZI</b> : diamètre de la zone d'inhibition.				

D'après les résultats montrés dans le **tableau 10** , il est clair que les valeurs mesurées sont très proches des valeurs prévues ce qui prouve l'intérêt du model.

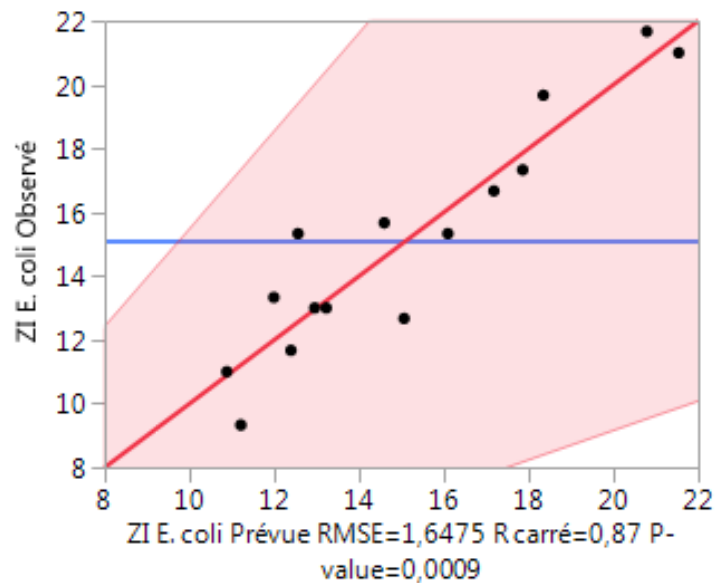
### III- Résultats et discussion

#### 4.1.1.1.L'analyse de la variance et la régression linéaire

L'analyse du modèle par le test ANOVA été très hautement significatif ( $p = 0.0009$ ). D'une autre part la valeur du coefficient de détermination ( $R^2$ ) était de l'ordre de 0.87 montrant la bonne concordance entre les données expérimentales et celles prévues pour toute la régression. Autrement dit le modèle de réponse a pu expliquer 87% des variations totales, et par conséquent, il reste 13% des variations qui ne sont pas expliquées par ce modèle. Les résultats de l'analyse de la variance et de la régression sont résumés dans le **tableau 11** et la **figure 9**

**Tableau 11:** L'analyse de la variance pour le diamètre de la zone d'inhibition d'*E. coli*.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	5	162,02410	32,4048	11,9390
Résidus	9	24,42787	2,7142	<b>Prob. &gt; F</b>
Total corrigé	14	186,45197		<b>0,0009*</b>



**Figure 9:** Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des zones d'inhibition d'*E. coli*.

### III- Résultats et discussion

#### 4.1.1.2. La validité de model

Si l'effet anti *E. coli* par la méthode de diffusion suit le modèle mathématique, la réponse en chaque point du domaine expérimental peut être calculée à partir de l'équation donnée. Mais il est toujours possible de trouver une équation mathématique donnant le coefficient  $\alpha_i$  avec les essais réalisés.

Donc, il est nécessaire de valider le modèle utilisé, et pour cela certains auteurs utilisent des points tests supplémentaires pour vérifier que la différence entre la réponse expérimentale et la réponse calculée est du niveau de l'erreur expérimentale (Cornell, 1990).

D'autres auteurs préfèrent utiliser le modèle qui maximise les coefficients de détermination multiple  $R^2$  et  $R^2$  ajusté ( $R^2A$ ) (Marti *et al.*, 1998). Pour chaque réponse de notre étude nous utiliserons le modèle qui maximise le  $R^2$  et le  $R^2A$ .

**Tableau 12:** Résumé de l'ajustement de model de l'effet anti *E. coli* par la méthode de diffusion des disques sur gélose.

R carré	0,868986
R carré ajusté	0,7962
Racine de l'erreur quadratique moyenne	1,647485
Moyenne de la réponse	15,11133
Observations (ou sommes pondérées)	15

En plus des résultats de l'ANOVA, les résultats de manque d'ajustement (Tableau 12) confirment la fiabilité de modèle mathématique élaboré.

#### 4.1.1.3. Le model mathématique

Une estimation des coefficients de ce modèle est donnée le tableau 13

### III- Résultats et discussion

**Tableau 13:** Estimations des coefficients de la réponse DZI d'*E. coli*.

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. >  t
<i>J. phoeniceae</i> (Mélange)	16,093714	1,433542	11,23	<,0001*
<i>Th. algeriensis</i> (Mélange)	11,210857	1,433542	7,82	<,0001*
<i>A. herba-alba</i> (Mélange)	10,880857	1,433542	7,59	<,0001*
<i>J. phoeniceae</i> * <i>Th. algeriensis</i>	31,542857	6,1011	5,17	0,0006*
<i>J. phoeniceae</i> * <i>A. herba-alba</i>	-1,045714	6,1011	-0,17	0,8677
<i>Th. algeriensis</i> * <i>A. herba-alba</i>	7,6285714	6,1011	1,25	0,2427

Le modèle mathématique retenu pour le diamètre de la zone d'inhibition d'*E.coli* est :

$$\text{Diamètre de la zone d'inhibition d'E. coli} = 16.093 * J. phoenicea + 11.2108 * Th. algeriensis + 10.8808 * A. herba alba + J. phoenicea * (Th. algeriensis * 31.5428) - J. phoenicea * (A. herba alba * 1.0457) + Th. algeriensis * (A. herba alba * 7.6328)$$

A partir du modèle statistique dérivé, il est clair que les ajouts (huiles essentielles) utilisés ont une influence sur le la zone d'inhibition d'*E. coli* comme l'indique les coefficients de chaque paramètres. Les résultats trouvés montrent aussi que le type et la proportion des huiles essentielles utilisées et leurs mélanges influents sur la zone d'inhibition d'*E. coli*.

A partir du modèle, nous constatons que le diamètre de la zone d'inhibition d'*E. coli* est conditionné d'abord par les huiles essentielles de *J. phoenicea*, suivie par celles de *Thymus algériensis*, et *Artemisia herba alba* ensuite par les effets couplés (*J. phoenicea*\* *Thymus algériensis*)

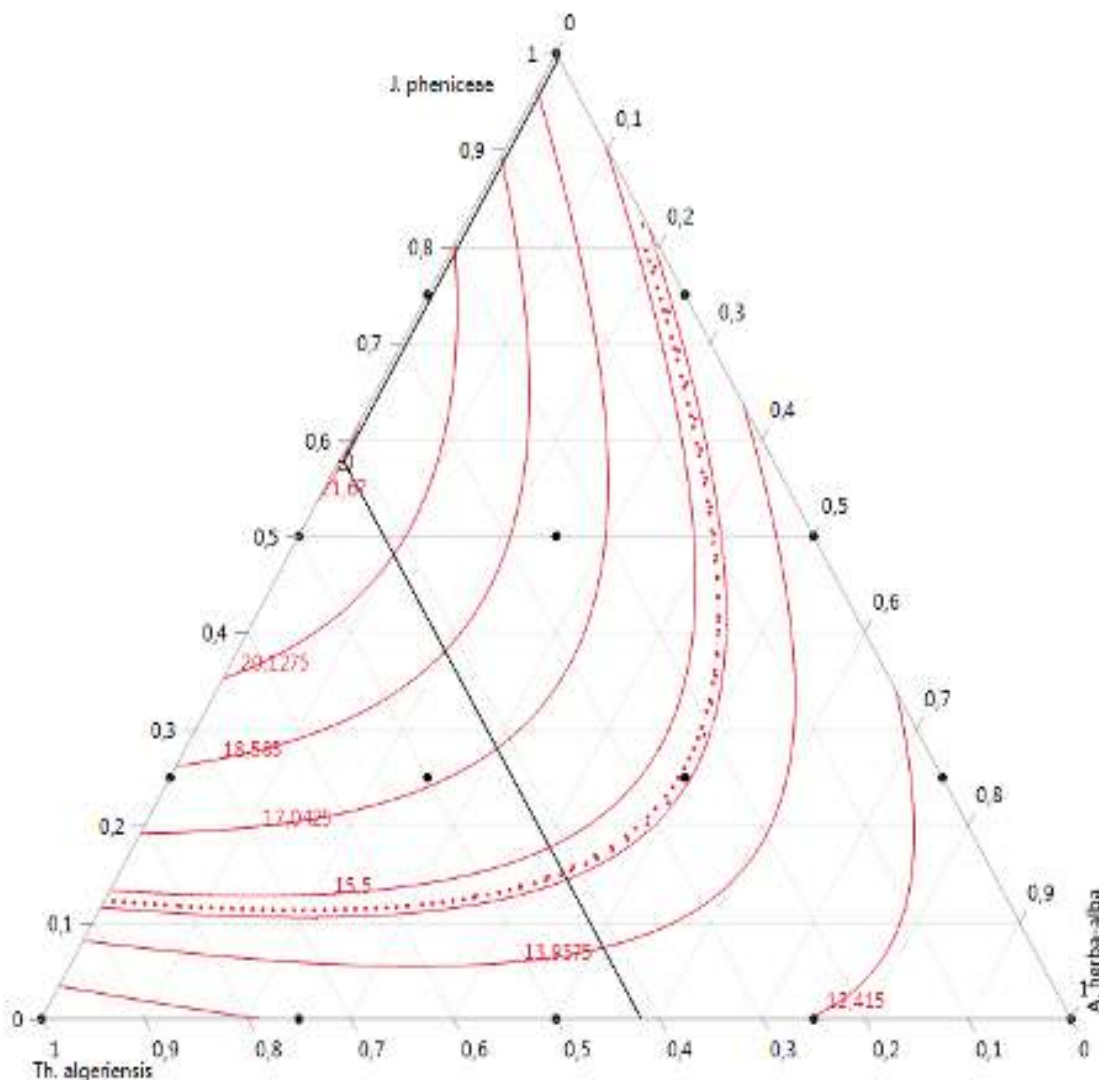
#### 4.1.1.4.L'optimisation de diamètre de la zone d'inhibition d'*E. coli*

Le modèle de régression développé peut être représenté par une courbe iso-réponse (**figure 10**) pour comprendre l'interaction des trois variables et pour déterminer le niveau optimal de chaque variable afin d'optimiser l'activité anti *E. coli* par la méthode de diffusion.

D'après l'analyse des résultats trouvés, on constate que la présence des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *Th. algeriensis* dans le mélange avec une concentration importante fait

### III- Résultats et discussion

augmenter le DZI d'*E. coli* par contre pour l'huile essentielle d'*A. herba alba*. Cela est peut être expliqué par la compétition ente les constituants des huiles essentielles de cette dernière d'un côté et des huiles essentielles de *J. phoenicea* et de *Th. algeriensis* de l'autre côté.

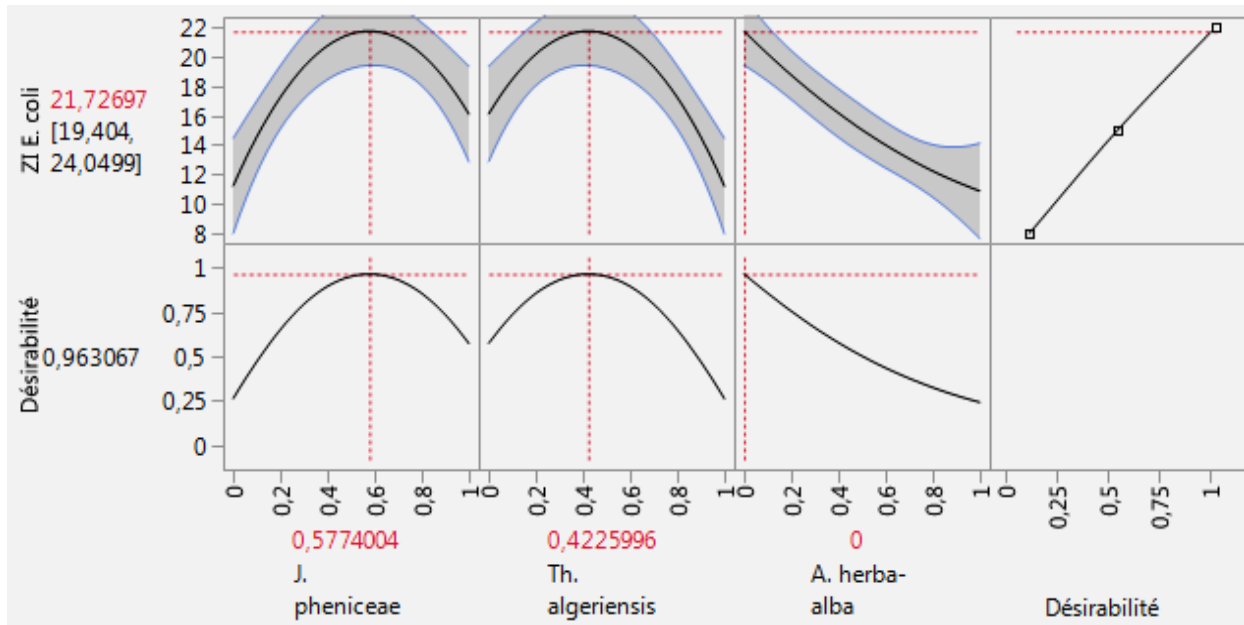


**Figure 10:** Courbes iso-réponses de diamètre de la zone d'inhibition d'*E. coli*

D'après le profileur de prévision du DZI d'*E. coli* (**figure 11**) qui a permis d'établir des courbes ayant pour but de faciliter l'interprétation et de permettre une meilleure analyse, on constate que la présence de l'huile essentielle de *J. phoenicea* fait augmenter le DZI d'*E. coli*, notamment pour le pourcentage de 57.74% et 42.25 % de l'huile essentielle de *Th. algeriensis* et

### III- Résultats et discussion

de 0% de l'huile essentielle d'*A. herba alba*, c'est le mélange qui peut donner la zone d'inhibition maximale qui est de 21.72 mm.



**Figure 11:**Profileur de prévision du diamètre de la zone d'inhibition d'*E. coli*

#### III.4.1.2- Modélisation de la concentration minimale inhibitrice

Les résultats obtenus de la méthode de microdilution pour l'*E. coli* sont comparés dans le **tableau 14** avec les résultats prévus.

D'après les résultats montrés dans le tableau, les valeurs mesurées sont très proches des valeurs prévues ce qui prouve l'intérêt du modèle, ce qui est prouvé même statistiquement.

### III- Résultats et discussion

**Tableau 14:** Comparaison entre les résultats prévus et mesurés du CMI l'*E. coli*.

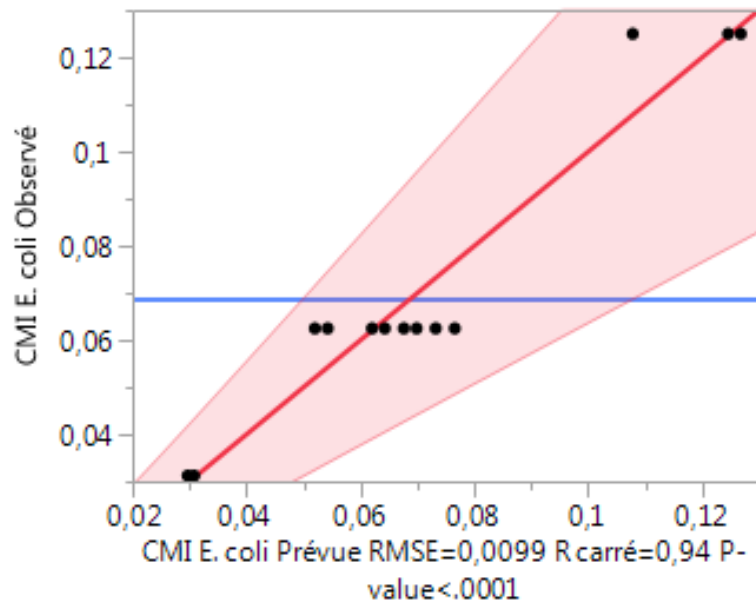
<i>J. phoenicea</i>	<i>Th. algeriensis</i>	<i>A. herba alba</i>	CMI mesurés	CMI prévus
0	0	100	0,03125	0,033343
0	25	75	0,0625	0,049336
0	50	50	0,0625	0,059984
0	75	25	0,0625	0,065284
0	100	0	0,0625	0,065238
25	0	75	0,0625	0,07389
25	25	50	0,0625	0,064113
25	50	25	0,0625	0,048989
25	75	0	0,03125	0,028519
50	0	50	0,125	0,10351
50	25	25	0,0625	0,067963
50	50	0	0,03125	0,027068
75	0	25	0,125	0,122204
75	25	0	0,0625	0,060885
100	0	0	0,125	0,12997
<b>CMI : concentration minimale inhibitrice</b>				

En effet, l'analyse du modèle par le test ANOVA a été très hautement significative ( $p < 0.001$ ) (**Tableau 15**). En outre, le modèle de réponse a pu expliquer 94% des variations totales, et par conséquent, il reste 6% des variations qui ne sont pas expliquées par ce modèle (**figure 12**).

**Tableau 15:** L'analyse de la variance pour la CMI d'*E. coli*.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	5	0,01318359	0,002637	27,0000
Résidus	9	0,00087891	0,000098	<b>Prob. &gt; F</b>
Total corrigé	14	0,01406250		<b>&lt;,0001*</b>

### III- Résultats et discussion



**Figure 12:** Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMI d'*E. coli*.

Les coefficients issus de la modélisation, les coefficients de corrélation ( $R^2$ ), les rapports et les probabilités p-value de la réponse étudiée (la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli*) sont regroupés dans les **tableaux 16** et **17** respectivement.

**Tableau 16:** Résumé de l'ajustement de model de l'effet anti *E. coli* par la méthode microdilution.

R carré	0,9375
R carré ajusté	0,902778
Racine de l'erreur quadratique moyenne	0,009882
Moyenne de la réponse	0,06875
Observations (ou sommes pondérées)	15

### III- Résultats et discussion

**Tableau 17:**Estimations des coefficients de la réponse CMI d'*E. coli*.

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. >  t
<i>J. phoeniceae</i> (Mélange)	0,1267857	0,008599	14,74	<,0001*
<i>Th. Algeriensis</i> (Mélange)	0,0620536	0,008599	7,22	<,0001*
<i>J. phoeniceae</i> * <i>Th. algeriensis</i>	-0,258929	0,036596	-7,08	<,0001*
<i>A. herba-alba</i> (Mélange)	0,0308036	0,008599	3,58	0,0059*
<i>J. phoeniceae</i> * <i>A. herba-alba</i>	0,1160714	0,036596	3,17	0,0113*
<i>Th. algeriensis</i> * <i>A. herba-alba</i>	0,0714286	0,036596	1,95	0,0827

Donc, le modèle mathématique retenu pour la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli* est :

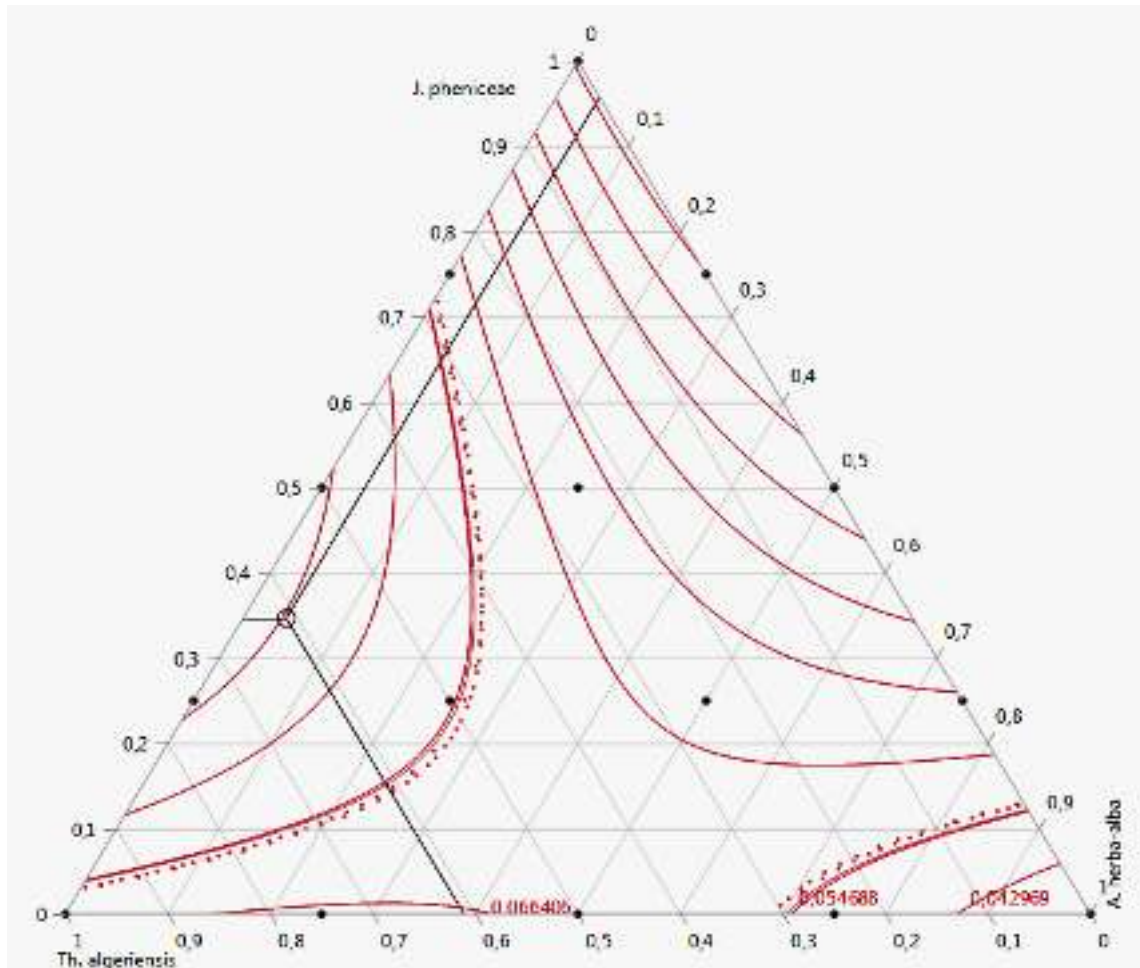
$$\text{Diamètre de la zone d'inhibition d'E. coli} = 0.1267 * J. phoenicea + 0.0620 * Th. algeriensis - J. phoenicea * (Th. algeriensis * 0.2589) + 0.0308 * A. herba alba + J. phoenicea * (A. herba alba * 0.1160) + Th. algeriensis * (A. herba alba * 0.0714)$$

Les résultats trouvés montrent aussi que le type et la proportion des huiles essentielles utilisées et leurs mélanges influents sur la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli*.

A partir du modèle, nous constatons que la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli* est conditionné d'abord par les huiles essentielles de *J. phoenicea*, suivie par celles de *Thymus algériensis*, et les effets couplés (*J. phoenicea*\* *Thymus algériensis*) ensuite par *Artemisia herba alba* et les effets couplés (*Thymus algériensis* \* *Artemisia herba alba*)

Pour comprendre l'interaction des trois variables (huiles essentielles), le modèle de régression développé est représenté par une courbe iso-réponse (**figure 13**).

D'après le graphique de **la figure 13**, on constate que la présence des huiles essentielles de *J. phoenicea* et *Th. algeriensis* dans le mélange avec une concentration importante fait diminuer la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli*.



**Figure 13:** Courbes iso-réponses de la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli*

D'après le profileur de prévision de la CMI d'*E. coli* (**figure 14**) qui a permis d'établir des courbes ayant pour but de faciliter l'interprétation et de permettre une meilleure analyse, on constate que la présence de l'huile essentielle de *Th. algeriensis* et de *J. phoenicea* fait diminuer la CMI d'*E. coli*, notamment pour le pourcentage de 62.5% et 37.5 % de *Th. algeriensis* et de *J. phoenicea* respectivement, mélange qui peut donner une CMI d'*E. coli* égale à 0.025 µl/ml.

### III- Résultats et discussion

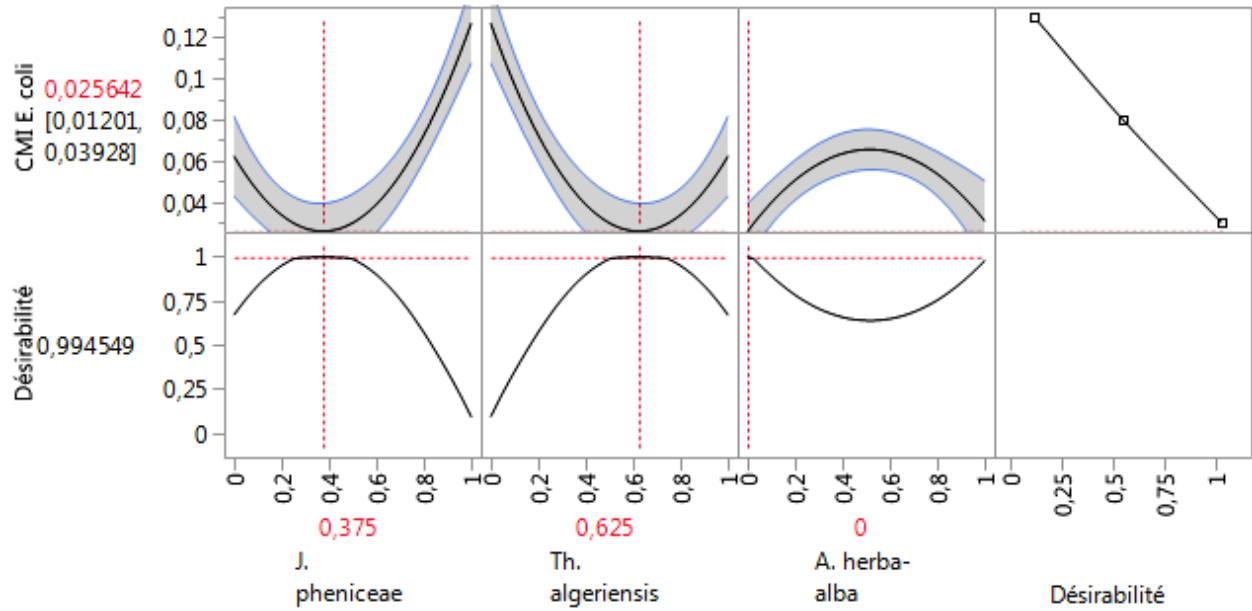


Figure 14: Profileur de prévision de la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli*

#### III.4.1.3- Modélisation de la concentration minimale bactéricide

Les résultats de la concentration minimale bactéricide (CMB) obtenus sont comparés dans le **tableau18** avec les résultats prévus.

### III- Résultats et discussion

**Tableau 18:** Comparaison entre les résultats prévus et mesurés du CMB de l'*E. coli*.

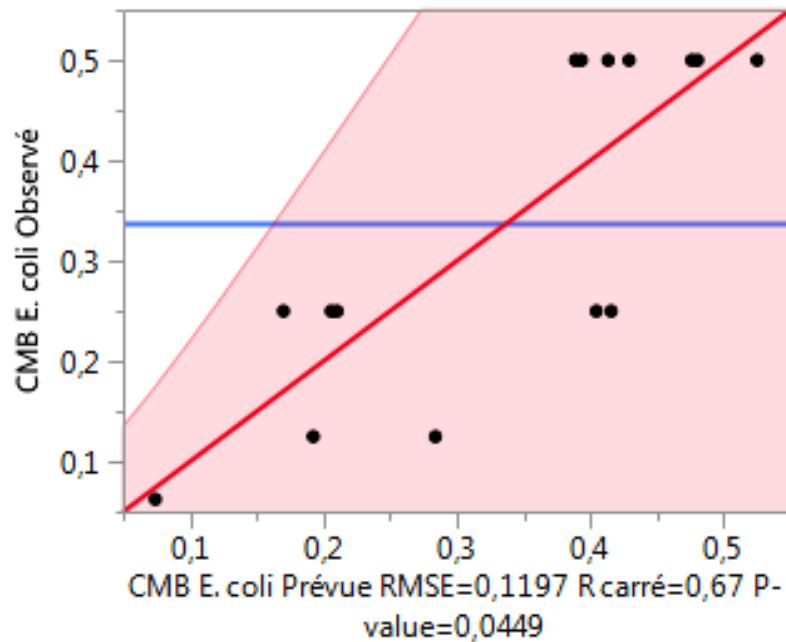
<i>J. phoenicea</i>	<i>Th. algeriensis</i>	<i>A. herba alba</i>	CMB mesurés	CMB prévus
0	0	100	0,5	0,525
0	25	75	0,125	0,192411
0	50	50	0,0625	0,074107
0	75	25	0,25	0,170089
0	100	0	0,5	0,480357
25	0	75	0,5	0,429018
25	25	50	0,25	0,210268
25	50	25	0,25	0,205804
25	75	0	0,25	0,415625
50	0	50	0,5	0,388839
50	25	25	0,125	0,283929
50	50	0	0,5	0,393304
75	0	25	0,25	0,404464
75	25	0	0,5	0,413393
100	0	0	0,5	0,475893
<b>CMB</b> : concentration minimale bactéricide				

D'après les résultats montrés dans le tableau, les valeurs mesurées sont proches des valeurs prévues. L'analyse du modèle par le test ANOVA a été très hautement significative ( $p = 0.0449$ ) (**Tableau 19**). En outre, le modèle de réponse a pu expliquer 67% des variations totales, et par conséquent, il reste 23% des variations qui ne sont pas expliquées par ce modèle (**figure 15**).

**Tableau 19:** L'analyse de la variance pour la CMB d'*E. coli*.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	5	0,26004464	0,052009	3,6280
Résidus	9	0,12901786	0,014335	<b>Prob. &gt; F</b>
Total corrigé	14	0,38906250		<b>0.0449*</b>

### III- Résultats et discussion



**Figure 15:** Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMBs d'*E. coli*.

Les coefficients issus de la modélisation, les coefficients de corrélation ( $R^2$ ), les rapports et les probabilités p-value de la réponse étudiée (la concentration minimale inhibitrice d'*E. coli*) sont regroupés dans les **tableaux 20** et **21** respectivement.

**Tableau 20:** Résumé de l'ajustement de model de l'effet anti *E. coli* par la méthode microdilution.

R carré	0.668388
R carré ajusté	0.484159
Racine de l'erreur quadratique moyenne	0.11973
Moyenne de la réponse	0.3375
Observations (ou sommes pondérées)	15

### III- Résultats et discussion

**Tableau 21:**Estimations des coefficients de la réponse CMB d'*E. coli*.

Terme	Estimation	Erreur standard	t ratio	Prob. >  t
<i>J. phoeniceae</i> (Mélange)	0,4758929	0,104182	4,57	0,0014*
<i>Th. Algeriensis</i> (Mélange)	0,4803571	0,104182	4,61	0,0013*
<i>A. herba-alba</i> (Mélange)	0,525	0,104182	5,04	0,0007*
<i>J. phoeniceae</i> * <i>Th. algeriensis</i>	-0,339286	0,443394	-0,77	0,4637
<i>J. phoeniceae</i> * <i>A. herba-alba</i>	-0,446429	0,443394	-1,01	0,3403
<i>Th. algeriensis</i> * <i>A. herba-alba</i>	-1,714286	0,443394	-3,87	0,0038*

Donc, le modèle mathématique retenu pour la concentration minimale bactéricide d'*E. coli* est :

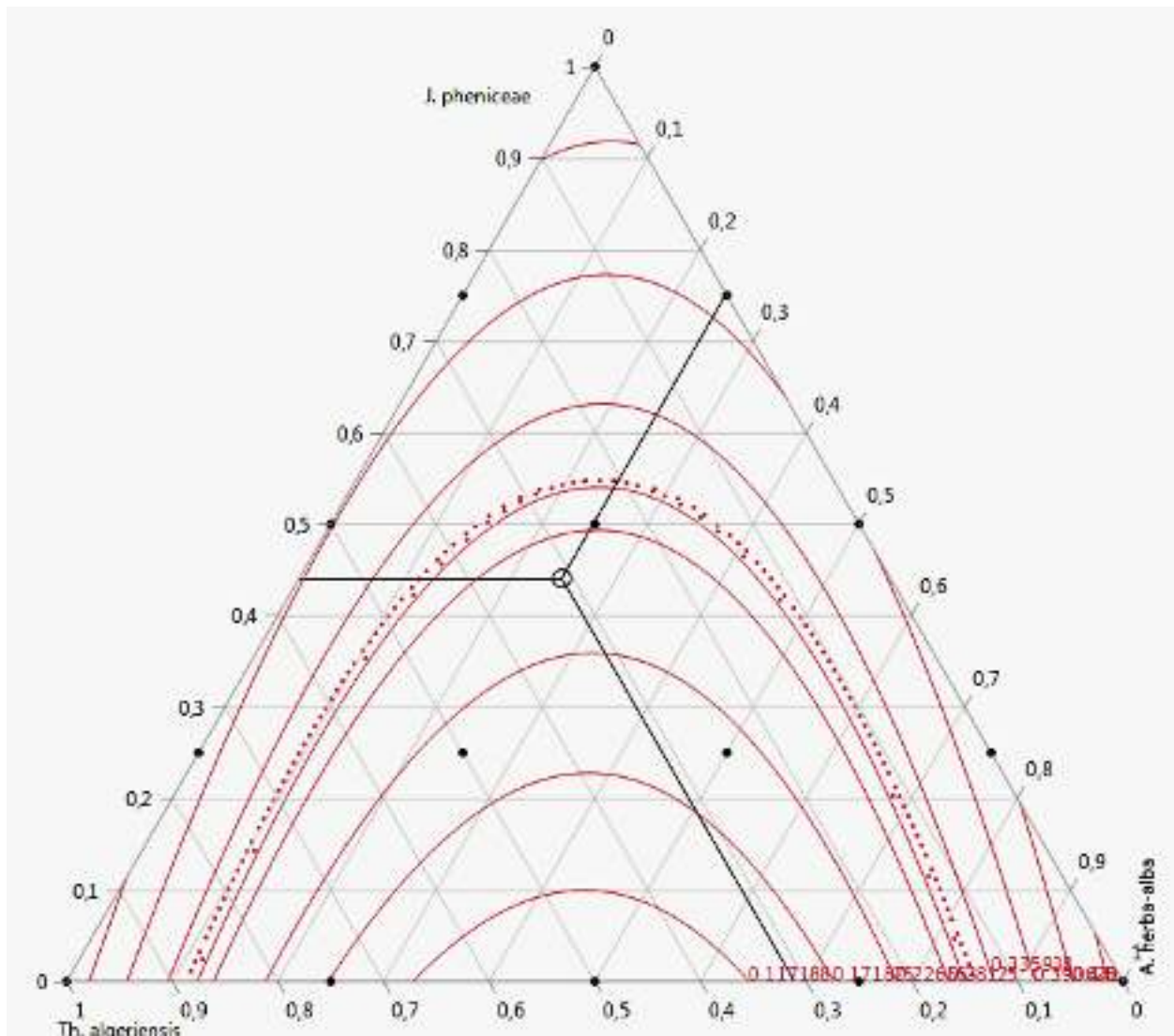
$$\text{Diamètre de la zone d'inhibition d'E. coli} = 0.4758 * J. phoenicea + 0.48035 * Th. algeriensis + 0.525 * A. herba alba - J. phoenicea * (Th. algeriensis * 0.3392) - J. phoenicea * (A. herba alba * 0.4464) - Th. algeriensis * (A. herba alba * 1.7142)$$

Les résultats trouvés montrent aussi que le type et la proportion des huiles essentielles utilisées et leurs mélanges influents sur la concentration minimale bactéricide d'*E. coli*.

A partir du modèle, nous constatons que la concentration minimale bactéricide d'*E. coli* est conditionné d'abord par les huiles essentielles de *Artemisia herba alba*, suivie par celles de *Thymus algériensis*, et *Juniperus phoenicea* ensuit (*Thymus algériensis* \* *Artemisia herba alba*).

Pour comprendre l'interaction des trois variables (huiles essentielles), le modèle de régression développé est représenté par une courbe iso-réponse (**figure 16**).

D'après le graphique de **la figure 16**, on constate que la présence des huiles essentielles de *A. herba alba* et *Th. algeriensis* dans le mélange avec une concentration importante fait diminuer la concentration minimale bactéricide d'*E. coli*.



**Figure 16:** Courbes iso-réponses de la concentration minimale bactéricide d'*E. coli*

D'après le profileur de prévision de la CMB d'*E. coli* (**figure 17**) qui a permis d'établir des courbes ayant pour but de faciliter l'interprétation et de permettre une meilleure analyse, on constate que la présence de l'huile essentielle de *Th. algeriensis* et de *A. herba alba* fait diminuer la CMB d'*E. coli*. Le mélange composé de 51.3% de *Th. algeriensis* et 48.69 % de *A. herba alba* peut donner une CMB d'*E. coli* égale à 0.073 µl/ml.

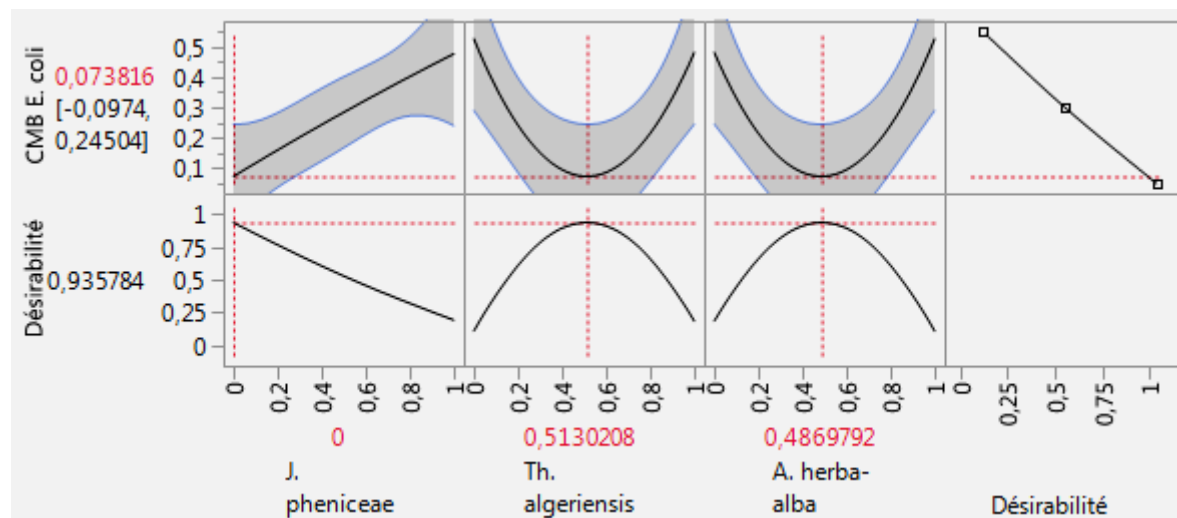


Figure 17: Profileur de prévision de la concentration minimale bactéricide d'*E. coli*

### III.4.2. Modélisation de l'activité anti *L. monocytogenes*

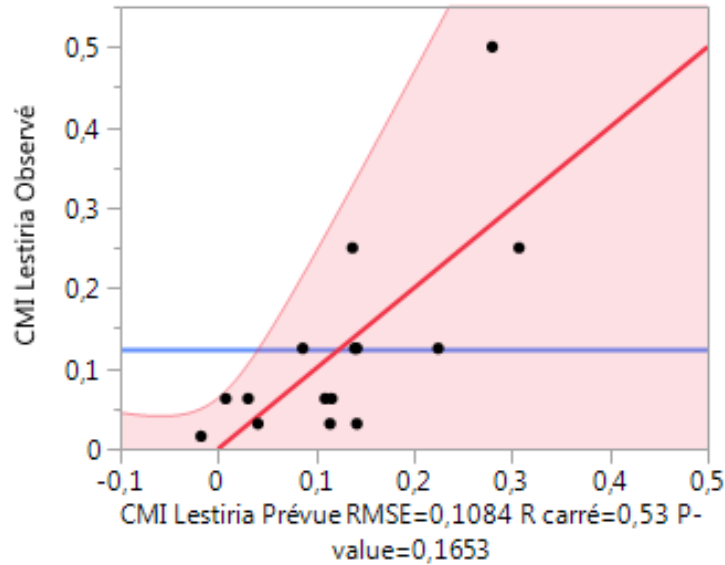
#### III.4.2.1- Diamètre de la zone d'inhibition

Les mélanges d'huiles essentielles testés peuvent être considérés comme défavorables en terme de l'efficacité, en effet tous les résultats sont inférieurs 11.33 mm.

#### III.4.2.2- Modélisation de la concentration minimale inhibitrice

Les résultats de la CMI expérimentaux et estimés ne sont pas proches. En effet, la valeur du coefficient de détermination ( $R^2$ ) était de l'ordre de 0.53 montrant une mauvaise concordance entre les données expérimentales et celles prévues pour toute la régression(**Figure 18**).

Autrement dit le modèle de réponse n'a pu expliquer que 53% des variations totales, et par conséquent, il reste 47% des variations qui ne sont pas expliquées par ce modèle.



**Figure 18:**Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMI de *L.monocytogenes*.

En outre, l’analyse du model par le test ANOVA est non significatif ( $p = 0.1653$ )(**Tableau 22**). Donc le model dérivé par le JMP13 pour déterminer la concentration minmale inhibitrice des mélange d’huiles essentielles (*J. phoenicea*, *Th. algeriensis* et *A. herba alba*) vis-à-vis *L.monocytogenes* n’est pas fiable.

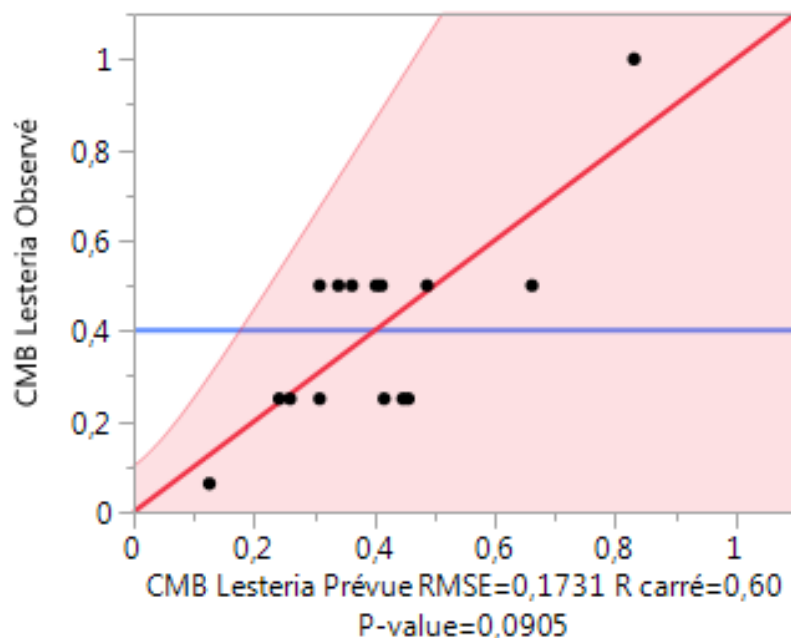
**Tableau 22:** L'analyse de la variance pour la CMI d’*L.monocytogenes*.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	5	0,12015332	0,024031	2,0468
Résidus	9	0,10566590	0,011741	<b>Prob. &gt; F</b>
Total corrigé	14	0,22581922		0,1653

#### III.4.2.3- Modélisation de la concentration minimale bactéricide

Les résultats de la CMbs expérimentaux et estimés ne sont corrélés significativement, la valeur du coefficient de détermination ( $R^2$ ) était de l’ordre de 0.60 montrant pas une bonne concordance entre les données expérimentales et celles prévues pour toute la régression(**Figure19**).

### III- Résultats et discussion



**Figure 19:**Graphique des valeurs observées en fonction des valeurs prévues des CMBs d'*L.monocytogenes*.

l'analyse du model par le test ANOVA est non significatif ( $p = 0.0.905$ )(**Tableau 23**). Donc le model dérivé par le JMP13 pour déterminer la concentration minmale bactéricide des mélange d'huiles essentielles (*J. phoenicea*, *Th. algeriensis* et *A. herba alba*) vis-à-vis *L.monocytogenes* n'est pas fiable.

**Tableau 23:** L'analyse de la variance pour la CMBs de *L.monocytogenes*.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré moyen	Rapport F
Modèle	5	0,40894717	0,081789	2,7294
Résidus	9	0,26969866	0,029967	<b>Prob. &gt; F</b>
Total corrigé	14	0,67864583		0,0905

# *Conclusion*

## ***Conclusion***

---

Sur la base de la présente étude, il a été constaté que les huiles essentielles combinées avaient un effet antibactérien supérieur à celui de l'HE seule. Par conséquent l'association de plusieurs HE serait donc un moyen efficace pour réduire le risque de résistances, augmenter l'efficacité de la bioactivité antimicrobienne et surtout contribuer à l'élargissement du spectre d'activités microbiocides et bactéricides envers plusieurs souches microbiennes.

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

Les plans d'expériences consistent à sélectionner et ordonner les essais afin d'identifier, à moindres coûts, les effets des paramètres sur la réponse étudiée. Il s'agit de méthodes statistiques faisant appel à des notions mathématiques simples qu'on peut les utiliser en biologie pour l'optimisation et la modélisation des phénomènes biologiques.

# Résumé

## **Résumé**

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet antibactérien des huiles essentielles de trois espèces médicinales (*Juniperus phoenicea*, *Thymus algeriensis* et *Artemisia herba alba*) seules et en combinaison, afin de trouver la meilleure combinaison (mélange) d'huiles essentielles.

Les huiles essentielles ont été extraites de la partie aérienne des espèces choisies par distillation à la vapeur d'eau. L'activité antibactérienne a été évaluée en utilisant deux méthodes différentes : la méthode de diffusion sur disques et la méthode de microdilution vis-à-vis de deux souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif (*E. coli* et *L. monocytogene*). La modélisation et l'optimisation des effets antibactériens ont été effectuées en utilisant le plan de mélange en réseaux.

Les résultats montrent que l'effet antibactérien des huiles essentielles testées séparément est moins important par rapport à leur effet en combinaison. Trois modèles mathématiques ont été élaborés pour déterminer les effets anti *E. coli*. Les mélanges d'huiles essentielles qui ont donné la meilleure zone d'inhibition et la faible CMI sont ceux constitués de l'huile de *J. phoenicea* et de *T. algeriensis*. Tandis que la faible CMB a été obtenue dans les mélanges constitués de l'huile de *T. algeriensis* et *A. herba alba*.

La thérapie combinatoire en utilisant des mélanges des huiles essentielles peut être un outil efficace pour combattre les souches bactériennes résistantes.

**Mots clés :** association, huiles essentielles, antibactérien, plan de mélange, synergie.

## **Abstract**

The purpose of this study was to evaluate the antibacterial effect of the essential oils of three medicinal species (*Juniperus phoenicea*, *Thymus algeriensis* and *Artemisia herba alba*) alone and in combination, in order to find the best combination (blend) of essential oils.

The essential oils were extracted from the aerial part of the species chosen by steam distillation. The antibacterial activity was evaluated using two different methods: the disk diffusion method and the microdilution method with respect to two Gram-positive and Gram-negative bacterial strains (*E. coli* and *L. monocytogene*). Modeling and optimization of antibacterial effects were performed using the network mixing scheme

The results show that the antibacterial effect of the essential oils tested separately is less important compared to their effect in combination. Three mathematical models have been developed to determine anti-*E. coli* effects. The mixtures of essential oils which gave the best zone of inhibition and the low MIC are those consisting of the oil of *J. phoenicea* and *T. algeriensis*. While low CMB was obtained in the mixtures consisting of the oil of *T. algeriensis* and *A. herba alba*.

Combinatorial therapy using blends of essential oils can be an effective tool for combating resistant bacterial strains.

**Key words:** association, essential oils, antibacterial, mixing plan, synergy

## *Abstract*

The purpose of this study was to evaluate the antibacterial effect of the essential oils of three medicinal species (*Juniperus phoenicea*, *Thymus algeriensis* and *Artemisia herba alba*) alone and in combination, in order to find the best combination (blend) of essential oils.

The essential oils were extracted from the aerial part of the chosen species by steam distillation. The antibacterial activity was evaluated using two different methods: the disk diffusion method and the microdilution method with respect to two Gram-positive and Gram-negative bacterial strains (*E. coli* and *L. monocytogene*). Modeling and optimization of antibacterial effects were performed using the network mixing scheme

The results show that the antibacterial effect of the essential oils tested separately is less important compared to their effect in combination. Three mathematical models have been developed to determine anti-*E. coli* effects. The mixture of essential oils which gave the best zone of inhibition and the low MIC are those consisting of the oil of *J. phoenicea* and *T. algeriensis*. While low MBC was obtained in the mixture consisting of the oil of *T. algeriensis* and *A. herba alba*.

Combinatorial therapy using blends of essential oils can be an effective tool for combating resistant bacterial strains.

**Key words:** association, essential oils, antibacterial, mixing plan, synergy

## ملخص

كان الغرض من هذه الدراسة هو تقييم التأثير المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية لثلاثة أنواع طيبة (*Juniperus* و *Thymus algeriensis* و *Artemisia herba alba*) بمفردهما وبالاشتراك معًا ، من أجل العثور على أفضل مزيج من الزيوت الأساسية.

تم استخراج الزيوت الأساسية من الجزء العلوي من الأنواع التي اخترناها التقطير بالبخار. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا باستخدام طريقتين مختلفتين: طريقة انتشار القرص وطريقة التخفيف الجزئي فيما يتعلق بالسلالتين البكتيرية إيجابية الجرام وسالبة الجرام (*E. coli*) و (*L. monocytogene*). تم إجراء النمذجة وتحسين التأثيرات المضادة للبكتيريا باستخدام نظام خط الشبكة

أظهرت النتائج أن التأثير المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية التي تم اختبارها بشكل منفصل أقل أهمية مقارنة بتأثيرها مجتمعة. تم تطوير ثلاثة نماذج رياضية لتحديد تأثيرات مكافحة العصيات القولونية. خليط الزيوت الأساسية التي أعطت أفضل منطقة تثبيط و MIC منخفضة هي تلك التي تتكون من زيت *J. phoenicea* و *T. algeriensis*. بينما تم الحصول على MBC منخفضة في الخليط الذي يتكون من زيت *T. algeriensis* و *A. herba alba*.

يمكن أن يكون العلاج التوافقي باستخدام مزيج من الزيوت الأساسية أداة فعالة لمكافحة السلالات البكتيرية المقاومة.

**الكلمات الدلالية:** الارتباط ، الزيوت الأساسية ، مضاد للجراثيم ، طريقة الخلط

# *Annexes*

## Annexes

### Annexe I : Composition des milieux de culture

**Tableau I:**Gélose nutritive(**Guiraud, 1998**)

Composant	Quantité
Extrait de viande	1g
Peptone	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml
Agar-agar	15g
PH	7
Autoclavage	120°C/ 20 minutes

**Tableau II :** Milieu Mueller-Hinton gélosé (**Guiraud, 1998**)

Composant	Quantité
Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Eau distillé	1000ml
Agar-Agar	17g
PH	7
Autoclavage	120°C/ 20 minutes

**Tableau III :** Milieu Mueller-Hinton liquide (**Guiraud, 1998**)

Composant	Quantité
Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Eau distillé	1000ml
PH	7
Autoclavage	120°C/ 20 minutes

## Annexes

### Annexe 02 : Solvants

Tableau IV : Eaux physiologique (Guiraud, 1998).

Composant	Quantité
Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	1000ml
pH	7.2
Autoclavage	120°C/ 20 minutes

Tableau V : Standards de turbidité (McFarland 0,5)

Composant	Quantité
d'hydrate de chlorure de baryum (BaCL <sub>2</sub> ) à 1 %	0,5 ml
acide sulfurique à 1 %	99,5 ml
Mettre dans des tubes de test identiques à ceux de la suspension bactérienne.	
Fermer hermétiquement avec de la cire pour éviter leur évaporation.	
Réfrigérer ou conserver à température ambiante (22-25°C).	

### Annexe 03 :

Appareillage Balance, Entonnoir en verre, papier filtre, Agitateur, Barrou magnétique, Papier film, , Flacon stérile, pipettes graduées, bain marée, les tubes a essai, boîte de pétri, les étuve, vortex, éprouvette, bécher, micro pipette, Bec Bunsen, l'anse de platine, Spatule, écouvillon. Micro pipette,

*Annexes*

Annexe 04 :



*Listeria monocytogènes*

*E. coli*

Figure I : Repiquage des souches testées

Annexes

Annexe 05 :

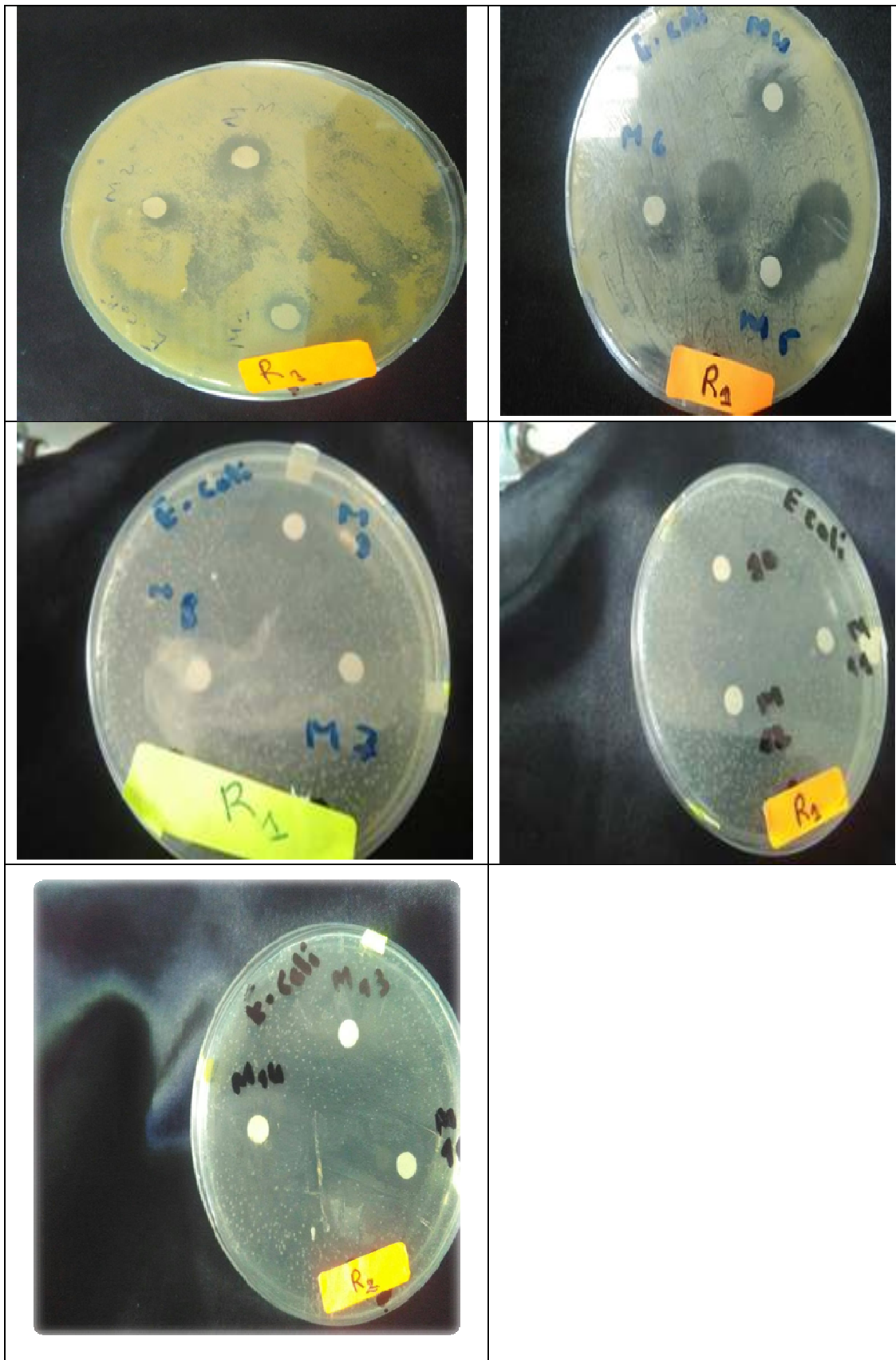


Figure II : Les zones d'inhibition obtenues par l'activité antibactérienne des antibiotiques sur les souches testées, (*E. coli*)

Annexes

Annexe06 :

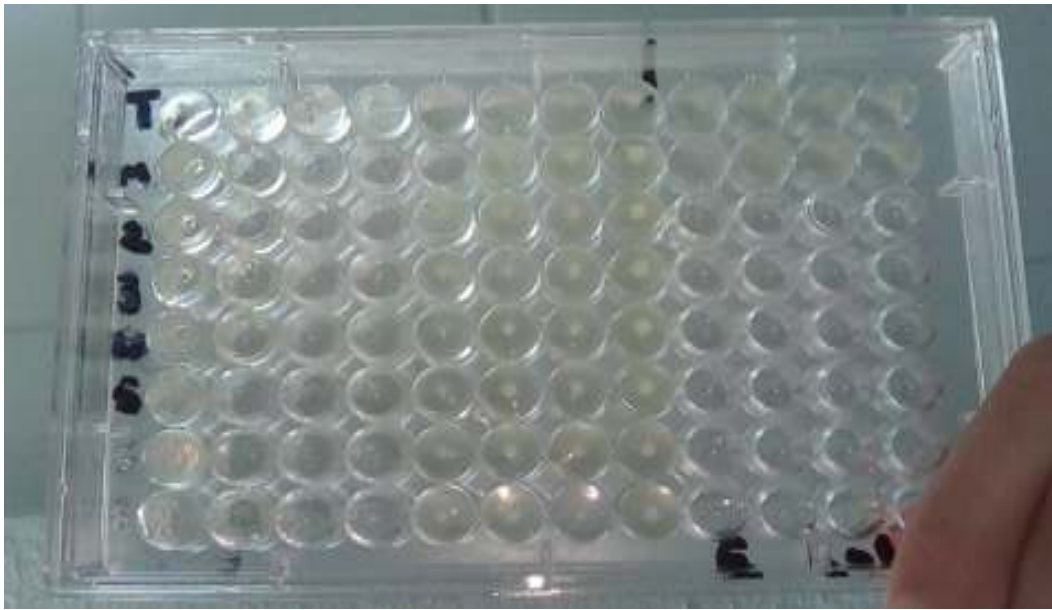


Figure III : Détermination de la CMI demélange des huiles essentielles chez les souches testées (*E. coli*)

Annexes

Annexe 07 :



FigureIV : Détermination de la CMB de mélange des huiles essentielles chez les souches testées (*E. coli*)

Annexes

Annexe 08 :

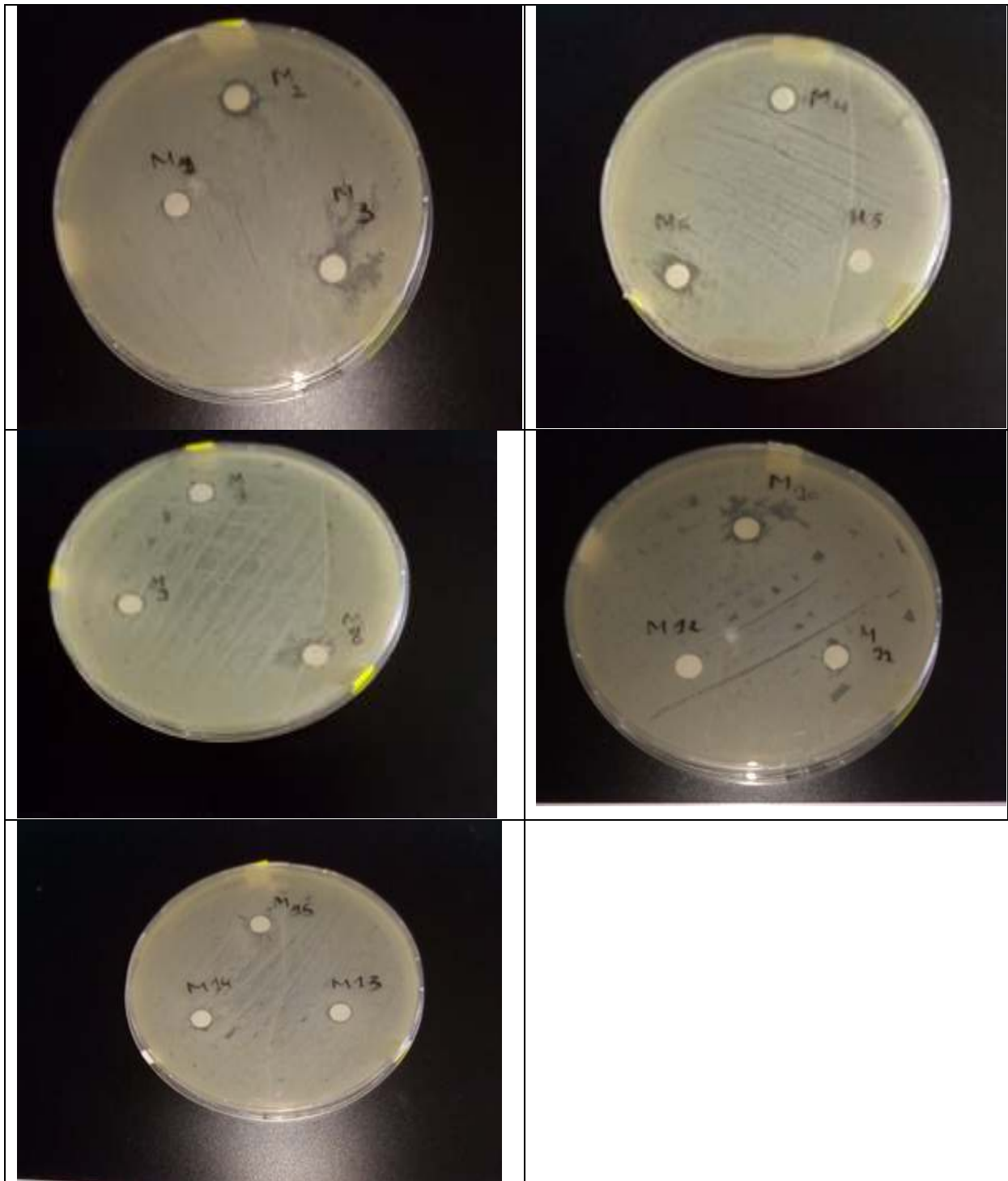


Figure V : Les zones d'inhibition obtenues par l'activité antibactérienne des mélange des huiles sur les souches testées (*Listeria monocytogenes*)

*Annexes*

Annexe 09 :



Figure VI : Détermination de la CMI de mélange des huiles essentielles chez les souches testées (*listeria monocytogenes*)

Annexes

Annexe 10 :



Figure VII : Détermination de la CMB de mélange des huiles essentielles chez les souches testées (*listeria monocytogenes*)

*Références  
bibliographiques*

## **Bibliographie**

---

### **Bibliographie**

- ✚ **Aboughe Angone S., Aworet Samseny R., Eyele Mve Mba C., (2015).** Quelques propriétés des huiles essentielles des plantes médicinales du Gabon. *Phytothérapie*, *s10298*, 014-0905.
- ✚ **Adams R. P. , (2011).** Juniperus of the World: The Genus Juniperus. Trafford Publishing.
- ✚ **Adams R.P., Barrero A.F., Lara A., (1996).** Comparisons of the leaf essential oils of *Juniperus phoenicea*, *J. phoenicea* subsp. *eu-mediterranea* Lebr. & Thiv. and *J. phoenicea* var. *turbinata* (Guss) Parl. *J. Essent. OilRes.*, 8, 367-371.
- ✚ **Ait-Ouazzo A., Lorán S., Laglaoui A ., (2011).** Chemical composition and antimicrobial and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J Sci Food Agric*, *91*, 2643–2651.
- ✚ **Ait-Ouazzou A., Lorán, S., Arakrak A., Laglaoui A., Rota C., Herrera A., Pagán R., Conchello P., (2012).** Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea*, and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. *Food Research International*, *45*, 313–319.
- ✚ **Akrout A., (2004).** Essential oil study of some pastoral plants from Matmata (south Tunisia). *Cah. Options. Med.* 62: 289-292.
- ✚ **Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M ., Chaouch A ., (2010) .** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss.& Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc . *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 14(1), 141-148
- ✚ **Amarti F., Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Aarab L., El Ajjouri M ., Chaouch A ., (2010)** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc . *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 14(1), 141-148
- ✚ **Angioni A., Barra A., Russo M T., Coroneo V., Dessi S., Cabras P., (2003).** Chimiical composition of the Essentielle Oils of *Juniperus* from Ripe and Unripe Berries and Leaves and their antimicrobial Activity . *J. Agric. Food Chem.* 51, 10,3073-3078
- ✚ **Aouni M ., Pelen F . , Soulimani R ., (2013).** Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles. *Phytothérapie*, *11*, 225-236.

## **Bibliographie**

---

- ✚ **Atailia I ., Djahoudi A., (2015)** .composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle géranium rosat (pelargonium graveolens l'Hér) cultivé en Algérie .*phytothérapie*,13,156-162
- ✚ **Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.,(2008)**. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* , 46, 446–475.
- ✚ **Bari M.A., Islam W., Khan A. R .,Mandal A.,(2010)**. Antibacterial and antifungal activity of Solanum torvum (Solanaceae), *Int. J. Agric. Biol.*, p. 386-390
- ✚ **Bassolé, I. H. N., Juliani, H. R ., (2012)**. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.
- ✚ **Bekhechi C ., Atik-Bekkara F ., Abdelouahid D. E., (2008)**.Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'Origanum glandulosum d'Algérie. *Phytothérapie*, 6, 153–159.
- ✚ **Bellili S., Dhifi W., Al-Garni ABK., Flamini G., Mnif W., (2016)**. Essential oil composition and variability of Artemisia herba-alba Asso. growing in Tunisia, comparison and chemometric investigation of different plant organs. *J App Pharm Sci.*; 6 (07): 038-042.
- ✚ **Bezza L., Mannarino A., Fattarsi K., Mikail C., Abou L., Hadji-Minaglou F. & Kaloustian J. (2010)**. Chemical composition of the essential oil of *Artemisia herba-alba* issued from the district of Biskra (Algeria). *Phytothérapie*, 8, 5, 277-281
- ✚ **Boudjedjou L., Ramdani M ., Zeraib A ., Benmeddour T., Fercha A., (2018)**. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Berries Essential Oil of Algerian Juniperus thurifera (Var. aurasiaca). *Pharmaceutical Sciences*, 24(3), 240-245.
- ✚ **Boudjedjou L., Ramdani M ., Zeraib A., Benmeddour T., Fercha A. ,(2019)**. Chemical composition and biological activities of Algerian Santolina africana essential oil. *Scientific African*, 4, doi : e00090.
- ✚ **Bouhdid S., Abrini J., Baudoux D., Manresa A., zhiri A.,(2012)**.Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. *Synthèse* , 31 (3), 141-8.
- ✚ **Bouyahya A ., Bakri Y., Et-Touys A ., Talbaoui A., Khouchlaa A ., Charfi S ., Abrini J ., Dakka N.,(2017)**. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie* , 10298, 017-1118-z
- ✚ **Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni M. M., (2008)**. Composition chimique et activités antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de Juniperus phœnicea. *Journal de la Société Chimique de Tunisie.*, 10, 119-125.

## **Bibliographie**

---

- ✚ **Burt S., (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* , 94, 223– 253
- ✚ **Cornell J.A., (1990).** ed. *Experiments with mixtures. Designs, models, and the analysis of mixture data.* J. Wiley & Sons, New York.
- ✚ **Derwich E., Benziane Z., Boukir A.,( 2010).**Chemical composition of leaf essential oil of *Juniperus phoenicea* and evaluation of its antibacterial activity. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12(2), 199-204p
- ✚ **Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C., (2006) .** Studies on the Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Thymus Algeriensis* Boiss. et Reut. *Int. J. Aromather.* 16: 95–100.
- ✚ **Dob T., Ben Abdelkader T., (2006).** Chemical composition of the essential oil of *Artemisiaherba-alba* asso grown in Algeria. *J. Essen. Oil Res.*,18, 685-690.
- ✚ **Dob T., Darhmane D., Benabdelkader T., Chelghoum T.C.,(2006).** Studies on the essential oils and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. *Int. J.Aromatherapy*, 16(2), 95-100.
- ✚ **Dorman H. J. D., Deans S. G., (2000)** Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol*; 88(2): 308-16.
- ✚ **El-Sawi S.A., Motawae H.M., Ali A.M., (2007).** Chemicalcomposition, cytotoxic activity and antimicrobial activity of essential oils of leaves and berries of *Juniperus phoenicea* L. grown in Egypt. *Afr. J. Tradit.Complementary Altern. Med.*, 4(4), 417-426.
- ✚ **Fadli M., Bolla J. M., Mezrioui, N. E., Pagès, J. M., Hassani L., (2014).** First evidence of antibacterial and synergistic effects of *Thymus riararum* essential oil with conventional antibiotics. *Industrial Crops and Products*, 61, 370-376.
- ✚ **Ghanmi M. , Satrani B ., Aafi A., Isamili M.R., Houti H., EL Monfalouti H. , Benchakroun K.H., Aberchane M. , Harki L., Boukir A.,Chaouch A.,Charrouf Z., (2010).**Effet de la date de récolte sur le rendement, la composition chimique et la bioactivité des huiles essentielles de l’armoise blanche (*Artemisia herba-alba*) de la région de Guerçif (Maroc oriental) ). *Phytothérapie*, 295–301, 295–301
- ✚ **Goudjil M.B.,Ladjel S.,Bencheikh S.E.,Zighmi S.,Hamada D.,(2015).** Chemical Compounds Profile, Antibacterial andAntioxidant Activities of the Essential Oil Extracted from the *Artemisiaherba-alba* of Southern Algeria. *International Journal of Biological Chemistry*, 9 (2):, 70-78.

## **Bibliographie**

---

- # **Goupy J., Creighton L.,(2007).** Introduction to Design of Experiments with JMP Examples, thirded., SAS Publishing,
- # **Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V., (1999).**Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *Journal of Applied Microbiology.* 86: 985–990
- # **Haouari M., Ferchichi A. ,(2009).** Essential Oil Composition of *Artemisia herba-alba* from Southern Tunisia. *Molecules*, 14, 4, 1585-1594.
- # **Hudaiba M., Aburjai T. ,(2006).** Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* grown in Jordan. *J. Essential Oil Res.*, 18, 3, 301-304.
- # **Jamali C. A., Kasrati A ., Fadli M ., Hassani L., Leach D., Abbad A., (2018).** Synergistic Effects of Three Moroccan Thyme Essential Oils with Antibiotic Cefixime. *Phytothérapie*, 16(S1), S149-S154.
- # **Kalemba D., Kunicka A., (2003) .**Antibacterial and antifungal properties of essential oils.*Curr. Med. Chem*, 10, 813-829p.
- # **Khay El Ouardy ., Abdelhakim Bouyahya . , Kaoutar El Issaoui . , Sanae Zinebi . , Jamal Abrini ., (2016).** Study of Synergy between *Mentha pulegium* Essential Oil, Honey and Bacteriocin-like Inhibitory Substance E204 against *Listeria monocytogenes* CECT 4032 and *Escherichia coli* K12. 3, 29-35.
- # **Kheyar N ., Meridja D ., Belhamel K ., (2014).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Inula*. *Algerian Journal of Natural Products* , 2:1, 18-26.
- # **khoury M., El Beyrouthy M., Ouaini N., Eparvier V., Stien D., (2019).** *Hirtellina lobelii* DC. essential oil, its constituents, its combination with antimicrobial drugs and its mode of action. *Fitoterapia* , 133, 130-136.
- # **.Khokhar, M.I.A., Roziere E., Turcry P ., Grondin F ., Loukili A., (2010).** Mix design of concrete with high content of mineral additions: Optimisation to improve early age strength, *Cem. Concr. Compos.* 32 377–385.
- # **Lahsissene H ., Kahouadji A ., Tijane M ., Hseini S., (2009).** Catalogue des plantes médicinales utilisées. *Jeune Revue de Botanique* , 0457-4184.
- # **Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., Burt, S. A., (2014).** Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Critical reviews in microbiology*, 40(1), 76-94.
- # **Mansouri N., Satrani B., Ghanmi M., El Ghadraoui L., Boukir A., Aafi A., (2011).** effet de la provenance sur le rendement ,la composition chimique et l'activité

## **Bibliographie**

---

antimicrobienne des huiles essentielles des rameaux de *Juniperus phoenicea* L. du Maroc. *Acta bot. Gallica*, 158(2), 215-224.

- ✚ **Manzo L.M ., Moussa I . , Ikhiri K. , (2017)** . Les plantes médicinales utilisées dans le traitement des diarrhées au Niger : étude ethnobotanique. *Algerian Journal of Natural Products* , 4:3, 475-482.
- ✚ **Marti-Mestres G., Laget J.P. , Maillols H ., (1998)** . Solubilisation de filtres-UV dans des mélanges ternaires de phases apolaires, optimisation par l'utilisation de réseaux centrés. *International Journal of Cosmetic Science* 20 : 19–30.
- ✚ **Marti-Mestres G., Laget J.P., Maillols H .,(1998)** . Solubilisation de filtres-UV dans des mélanges ternaires de phases apolaires, optimisation par l'utilisation de réseaux centrés. *International Journal of Cosmetic Science* 20 : 19–30
- ✚ **Mazarei, Zeinab , Rafati, Hasan,( 2019)**. Nanoemulsification of *Satureja khuzestanica* essential oil and pure carvacrol; comparison of physicochemical properties and antimicrobial activity against food pathogens. *LWT - Food Science and Technology*, 100, 328-334.
- ✚ **Merad M ., Merad R ., (2001)**. Toxicité des antibiotiques . Médecine du Maghreb , n°91 sont sur [www.sante.tropicale.com](http://www.sante.tropicale.com)
- ✚ **Mikulášová M ., Chovanová R ., Vavřková S., (2016)**. Synergism between antibiotics and plant extracts or essential oils with efflux pump inhibitory activity in coping with multidrug-resistant staphylococci. *Phytochemistry reviews*, 15(4), 651-662.
- ✚ **Montgomery D. C., (2001)**. Design and analysis of experiments. ed. John Wiley & Sons, 52, 218-286.
- ✚ **Moteriya P., Padalia H ., Chanda S., (2017)**. Characterization, synergistic antibacterial and free radical scavenging efficacy of silver nanoparticles synthesized using *Cassia roxburghii* leaf extract. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 505-513.
- ✚ **Moussaoui F., Alaoui T., (2016)**. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* , 6(1):, 32–37.
- ✚ **Pavithra P. S., Sreevidya N., Verma R. S., (2009)** ; Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Pamburus missionis*. *J. Ethnopharmacol.* 124, 151–153.

## **Bibliographie**

---

- ✚ **Pei R., Zhou F., Ji B., 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
- ✚ **Popović-Djordjević J., Cengiz M., Ozerc M.S., Sarikurkud C., (2019).** *Calamintha incana*: Essential oil composition and biological activity. *Industrial Crops & Products*, 128, 162–166.
- ✚ **Quezel P., Santa S., (1962).** Nouvelle Flore de L'Algérie et Des Régions Désertiques Méridionale. Volum I, Centre national de la recherche scientifique. Paris – France.
- ✚ **Quezel, P., Santa S., (1963).** Nouvelle Flore de L'Algérie et Des Régions Désertiques Méridionale. Volum II, Centre national de la recherche scientifique. Paris – France.
- ✚ **Ramdani M., Lograda T., Silini H., Zeraib A., Chalard P., Figueredo G., Bouchaala M., Zerrar S., (2013).** Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(11), 022-028.
- ✚ **Ramdani M., Lograda T., Silini H., Zeraib A., Chalard P., Figueredo G., Zerrar S., (2013).** Antibacterial activity of essential oils of *Juniperus phoenicea* from Eastern Algeria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(11), 22.
- ✚ **Salido S., Valenzuela L.R., Altarejos J., Nogueras M., Sanchez A., Cano E., (2004).** Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochem. Systematics and Ecol.*, 32, 265-277.
- ✚ **Santiesteban-Lopez A., Palou E., López-Malo A., (2017).** Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a(w) and pH. *J. Appl. Microbiol*, 102, 486–497.
- ✚ *Société Royale des Sciences de Liège* 83, p. 118 – 132
- ✚ **Souza E. L., Guerr N. B., Stamford T. L. M., Lima E. O., (2006).** Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. *Rev. Bras. Farm.*, p. 22-25
- ✚ **strains Wongwarut Boonyanugomol., Kairin Kraisriwattana, Kamolchanok Rukseree, Kraisorn Boonsam, Panchaporn Narachai, (2017).** In vitro synergistic antibacterial activity of the essential oil from *Zingiber cassumunar* Roxb against

## **Bibliographie**

---

- extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Infection and Public Health*, 10, 586–592.
- ✚ **Touil S., Benrebiha F. Z., (2017).** Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* Asso et *Artemisia campestris* L. de la région de Djelfa. *Agrobiologia*, 7(2) : 40-45.
- ✚ **Traoré Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I., Coulibaly A., (2012).** Recherche des activités antifongiques et antibactériennes des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *Journal of Applied biosciences*. 58 .p 4234-4242.
- ✚ **Traoré Y., Ouattara K., Yéo D., Doumbia I., Coulibaly A., (2012).** Recherche des activités antifongique et antibactérienne des feuilles d'*Annona senegalensis* Pers. (Annonaceae). *J. Appl. Biosci.* 58, 4234–4242
- ✚ **Ultee A., Slump R.A., Steging G., Smid E.j., (2000).** Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot*, 63, 620–624.
- ✚ **Zaim, A., EL GHADRAOUI L., FARAH A., (2012).** Effets des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* sur la survie des criquets adultes d'*Euchorthippus albolineatus* (Lucas, 1849). *Bulletin de l'institut scientifique, Rabat, section Sciences de la Vie*, 34(2), 127-133.
- ✚ **Zayyad N., Farah A., Bahhou J., (2014)** Analyse chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles des trois espèces de *Thymus* : *Thymus zygis*, *T. algeriensis* et *T. bleicherianus*. *Bulletin de la*
- ✚ **Zore G., Thakre A., Jadhav S., Karuppayil S., (2011).** Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 18, 1181–1190.
- ✚ **Zouari S., Fakhfakh N., Zouari N., Bougatef A., (2010).** Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba alba* Asso, *Journal of Medicinal Plants Research* 4(10), pp. 871-880



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 de mélange  
d'huiles essentielles de quelques plantes  
médicinales**

Présenté par :

M<sup>elle</sup> **REZAIMIA Wafa**

M<sup>elle</sup> **AGGOUN Nour Elhouda**

Jury de soutenance :

Président :	<b>M. RAHAL K</b>	(MAA)	Univ. Abbès Laghrou -Khenchela
Examineur :	<b>M. BOUSSAA AH.</b>	(MAA)	Univ. Abbès Laghrou -Khenchela
Encadreur :	<b>Dr. ZERAIB A.</b>	(MCB)	Univ. Abbès Laghrou- Khenchela

Année universitaire 2018 - 2019