



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences

Département de chimie



MEMOIRE DE MASTER

Spécialité : Chimie des produits naturels

Thème :

EVALUATION DU POTENTIEL ANTIBACTERIEN DE
L'HUILE ESSENTIELLE DE *L'EUCALYPTUS GLOBULUS*
SEULE ET EN COMBINAISON VIS-A-VIS DES SOUCHES
BACTERIENNES MULTI-RESISTANTES

Présenter par

Mlle : AISSOU Anissa

Mlle : ZEROUK Chahinda

Devant le jury :

Mme. ZIANE R	MAA	U.Blida 1	Présidente
Mme. BOUKAABACHE R	MCB	U.Blida 1	Examinatrice
Mme. TOUAFEK O	MCA	U.Blida 1	Promotrice

Blida, juillet 2023

Remerciement

*Avant toute chose on remercie **ALLAH***

Tout puissant pour m'avoir donné la force et la patience de continuité,

Et nous a donné la volonté pour réaliser ce travail de recherche.

*On voudrait dans un premier temps adresser nos profonds
remerciements à, notre encadreur de mémoire*

*Mme **TOUAFEK.O***

*Pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui
ont contribué à alimenter nos réflexions.*

Merci de nous a laissé libre dans nos choix.

Merci pour votre soutien, et la confiance que nous a accordée.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury

*Mme **ZIANE.R** et Mme **BOUKAABACHE.R***

Pour l'intérêt

*Qu'elles ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre
travail et*

De l'enrichir par leurs propositions.

*Nous remercions Mr **TEFFAHI DJAMEL** Et Mme **NEKKAB SELMA***

*De nous avoir donné l'occasion de réaliser la partie d'Activité
antibactérienne, au niveau de leur laboratoire d'hygiène de Blida.*

*Enfin, nous tenons à remercier toutes les personnes qui ont participé
de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.*

Dédicace

Je dédie ce travail : A mon cher père, qui m'a soutenu toute longue ma carrière universitaire avec un encouragement et motivation, je te remercie père pour tous les sacrifices tu n'as pas privé, peu n'importe le nombre de mot que j'écris, quoi que je dise mes paroles ne pourrait être à la hauteur de ce que tu voulais faire à moi : le meilleur dans les études et la vie.

A ma mère, qu'elle trouve dans ce humble travaille l'expression de toute ma reconnaissance et toute ma gratitude c'est elle qui toujours m'accompagné et me ne jamais oublier dans sa prière.

A mes chères frères, Mohammed Yacine et Abderrahmane

A ma chère sœur Chahinda pour son soutien moral, sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.

A tous ma famille, et mes amis pour leurs amours et leurs encouragements

Et à tous ceux qui sont dans mon cœur.

ANISSA

Dédicace

Je dédie ce travail : A mon cher père, qui m'a soutenu toute longue ma carrière universitaire avec un encouragement et motivation, je te remercie père pour tous les sacrifices tu n'as pas privé, peu n'importe le nombre de mot que j'écris, quoi que je dise mes paroles ne pourrait être à la hauteur de ce que tu voulais faire à moi : le meilleur dans les études et la vie.

A ma mère, qu'elle trouve dans ce humble travail l'expression de toute ma reconnaissance et toute ma gratitude c'est elle qui toujours m'accompagné et me ne jamais oublier dans sa prière.

A ma très chère sœur Marame, je te souhaite tout le bonheur du monde.

A mes amies à qui j'ai une confiance absolue :

Chaïma

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours
Universitaire.*

*A mon binôme Anissa pour tous les moments et les souvenirs
inoubliables pendant les années d'études ensemble surtout les deux
dernières années, je vous aime beaucoup.*

Et à tous ceux qui sont dans mon cœur.

CHAHINDA

Résumé

Eucalyptus globulus (Myrtaceae) et le *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) sont des plantes aromatiques largement utilisées depuis l'Antiquité en médecine traditionnelle, en raison de leurs propriétés biologiques.

L'objectif de notre travail consiste à évaluer de manière synergique le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* en combinaison avec l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* vis-à-vis des souches bactériennes multi-résistantes, à savoir ; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Le matériel végétal récolté dans la région de Tipaza, a subi une hydrodistillation en utilisant un appareil de type Clavenger. Les rendements d'extraction obtenus ont montré des teneurs en huiles essentielles de 0,23 % pour les feuilles d'*Eucalyptus globulus* et de 1,22 % pour la partie aérienne de *Thymus vulgaris*.

L'activité antibactérienne et l'effet de synergisme ont été évalués in vitro par trois méthodes (la diffusion sur disque ou bandelettes et la macrodilution).

D'une façon générale, les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes étudiées en combinaison. Cette synergie offre de nouvelles perspectives pour développer des approches thérapeutiques combinées plus efficaces contre les souches bactériennes multi-résistantes.

Mots clés : *Eucalyptus globulus* *Thymus vulgaris*, synergie, huiles essentielles, activité antibactérienne.

Abstract

Eucalyptus globulus (Myrtaceae) and *Thymus vulgaris* (Lamiaceae) are aromatic plants widely used since ancient times in traditional medicine due to their biological properties.

The objective of our work is to evaluate synergistically the antibacterial power of *Eucalyptus globulus* essential oil in combination with *Thymus vulgaris* essential oil against multi-resistant bacterial strains, namely *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

The plant material collected in the Tipaza region hydrodistillation using a Clavenger-type apparatus. The extraction yields obtained showed essential oil contents of 0.23% for *Eucalyptus globulus* leaves and 1.22% for the aerial part of *Thymus vulgaris*.

The antibacterial activity and synergistic effect were evaluated in vitro by three methods (disk or strip diffusion and microdilution).

In general, the results obtained showed an increase in the antibacterial activity of the two studied plant essential oils in combination. This synergy offers new perspectives for developing more effective combined therapeutic approaches against multi-resistant bacterial strains.

Key words : *Eucalyptus globulus* *Thymus vulgaris*, synergie, essential oil, antibacterial activity.

ملخص

العصور القديمة في الطب التقليدي بسبب خصائصهما البيولوجية هما نباتان عطريان يستخدمان على نطاق واسع منذ *Thymus vulgaris* و *Eucalyptus globulus*

يهدف هذا العمل إلى تقييم تأثير الزيت العطري لنبات *Eucalyptus globulus* على البكتيريا المتعددة المقاومة بمزجه بتركيز مختلفة، مع الزيت العطري *Thymus vulgaris*

تم تجميع المادة النباتية من منطقة تيبازة وتم تقطيرها بواسطة جهاز Clevenger وقد تم الحصول على الزيت العطري بمردود قدره 0,23% بالنسبة لأوراق الكاليتوس و 1,22% بالنسبة للأجزاء الهوائية للزعر البري

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا وتأثير التآزر بشكل عملي بواسطة طريقتين (انتشار الأقراص أو الشرائح والتخفيف المجهرى).

بشكل عام، أظهرت النتائج زيادة في النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية للنباتين المدروسين.

الكلمات المفتاحية: *Eucalyptus globulus* ، *Thymus vulgaris* , الزيت العطري , النشاط المضاد للبكتيريا .

Liste des Figures

Figure I. 1: Les feuilles et les fleurs et les fruits <i>d'Eucalyptus globulus</i>	5
Figure I. 2: Structure de 1,8-cinéole.....	7
Figure I. 3: Structure de Globulol	7
Figure I. 4: Les parties aériennes de <i>Thymus vulgaris</i>	14
Figure I. 5: Les composés phénoliques dans l'HE de <i>Thymus vulgaris</i>	18
Figure II. 1: Mode d'action des antibiotiques.....	22
Figure II. 2: Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries	23
Figure II. 3: Mode d'action des huiles essentielles.....	26
Figure II. 4: <i>Escherichia coli</i> au microscope	33
Figure II. 5: <i>Staphylococcus aureus</i> au microscope 100x.....	34
Figure II. 6: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au microscope.....	36
Figure III. 1: Les feuilles <i>d'Eucalyptus globulus</i>	37
Figure III. 2: Les parties aériennes de <i>Thymus vulgaris</i>	37
Figure III. 3: Montage d'hydrodistillation par Clevenger.	39
Figure III. 4: Les huiles obtenues de l'hydrodistillation.	39
Figure III. 5: Méthode de diffusion sur disque.	40
Figure III. 6: Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.	41
Figure III. 7: Dilution des huiles essentielles.....	42
Figure III. 8: Collage de milieux gélosés.....	42
Figure III. 9: Effet synergique de l'huile essentielle <i>d'Eucalyptus globulus</i> et <i>Thymus vulgaris</i> par la méthode des bandelettes.	44
Figure III. 10: Photographie montrant l'action d'HE <i>d'Eucalyptus globulus</i> sur les souches bactériennes : (a) <i>E.coli</i> (b) <i>S.aureus</i> (c) <i>Paeruginosa</i>	47
Figure III. 11: Photographie montrant l'action d'HE de <i>Thymus vulgaris</i> sur les souches bactérienne : (a) <i>E.coli</i> (b) <i>S.aureus</i> (c) <i>Paeruginosa</i>	49
Figure III. 12: Histogramme les valeurs de CMIs <i>d'Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis les bactéries testées.	51

Figure III. 13: Histogramme les valeurs de CMI de <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis les bactéries testées.....	51
Figure III. 14: L'action de la combinaison des HEs <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis les trois souches bactérienne (a) <i>E.coli</i> (b) <i>S.aureus</i> (c) <i>P.aeruginosa</i>	53
Figure III. 15: Histogramme les CMI de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> associés à l'HE de <i>Thymus vulgaris</i>	56

Liste des Tableaux

Tableau I. 1: Distribution géographique <i>d'Eucalyptus globulus</i> en Algérie.....	4
Tableau I. 2: Taxonomie de l'espèce <i>Eucalyptus globulus</i> selon le nomenclateur classique	5
Tableau I. 3: La composition chimique de l'huile essentielle <i>d'Eucalyptus globulus</i>	6
Tableau I. 4: Composition chimique de l'huile essentielle <i>d'Eucalyptus globulus</i> provenant des différentes régions de l'Algérie.	8
Tableau I. 5: Les composés majoritaires de l'huile essentielle <i>d'Eucalyptus globulus</i> de différentes régions dans le monde	9
Tableau I. 6: Localisation des principales espèces de genre <i>Thymus en Algérie</i>	13
Tableau I. 7: La classification botanique de <i>Thymus vulgaris</i>	14
Tableau I. 8: Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> récolté en Algérie.	16
Tableau I. 9: La composition chimique d'huile <i>Thymus vulgaris</i> dans le monde.	17
Tableau II. 1: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la combinaison d'huile essentielle <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Origanum vulgare</i> contre les SARM.	28
Tableau II. 2: Les différents mécanismes de résistance acquise <i>d'Escherichia coli</i> aux antibiotiques.....	32
Tableau II. 3: Mécanismes de résistances aux antibiotiques chez <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Tableau II. 4: Mécanismes se résistances aux antibiotiques chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Tableau III. 1: Matériels utilisés.	38
Tableau III. 2: Les souches bactériennes.	40
Tableau III. 3: Rendement des huiles essentielles.	46
Tableau III. 4: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle <i>d'Eucalyptus globulus</i> et <i>Thymus vulgaris</i>	46
Tableau III. 5: Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition d'HE <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis des trois bactéries.....	47
Tableau III. 6: Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions HE <i>d'Eucalyptus globulus</i> seule.	48
Tableau III. 7: Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition d'HE de <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis trois bactéries.	49

Tableau III. 8: Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> seule.	50
Tableau III. 9: Les valeurs de CMI des HEs <i>d'Eucalyptus globulus</i> et <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis les bactéries testé (<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>). 51	51
Tableau III. 10: Valeur des diamètre moyens de la zone d'inhibition de combinaison d'HE <i>Eucalyptus globulus</i> et d'huile de <i>Thymus vulgaris</i> vis-à-vis des trois bactéries.	53
Tableau III. 11: Résultat de l'effet synergisme par la méthode de diffusion sur bandelettes. .54	54
Tableau III. 12: Les concentrations minimales inhibitrices de l'HE <i>d'Eucalyptus globulus</i> associés à l'HE de <i>Thymus vulgaris</i> et du standard.	55
Tableau III. 13: Les valeurs FICI pour les différentes associations <i>d'Eucalyptus globulus</i> avec <i>Thymus vulgaris</i>	57

Liste des abréviations

HE : huile essentielle

E : *Eucalyptus*

T : *Thymus*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

BLSE : Bêta-lactamases à spectre étendu

CMB : Concentration minimale bactéricide

CMI : Concentration minimale inhibitrice

FIC : Concentration inhibitrice fractionnelle

FICI : Indice de concentration inhibitrice fractionnelle

ASRM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

MRSAMups : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et résistant à Mupirocin.

AMX : amoxicilline.

E. Coli : *Escherichia coli*

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

ml : millilitre

DMSO : diméthylsulfoxyde

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des Tableaux

Liste des Figures

INTRODUCTION 1

Partie bibliographique

Chapitre I :Aperçu bibliographique sur les espèces *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* .

I. Généralité sur l'espèce *Eucalyptus globulus* 3

I.1 Présentation de la famille Myrtaceae3

I.2 Présentation de l'espèce *Eucalyptus globulus*4

I.2.1 Description botanique4

I.2.2 Répartition géographique d'*Eucalyptus* en Algérie.....4

I.2.3 Origine et classification.....4

I.2.4 Les différentes espèces d'*Eucalyptus* en Algérie.....5

I.3 Composition chimique de l'*Eucalyptus globulus*6

I.3.1 Métabolite secondaire d'*Eucalyptus globulus* :6

I.3.2 Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.....6

I.4 Activités biologiques de l'espèce d'*Eucalyptus globulus*..... 10

I.4.1 Activité antibactérienne..... 10

I.4.2 Activité antivirale..... 11

I.4.3 Activité antioxydante 11

I.4.4 Activité anticancéreuse 12

I.4.5 Activité antifongique..... 12

II. Généralité de l'espèce *Thymus vulgaris* 12

II.1 Présentation de la famille Lamiaceae..... 12

II.2 Présentation de l'espèce *Thymus vulgaris*..... 12

II.2.1 Description botanique 12

II.2.2 Répartition géographique..... 13

II.2.3 Origine et classification 14

II.3 Composition chimique de l'espèce *Thymus Vulgaris*..... 15

II.3.1 Métabolite Secondaire de <i>Thymus</i>	15
II.3.2 Composition chimique d'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i>	16
II.4 Activités biologiques de <i>Thymus Vulgaris</i>	18
II.4.1 Activité antibactérienne	18
II.4.2 Activité antivirale	18
II.4.3 Activité antifongique	19

Chapitre II : Activité antibactérienne et effet de synergie

I.L'activité antibactérienne et la résistance bactérienne.....	20
I.1 Historique des antibiotiques.....	20
I.2 Mécanisme d'action des antibiotiques.....	20
I.2.1 Action sur la paroi bactérienne.....	20
I.2.2 Action sur la membrane cytoplasmique	21
I.2.3 Action Sur l'ARN des ribosomes.....	21
I.2.4 Action sur l'ADN bactérienne	21
I.2.5 Les antibiotiques inhibiteurs du métabolisme intermédiaire	21
I.3 Résistance des bactéries	22
I.3.1 Résistante naturelle	22
I.3.2 La résistance acquise.....	22
I.4 Mécanismes de résistance aux antibiotiques	23
I.4.1 Inhibition d'antibiotiques	23
I.4.2 Modification des cibles des antibiotiques.....	24
I.4.3 L'efflux membranaire bactérien	24
I.4.4 Bases génétiques de la résistance	24
I.5 Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles	25
I.5.1 Action sur la membrane cellulaire.....	26
I.5.2 Action sur les acides gras membranaires.....	26
I.5.3 Action sur les protéines.....	27
II.L'effet synergique	27
II.1 Définition.....	27
II.2 Études antérieures sur l'effet de combinaison de l'huile essentielle de <i>Eucalyptus globulus</i> et d'autre huiles.....	28
II.3 Effets de combinaison de l'huile essentielle de <i>Eucalyptus globulus</i> avec des antibiotiques...	29
II.4 Études antérieures sur l'effet de combinaison de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> et d'autre huiles.....	30
II.5 Effets de combinaison des composés de l'huile essentielle de <i>Thymus vulgaris</i> avec des antibiotiques	31
III.Résistante bactérienne des souches étudier	32
III.1 <i>Escherichia coli</i>	32

III.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
III.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
Partie expérimentale	36
Description des travaux et Discussion de résultats	36
I. Description des travaux	37
I.1 Introduction.....	37
I.2 Matériel végétale.....	37
I.3 Matériel de laboratoire	38
I.4 Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation	38
I.5 Calcul du rendement	39
I.6 Évaluation de l'activité antibactérienne	40
I.6.1 La méthode de diffusion sur disque.....	40
I.6.2 La méthode de Microdilution en milieu liquide	41
I.7 Protocole expérimentale de l'activité antibactérienne	41
I.7.1 Préparation des dilutions d'huile essentielle.....	41
I.7.2 Préparation de Milieu de culture	42
I.7.3 Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne	42
I.8 Étude de l'effet synergique	43
I.8.1 La méthode de diffusion sur disques	43
I.8.2 Méthode de diffusion sur bandelettes	44
I.8.3 La méthode Microdilution en milieu liquide	45
II. Résultats et discussion	45
II.1 Rendement d'extraction des huiles essentielles	45
II.2 Caractères Organoleptiques des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> et <i>Thymus vulgaris</i>	46
II.3 Étude l'activité antibactérienne.....	46
II.3.1 Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles seules	46
II.3.2 La méthode de diffusion sur gélose.....	47
II.3.3 La méthode de dilution en milieu liquide.....	50
II.4 Évaluation de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles en combinaison	53
II.4.1 La méthode de diffusion sur disques.....	53
II.4.2 La méthode de diffusion sur bandelettes	54
II.4.3 La méthode de CMIs.....	55
Conclusion	59
References	61

INTRODUCTION

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique, en particulier lorsque des bactéries multirésistantes apparaissent comme : *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* [1].

Les infections bactériennes ont toujours été la principale cause de maladies dans l'histoire de l'humanité. Aujourd'hui, la thérapie antibiotique est le traitement le plus courant pour combattre les infections bactériennes, mais l'apparition de nouvelles souches de bactéries résistantes à chaque nouvelle classe d'antibiotique est un énorme problème. Le nombre d'infections associées aux antibiotiques augmente considérablement, atteignant 52 000 patients en 2007 [2], et en France, une étude menée par la Santé Publique en 2012 a révélé que le nombre de cas infectés par des bactéries multirésistantes atteignait 158 000, tandis que le nombre de décès atteignait 12 500 [3]. Les phénomènes à l'origine de l'émergence et de la diffusion de ces bactéries sont complexes et difficiles à anticiper.

Dans ce cadre, la problématique de la résistance aux antibiotiques interpelle les communautés scientifiques, car il est devenu très indispensable de trouver des nouveaux agents thérapeutiques. Pour cela, les chercheurs ont été orientés vers le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires représentant un potentiel inestimable pour la découverte de phytomédicaments à pouvoir antibactérien. Ainsi les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules bioactives [4]. Elles rentrent dans la composition de plusieurs médicaments, sous forme de crèmes, gélules et suppositoires, leur utilisation s'appelle "l'aromathérapie", qui consiste à utiliser les huiles essentielles comme alternative pour le traitement des maladies d'origine bactérienne [5] , [6].

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes avec un certain nombre de constituants qui peuvent avoir un impact sur l'activité biologique, indépendamment ou en combinaison. Les activités biologiques de plusieurs constituants de l'huile ont été étudiées [7] , [8]. Dans ces études, le 1,8-cinéole et le thym figurent principalement comme constituant majeur ou mineur présent dans un certain nombre de plantes aromatiques, telles que *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*.

L'Eucalyptus globulus est une plante médicinale riche en composés phénoliques, tannins et flavonoïdes, ces composés sont appelés composés métaboliques secondaires responsable à la

protection contre les agents pathogènes et ont des activités biologiques telles que l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, antimicrobienne, analgésique, etc [9].

Le *Thymus vulgaris* contient au fait plusieurs composés bioactifs tels que les flavonoïdes et les phénols qui sont utilisés dans plusieurs préparations alimentaires (thymol) pharmaceutique et en parfumerie. À la fois antibactérienne, fongicide et antioxydant [10].

L'objectif de notre travail consiste à évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles extraites à partir des feuilles de deux plantes aromatiques et locales (*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*), cette activité est testée sur trois bactéries pathogènes pour l'homme (*staphylocoques aureus* et *Escherichia coli* et *pseudomonas aeruginosa*), d'autre part ce mémoire a un autre objectif basé sur la recherche de l'effet synergique entre ces huiles.

Notre travail est subdivisé en deux parties :

- La première partie, concerne une étude bibliographique qui regroupe deux chapitres ;

Une généralité sur les deux espèces étudiées *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*, leurs propriétés thérapeutiques, ainsi que leurs compositions chimiques sont abordées dans le premier chapitre.

- Le deuxième chapitre renferme l'activité antibactérienne, la résistance aux antibiotiques, ainsi que les travaux antérieurs effectués sur l'effet de synergie entre les deux huiles essentielles étudiées vis-à-vis des bactéries multi-résistantes.

- La deuxième partie contient le travail expérimental :

Le protocole d'extraction des huiles essentielles pour les deux plantes *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*, ainsi que les méthodes utilisées pour déterminer l'activité antibactérienne et l'effet de synergique sont traités dans la 1^{ère} partie et la discussion des résultats obtenus dans la 2^{ème} partie de cette partie expérimentale.

Enfin, ce travail est achevé par une conclusion générale.

Partie bibliographique

Chapitre I

Aperçu bibliographique sur les espèces
Eucalyptus globulus et *Thymus vulgaris*

I. Généralité sur l'espèce *Eucalyptus globulus*

I.1 Présentation de la famille Myrtaceae

Les Myrtacées sont une famille de plantes dicotylédones composée de plus de 3 000 espèces classées en environ 48 à 134 genres. Ce sont des arbres et arbustes qui poussent principalement en Australie et en Amérique tropicale et sont producteurs d'huiles aromatiques tempérées, subtropicales et tropicales [11].

Les myrtacées appartiennent à la grande classe des plantes dicotylédones. Elles sont toutes hermaphrodites, le plus souvent arborescentes ou sous-frutescentes, rarement herbacées.

Tige et branches principalement cylindriques, parfois quadrangulaires contourné. Les feuilles sont toujours simples, généralement ou peu dentelées, pétiolées, opposées, rarement alternes ou verticillés.

Limbe parfois cylindrique ou aplati, trigonal ou séminéral, fournissant parfois veine marginale.

Les inflorescences de cette famille sont en cyme ou en grappe et parfois réduites à une seule fleur solitaire. Elles sont auxiliaires ou terminales. Les fleurs des Myrtacées ont une odeur suave et sont pollinisées par divers insectes, oiseaux ou mammifères. Elles sont généralement hermaphrodites. Le réceptacle floral est en forme de coupe plus ou moins allongée et la fleur actinomorphe, tétramère ou pentamère [12,13,14].

Deux verticilles sont insérés à l'extrémité du vase et elles sont soudées ensemble pour former un pied à coulisse en forme de bouchon, Ces derniers sont soulevés par l'érection des étamines.

Pendant la floraison menant à sa chute, Chaque fouet se compose de 4 ou 5 pièces libre ou soudé et imbriqué entre les deux.

Les étamines sont généralement constituées de nombreuses étamines en développement. Centripètes ; elles sont libres ou réunies à la base en quatre ou cinq faisceaux donc en dessous.

Chez les Myrtacées, il y a généralement 4 ou 5 sépales, libres ou fusionnés les pétales Les numéros 4 ou 5 sont libres ou soudés, petits, arrondis et parfois imbriqués sur le bouchon le nombre d'étamines est 'n', mais il y en a 2-5 carpelle.

La pollinisation est favorisée par la présence de disques de nectar de couverture Ovaire, les fleurs sont dites insectophiles.

Les fruits sont généralement des baies surmontées de calices ou de capsules insecticides. Aussi rarement des caryomes ou de l'acné. Les graines sont généralement peu nombreuses. Chaque coffret est également unique. Ces graines sont ex-albumine.

Les embryons consomment toutes les protéines pendant la maturation. Les fruits juteux sont propagés par les oiseaux et les mammifères, et les capsules contiennent de minuscules graines, généralement propagées par le vent ou l'eau [13,14].

I.2 Présentation de l'espèce *Eucalyptus globulus*

I.2.1 Description botanique

L'Eucalyptus appartient à la famille des Myrtaceae (Myrtacées) et apparaît sous plusieurs espèces presque 300 espèces (genres *Eucalyptus*, *Eugenia*, *Melaleuca*, *Myrta*). Ils comptent environ 600 à 700 espèces et variétés. Ce sont des angiospermes, dicotylédones [15]. C'est un arbre à tronc lisse dont la croissance est tellement rapide qu'il peut atteindre les 100 m de longueur. Les feuilles âgées sont verte-grisâtre, coriaces, pendantes, à limbe falciforme relié à la tige via un pétiole court. Les jeunes feuilles sont de couleur vert pâle, sessiles, cireuse à limbe arrondie. Le calice de la fleur est formé de quatre sépales, cireux et râpeux, soudés, qui forment une urne à quatre pans dont le « couvercle » se détache en période de floraison et d'où sortent de nombreuses étamines [16].

I.2.2 Répartition géographique d'*Eucalyptus* en Algérie

Une surface de 58555 hectares a été occupée par *Eucalyptus* donc plus de la moitié dans la région oranaise (Boudy 1950), des plantations ont été menées le long de la littorale. On retrouve cette espèce à EL-kala, Azzfoune et la Mitidja [17], la répartition géographique de *Eucalyptus globulus* est représentée brièvement dans le tableau (I.1).

Tableau I. 1: Distribution géographique d'*Eucalyptus globulus* en Algérie [17]

Wilaya	Blida	Boumerdes	Skikda	S. Belabas	Setif	Al Taref
Superficie	41 Ares	70 Ares	2250 HA	342HA	10 Ares	1000HA

I.2.3 Origine et classification

L'origine du nom *Eucalyptus* vient du grec, « eu » qui signifie bon ou bien et « kalypto » qui signifie couvrir et protéger du fait que les pétales et sépales sont soudés [18]. L'arbre d'*Eucalyptus*, appelé aussi Gommier bleu ou arbre aux fièvres, forme actuellement une partie

importante de la végétation mondiale. Originaire d’Australie, cet arbre à croissance rapide s’est parfaitement adapté au climat méditerranéen et aux régions subtropicales grâce à sa propriété d’assécher les terres humides [19] , Il a été introduit en Algérie en 1854 par Ramel [20] , où il est maintenant largement distribué.

Tableau I. 2: Taxonomie de l'espèce *Eucalyptus globulus* selon le nomenclateur classique. [21]

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Sous-classe	Rosidae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Eucalyptus</i>
Espèce	<i>Eucalyptus globulus</i> (Labill.)



Figure I. 1: Les feuilles et les fleurs et les fruits d'*Eucalyptus globulus*. [22]

I.2.4 Les différentes espèces d'*Eucalyptus* en Algérie

Les principales espèces utilisées sont : [23]

- *Eucalyptus* Maidenii.
- *Eucalyptus* Viminalis.
- *Eucalyptus* Camaldulensis.
- *Eucalyptus* Gomphocephara.
- *Eucalyptus* Meliodora Celtisaustralis.
- *Eucalyptus* Sempervirens.
- *Eucalyptus* Bicostata.
- *Eucalyptus* Globulus.
- *Eucalyptus* Eburnea.

- *Eucalyptus Cladocalyx*.
- *Eucalyptus Ovata*.
- *Eucalyptus Umbellata*.
- *Eucalyptus Sideroxyton*.

I.3 Composition chimique de l'*Eucalyptus globulus*

I.3.1 Métabolite secondaire d'*Eucalyptus globulus* :

- **Les terpènes** : le 1,8-cinéole (ou eucalyptol), le limonène, le pinène, l'alpha-terpinéol, le globulol, le phellandrène, le aromadendrène, le terpinèn-4-ol, le alpha-pinène, le gamma-terpinène, le para-cymène, etc.
- **Les phénols** : l'eucalyptus globulus contient des phénols tels que l'acide caféique, l'acide chlorogénique, l'acide férulique, l'acide gallique, l'acide protocatéchique, l'acide syringique, etc.
- **Les flavonoïdes** : l'eucalyptus globulus contient des flavonoïdes tels que la quercétine, la kaempférol, la lutéoline, l'isorhamnétine, la myricétine, etc.
- **Les tanins** : l'eucalyptus globulus contient également des tanins, bien que leur teneur varie en fonction de la partie de la plante étudiée et de la méthode d'extraction utilisée.

Il est important de noter que les métabolites secondaires présents dans les plantes peuvent varier en fonction de plusieurs facteurs, tels que les conditions de culture, la saison, le stade de croissance, etc. Par conséquent, les teneurs et les types de métabolites secondaires présents dans l'*Eucalyptus globulus* peuvent varier en fonction des conditions dans lesquelles la plante a été cultivée et de la méthode d'extraction utilisée pour isoler les métabolites [24].

I.3.2 Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Tableau I. 3: La composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* [25] .

Famille	Composées
Monoterpènes	Alpha-pinène, s-pinène, δ-limonène, para-cymène, camphène, alpha-phellandrène, alpha-fenchène, γ-terpinène alphaphellandrène, alpha-fenchène, γ-terpinène .
Sesquiterpènes	aromadendrène, alloaromadendrène.
Alcools	eudesmol, alpha-terpineol, globulol, pinocarveol.
Aldéhydes	Citral, myrtenal.
Cétones	Carvone, pinocarvone, verbenone et l'acétate de geranyl .

Les propriétés des composées majoritaires :

- **1,8-Cinéole** C'est un composé monoterpène naturel avec une odeur rafraîchissante et piquante de camphre, il est traditionnellement utilisé pour le traitement de la bronchite depuis l'Antiquité. Le 1,8-cinéole agit en accélérant la fréquence des battements des cils dans la muqueuse. Il agit également comme agent bronchodilatateur et anti-inflammatoire [26]. Ils ont étudié les effets de l'huile d'*Eucalyptus globulus* sur la bronchiolite et l'hypersécrétion [27].

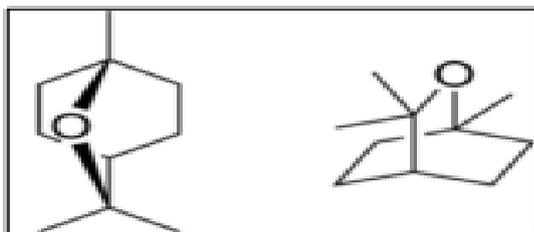


Figure I. 2: Structure de 1,8-cinéole. [28]

- **Globulol** appartient à la classe des composés organiques appelés sesquiterpénoïdes ; 5,10- cyclo-aromadendrane. Ce sont des sesquiterpénoïdes aromadendrane qui résultent de la cyclisation C5-C10 du squelette aromadendrane.

Le globulol a été criblé pour avoir une forte activité antifongique sur les champignons testés *Alternaria solani*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* et *V. pirina*, les données de concentration inhibitrice efficace médiane [29].

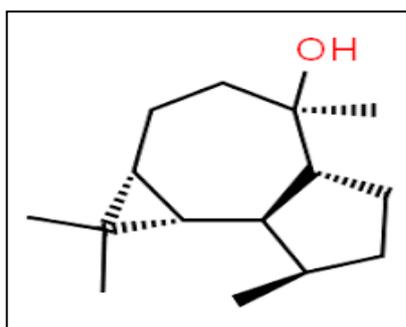


Figure I. 3: Structure de Globulol [30].

La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *E.globulus* et dans différentes régions en Algérie est indiqué dans le tableau (I.4) ci-dessous.

Tableau I. 4: Composition chimique de l'huile essentielle *d'Eucalyptus globulus* provenant des différentes régions de l'Algérie.

Composés	Tizi-ouzou [23]	Bejaia [34]	El hamma (alger) [29,30,31]
α -pinène	2.03 %	4,61%	10,7%
Camphène	0.01 %	-	7,6%
β -pinène	0.08 %	0,07%	-
Myrcene	0.06 %	-	-
a.phelladrene	0.06 %	-	-
P.Cymene	0.08 %	-	-
1.8 Cinéole (Eucalyptol)	73.32 %	55,29%	15,2%
Gamma Terpinène	0.05%	-	-
Terpinolène	0.07 %	-	-
Linalol	0.04 %	-	7,3%
Compholène Aldehyde	0.08 %	-	-
Bornéol	0.47 %	-	-
Terpène-4-ol	0.72 %	-	8,1%
Alpha Terpèneol	2.58 %	-	-
Nerol	0.90 %	-	-
Acetate de linalyl	0.21 %	-	-
Acetate de Terpènyl	4.19 %	-	-
Acetate de Geranyl	0.15 %	-	-
B.Caryophellene	0.10 %	-	-
ALPHA.Humulène	0.15 %	-	-

Le tableau (I.4) présente les principaux composés en pourcentage de l'huile essentielle *d'Eucalyptus globulus* pour cinq échantillons provenant de différentes régions, les pourcentages indiqués permettent de comparer les profils aromatiques des échantillons.

On observe que pour les échantillons F.J, Versant Nord et Versant Sud, le composé le plus présent est le 1,8 Cinéole (Eucalyptol), avec des pourcentages élevés allant de 73,32% à 78,76%. En revanche, pour l'échantillon de Bejaia, le pourcentage de ce composé est plus faible (55,29%) et d'autres composés tels que le Linalol et le Terpène-4-ol sont présents en plus grande quantité.

L'échantillon d'El hamma alger présente des pourcentages beaucoup plus faibles de 1,8 Cinéole (Eucalyptol) (15,2%) mais des quantités plus importantes de Bornéol et de Terpène-4-ol.

Enfin, on remarque également que certains composés sont présents en faible quantité ou même absents selon les échantillons, tels que le Camphène, le Myrcène, l' α -phelladrène, le p-Cymène, le Gamma Terpinène, le Terpinolène, le Compholène Aldehyde, l'Acétate de Linalyl, l'Acétate de Geranyl, le B.Caryophellene et l'ALPHA.Hmulène.

En somme, ce tableau permet de visualiser les différences dans les profils aromatiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* en fonction des régions de provenance des échantillons.

La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Eucalyptus globulus* et dans différentes régions dans le monde dans tableau (I.5).

Tableau I. 5: Les composées majoritaires de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* de différentes régions dans le monde [35] .

Abondance relative (%)								
Auteurs	Mulyaningsih et al (2010)	Goldbeek et al (2014)	Vilela et al (2009)	Elaissi et al (2012)	Manika et al (2013)	Kumare Et al (2014)	Tiyagi et malik (2011)	Boukhatem Et al (2014)
Pays	Allemagne	Brésil	Brésil	Tunisie	Inde	Inde	Inde	Algérie
Composés								
α -pinène	1,53	8,30		12	1,2		4,2	24,6
Limonène	-	-	-	2,3	-	10,09	17,8	-
p-cymene	0,49	1,79	-	1,0	-	-	9,5	-
1,8-cinéol	14,55	71,05	89,95	53,7	63,7	33,62	45,4	51,08
Terpinène	0,18	-	0,25	-	0,8	2,92	8,8	-
Pinocarvone	-	0,75	0,30	1,7	-	-	0,4	9,98
Alpha-terpinéol	0,85	0,79	0,62	3,3	0,9	4,72	3,6	0,4
Aromadendrène	31,17	-	-	3,7	13,5	-	-	-
Globulol	10,69	3,51	-	7,0	3,4	-	-	2,81
- : non détecté. Les composés en gras ont été retrouvés comme majoritaires dans l'huile essentielle								

Le tableau représente plusieurs variétés d'*Eucalyptus globulus* dans différents pays dans le monde, et toutes ne possèdent pas les mêmes composants.

Cependant, il y a certains composants qui sont présent dans la majorité des cas, et ceux-ci sont bien souvent ceux qui sont à l'origine des bienfaits thérapeutique qui l'on attribue à l'*Eucalyptus* (10).

Permis ces composés majoritaires, le 1,8-cinéole varie a 70 à 80 % et d'autre composés minoritaires comme le terpinène varie moins 3%.

I.4 Activités biologiques de l'espèce d'*Eucalyptus globulus*

I.4.1 Activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a été effectuée sur des souches bactériennes sélectionnées vue leur multi résistance aux antibiotiques [36], et elle est utilisés comme des agents naturels dans la conservation des aliments grâce à son effet antibactérien sur les microorganismes. [37]

L'huile essentielle extraite des feuilles d'*Eucalyptus globulus* présente un puissant effet antibactérien contre la plupart des souches de *Staphylococcus aureus* avec les zones d'inhibition mesurées sont comprises entre $8,0\pm 0,0$ et $12,0\pm 0,0$ mm pour un volume de 5 μ l et entre $8,5\pm 0,7$ et $16,0\pm 1,4$ mm pour 10 μ l d'HE [36].

D'autres études ont expérimenté l'utilisation de la méthode de diffusion sur gélose pour tester *Staphylococcus aureus* avec Le diamètre de la zone d'inhibition variait de 69 mm à 75 mm [38].

Les expérimentations ont mis en évidence une activité antibactérienne significative particulièrement contre les bactéries Gram négatif *Escherichia coli*, cette activité peut être principalement attribuée aux composés majoritaires présents dans l'huile [39], montrent une bonne activité antimicrobienne avec les zones d'inhibition varient de 14 mm à 19 mm [40].

Cette huile et exercer sur les souches de *Salmonella spp* indique des zones d'inhibition allant de de 15 mm à 19 mm [40].

Les diamètres des zones d'inhibitions de l'huile d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis de souche appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode des disques, montrent qu'elle est sensible par le diamètre 10.5 ± 0.70 et 12.0 ± 1.41 mm pour 5 μ l d'HE et entre 11.5 ± 0.7 et 13.0 ± 0.70 mm pour 10 μ l d'huile d'*Eucalyptus* [36].

Les résultats de l'étude ont révélé que l'huile d'eucalyptus a une activité antibactérienne contre les bactéries gram positives et gram négatives [41].

I.4.2 Activité antivirale

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est utilisée en médecine pour son potentiel thérapeutique antiviral. Elle a été particulièrement étudiée pour traiter les symptômes des maladies infectieuses aéroportées, telles que le COVID-19, qui appartient au genre Beta coronavirus de la famille des Coronaviridae. Les recherches in vitro, in vivo et in silico ont permis de mieux comprendre la composition chimique et les mécanismes moléculaires antiviraux de l'huile essentielle [42].

Une étude in silico a porté sur l'évaluation des monoterpènes présents dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus*, tels que le 1,8-cinéole, l' α -pinène, l' α -terpinéol, le limonène et l' α -cymène. Les résultats ont montré que le 1,8-cinéole pourrait potentiellement inhiber la protéine Mpro du COVID-19 grâce à ses groupements fonctionnels, tels que les groupes hydroxy (-OH), les groupes cétone (=O) et les groupes éther (-O-). Il est prévu que ces composants jouent un rôle dans les interactions amino-acides sur le site actif de la protéine Mpro du COVID-19 [43].

Des études in vivo ont montré que l'huile essentielle d'*Eucalyptus* avait un effet antiviral direct sur le virus de l'herpès labial HSV en réduisant l'infection avant ou pendant l'adsorption du virus dans la cellule hôte [44]. Des résultats similaires ont été observés dans une étude in vitro sur le virus de la grippe A (H1N1), où l'exposition à la vapeur d'huile essentielle d'eucalyptus a eu un effet inhibiteur significatif sur la formation de plaques de virus influenza A en se liant à la protéine de surface de l'hémagglutinine du virus [45].

Cependant, une autre étude a montré que l'huile essentielle d'*Eucalyptus* n'avait qu'une action légère sur les virus ourliens Myxovirus parotidis, responsables des oreillons, mais n'avait aucune activité sur les adénovirus [46].

I.4.3 Activité antioxydante

Les huiles essentielles sont considérées comme des ressources potentielles de molécules bioactives naturelles, qui ont été étudiées pour leurs propriétés anti oxydantes. Les Composés phénoliques, comme le thymol, la carvacrol et l'eugénol font partie des molécules des huiles essentielles présentant les plus fortes activités anti oxydantes ainsi que d'autres composés qui Contribuent à cette activité telle que les monoterpènes alcools, cétones, aldéhydes, hydrocarbures et éthers [47].

I.4.4 Activité anticancéreuse

Des études se sont penchées sur l'effet anticancéreux du 1,8-cinéole. Ils ont démontré que le 1,8-cinéole était inducteur de l'apoptose des cellules leucémiques humaines et l'effet anti-tumoral du 1,8-cinéole dans le cas du cancer colorectal. Il ne s'agit pour l'instant que de faibles effets et il n'y a pas encore assez d'études pour le démontrer, mais les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et d'*Eucalyptus radiata* pourraient à l'avenir servir de complément aux traitements anticancéreux actuels [48,49].

I.4.5 Activité antifongique

Dans une étude, Ils ont démontré une activité antifongique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sur deux espèces d'aspergillus à savoir *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* [50]. Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a un effet significatif sur l'inhibition de la croissance des mycéliums de ces deux espèces d'aspergillus.

Cependant, l'effet antifongique observé ne peut pas être attribué au 1,8-cinéole seul, car celui-ci n'a pas montré d'effet sur les mycéliums. Il semblerait plutôt que l'activité antifongique soit due à une synergie de molécules présentes dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.

II. Généralité de l'espèce *Thymus vulgaris*

II.1 Présentation de la famille Lamiaceae

La famille des Lamiaceae, également connue sous le nom de famille de la menthe, est une famille de plantes à fleurs largement répandue dans le monde entier. Elle comprend plus de 7000 espèces réparties dans environ 230 genres différents. Les Lamiaceae se distinguent par leur feuilles opposées, généralement dentées ou lobées, et leurs fleurs bilabiées caractéristiques [51].

II.2 Présentation de l'espèce *Thymus vulgaris*

II.2.1 Description botanique

Thymus vulgaris est une plante un petit sous-arbrisseau vivace, odorante, et forme une touffe compacte très ramifiée qui s'élèvent à une vingtaine de centimètre au-dessus du sol. Les feuilles du thym sont plus au moins contractées et les inflorescences sont faux verticilles, d'un aspect grisâtre ou vert-grisâtre [52].

Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varient du blanc au violet au rose [4].

II.2.2 Répartition géographique

- **Dans le monde :**

Le genre *Thymus* est l'un des 250 genres les plus diversifiés de la famille des labiées [53], il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la Méditerranée [54]. On le trouve également dans les montagnes d'Arabie du Sud-ouest et dans la péninsule du Sinaï en Égypte [55].

- **Dans l'Algérie :**

L'Algérie est connue par sa richesse en plantes médicinales au regard de sa superficie et de sa diversité bioclimatique. Le thym est une plante répandue en Algérie. Ils ont décrit 8 espèces de *Thymus* dont endémiques, Les différentes espèces qui y existent sont réparties le long du territoire national, du Nord Algérois à l'Atlas saharien, et du Constantinois à l'Oranais [56].

La répartition géographique du genre *Thymus* en Algérie est représentée dans le tableau (I.6).

Tableau I. 6: Localisation des principales espèces de genre *Thymus en Algérie* [57,58].

Espèces	Découverte par	Localisation
<i>Thymus Capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus Fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<i>Thymus Commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran
<i>Thymus Numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous-secteur de l'atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois
<i>Thymus Guyoni</i>	Noé	Rare dans le sous-secteur des hauts Plateaux algérois, oranais et constantinois
<i>Thymus Pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous-secteur de L'Atlas Saharien et constantinois
<i>Thymus Hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral
<i>Thymus Glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous-secteur des hauts Plateaux algérois.
<i>Thymus Algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous-secteur des Hauts plateaux algérois, oranais
<i>Thymus Munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

II.2.3 Origine et classification

L'origine du mot Latin « *Thymus* » n'est pas tout à fait tranchée. Certains auteurs supposent qu'il provient du Grec thyo (parfumer). Une autre interprétation étymologique considère qu'il provient du mot grec « thymos » "courage, force" [59].

Le *Thymus* est de la pharmacopée méditerranéenne, il a la particularité de présenter une diversité de chémotypes de grande variété de constituants médicinaux [60].

Au XVII^e siècle, le Thym a été utilisé au cours de la peste qui a balayé l'Europe. Il est utilisé aussi par les Egyptiens pour embaumer les morts. Les Romains, de leur part brûlaient le Thym pour éloigner les créatures venimeuses. Ils s'en servaient aussi pour aromatiser le fromage [61].

Sa classification dans la systématique botanique est représentée dans le tableau (I.7) suivant [62].

Tableau I. 7: La classification botanique de *Thymus vulgaris*.

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



Figure I. 4: Les parties aériennes de *Thymus vulgaris*. [63]

II.3 Composition chimique de l'espèce *Thymus Vulgaris*

II.3.1 Métabolite Secondaire de *Thymus*

Le genre *Thymus* a fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et biologiques.

L'investigation phytochimique extensive, a révélé la présence de plusieurs composés bioactifs tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpenoïdes, les oligomères d'acide caféique (connu comme labiatae tannins), les dérivés d'hydroquinone, les Biphényles, etc. [64]

Les polyphénols comprennent un grand groupe de composés phytochimiques produits comme des métabolites secondaires dans les plantes. Le thym est l'une des plantes aromatiques riche en polyphénols, il contient :

➤ **Les tanins** : principalement représentés par :

- L'acide rosmarinique avec des teneurs variant entre 0,15 et 4%.
- L'acide 3'-O-(8"-Z-caffeoyl)-rosmarinique a également été isolé des feuilles

Les acides phénoliques libres : principalement représenté par : L'acide caféique, l'acide gentisique, l'acide p-cumarique, l'acide syringique, l'acide férulique et l'acide p-hydroxybenzoïque.

➤ **Les flavonoïdes** : Dans le thym commun, environ 25 flavonoïdes différents ont pu être détectés et sont énumérés ci-dessous :

- Flavones : apigénine, lutéoline, 6-hydroxylutéoline.
- Méthylflavones : cirsiléol, 8-méthoxycirsiléol, cirsimarine, 5-desméthylnobiletin, 5-desméthylsinensétin, gardenin B, genkwanin, 7-méthoxylutéoline, salvigénine, sidéritoflavone, thymonine, thymusine, xanthomicrol.
- Flavanols : taxifoline, 2,3-dihydrokaempférol.
- Flavanones : ériodictyol, naringénine.
- Méthyl flavanes : 2,3-dihydroxanthomicrol, sakuranétin.
- Flavonols kaempférol, quercétine.
- Glycosides de flavone : apigénine-7-O- β -D-glucoside, apigénine-7-O- β -D-rutinoside, apigénine-6,8-di-C- β -glucoside, apigénine-7-O- β -glucuronide, ériodictyol 7-O- β -D-rutinoside, hespéridine, lutéoline-7-O- β -D-glucoside, lutéoline-7-O- β -D-diglucoside, vicénine-2(C-glucoside) [58].

II.3.2 Composition chimique d'huile essentielle de *Thymus vulgaris*

De nombreuses études ont révélé que les parties aériennes de *Thymus vulgaris* sont très riche en plusieurs constituants dont la teneur varie selon la variabilité des condition géographiques, climatiques, de séchage, de stockage et des méthodes d'études [65].

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* est composée d'une quantité très variable en phénols comme le Thymol et le carvacrol en sont les majeurs constituants [66]; avec d'autres composés minoritaires : tels que α -thujène ; α -pinène ; camphène ; Sabinène ; β -pinène ; α -phellandrène ; α -terpinène ; p-cymène ; γ -terpinène ; Terpinolène ; Linalol ; Camphre ; Bornéol ; 4-terpinéol ; Isothymol ; Caryophyllène ; Germacrène D [67].

La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Thymus vulgaris* et dans différentes régions en Algérie est indiqué dans le tableau (I.8) ci-dessous.

Tableau I. 8: Composition chimique de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* récolté en Algérie.

Composées principales	Région	Référence
Thymol (58,1 - 44,4%) P-cymène (18,5 - 9,1%) γ -terpiène (18,0 - 6,9%) Carvacrol (4,2 - 2,4%)	(Mostaganem)	[68]
Thymol (70 - 30%) P-cymène (20 - 15%) Carvacrol (15 - 3%) γ -terpinène (10 - 5%)	(M'sila)	[69]
γ -terpinène (25,70 %) Thymol (20,83 %) P-cymène (20,04 %)	(Djelfa)	[70]
Carvacrol (55,1%) γ -terpinène (12.6%) P- cymène (9,2%) Linalool (3,8%)	(Ain Defla)	[71]
Linalool (82, 88%) Thymol (4,92%)	(Blida)	[72]

La composition chimique de l'huile essentielle de l'espèce *Thymus vulgaris* et dans différentes régions dans le monde dans tableau (I.9).

Tableau I. 9: La composition chimique d'huile *Thymus vulgaris* dans le monde.

Les composés	Les pays						
	France [73]	Maroc [74]	USA [75]	Pologne [76]	Mexique [77]	Espagne [78]	Arabie Saoudite [79]
Thymol	55-36%	42,01%	46,21 %	85%	16,6%	-	54,26%
P-cymène	28-15%	14,34%	9,91%	6,0%	-	4,08%	6,18%
γ-terpinène	10-5%	12,06 %	14,08%	-	-	-	-
Linalool	6,5-4%	-	3,99%	21%	-	39,21%	7,61%
Carvacrol		5,07%				-	
Camphene					6.9%	-	
Mycrcène						6,31%	
Carvacrol méthyléther					9,6%		
Bornéole					28,4%		

Propriétés de composés majoritaire d'huile de *Thymus Vulgaris*

- **Le thymol** est un phénol contenu dans la composition chimique de plusieurs plantes. Il se présente sous forme de cristaux incolores avec une odeur aromatique caractéristique. Il est très utilisé pour ces activités antiseptiques, anti bactériennes, anti fongicide et anti inflammatoires [80] [81].
- **Le limonène** est un hydrocarbure des monoterpènes. C'est une molécule chirale qui existe sous deux formes énantiomères : (R) (+) -limonène et le (S) (-) -limonène, l'une donne le parfum du citron et l'autre celui de l'orange. Il possède une activité anticancéreuse à la fois in vitro et in vivo [82] [83].
- **Le Terpinolène** est également connu sous le nom de δ-terpinène, tous les terpinène ont la même formule moléculaire, le même poids moléculaire, mais ils diffèrent par les positions des doubles liaisons carbone-carbone. Le terpinolène est un sédatif [84] qui peut également être utile dans le traitement du cancer si les patients ont des difficultés à dormir, éventuellement en conjonction avec d'autres terpènes.
- **Le Carvacrol** (2-méthyl-5-(1-méthyléthyl) -phénol) est un phénol monoterpénique, isomère du thymol, présent dans de nombreuses plantes aromatiques dont *Origanum dictamnus* (dittany de Crète), est utilisé comme désinfectant, conservateur alimentaire, fongicide et parfum dans les formulations cosmétiques [85].

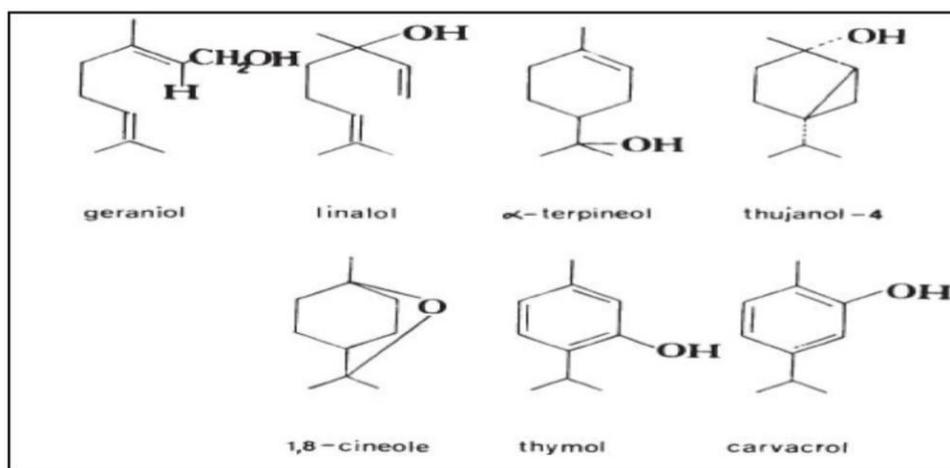


Figure I. 5: Les composés phénoliques dans l'HE de *Thymus vulgaris* [86].

II.4 Activités biologiques de *Thymus Vulgaris*

II.4.1 Activité antibactérienne

L'huile essentielle de *Thymus vulgaris* a exhibé une activité antibactérienne remarquable pour différentes souches bactériennes. Elle inhibait la croissance de diverses espèces gram-positives et gram-négatives dont *Salmonella Enteritidis* ; *Salmonella Typhimurium* ; *Escherichia coli* O157 :H7 ; *Escherichia coli* ; *Listeria monocytogenes* ; *Yersinia enterocolitica* ; *Shigella flexneri* ; *Shigella sonnei* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition allant de 19,6 à 45,0 mm [86].

Les résultats d'une étude montrent qu'huile de *Thymus vulgaris* présente une propriété antibactérienne significative vis-à-vis la souche bactérienne *Streptococcus sanguinis* car la zones d'inhibition enregistrée est plus élevée plus élevée que celle obtenue pour la chlorhexidine à n'importe quelle concentration, la CMI faible permet l'utiliser d'huile essentielle de *Thymus vulgaris* comme produit de santé bucco-dentaire, alternative naturelle à la chlorhexidine [87].

II.4.2 Activité antivirale

Les huiles essentielles ont la particularité de pouvoir pénétrer dans l'enveloppe des virus, Contenant des lipides. Elles sont donc plus actives sur les virus enveloppés car ils sont plus Fragiles que les virus nus. Les Herpès simplex virus sont des virus enveloppés, Le thymol et le carvacrol ont ainsi été testés contre l'activité de HSV-1. Les composés Ont été incubés avec le virus à chaque stade de l'infection virale : phase d'absorption, de Pénétration et de réplication. La présence des composés n'a pas réduit l'infectivité du virus. Cependant, le traitement du virus avec du thymol ou du carvacrol avant l'infection cellulaire a eu un effet significatif avec une

diminution des niveaux de la plaque de 89 % et 80 % respectivement. Le thymol, qui diminue le titre du virus de 92 %, présente l'activité antivirale la plus Puissante. La suppression du groupement méthyle en para de l'isopropyle ne semble pas Affecter l'activité inhibitrice. Il en est de même pour le groupement isopropyle. Cependant, la Suppression du groupement hydroxyle réduit significativement l'activité antivirale.

Enfin, l'effet Anti-herpès diminue avec une polarité décroissante du groupe de substituants dans l'ordre $-OH > -NH_2 > -CH_3 > -H$ [88].

II.4.3 Activité antifongique

Les résultats de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* sur milieu PDA indiquent que celles-ci exercent une forte action inhibitrice sur la croissance mycélienne radiale d'*Aspergillus flavus*, de *Fusarium sp*, et de *Penicillium digitatum*. Toutefois, l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* expose un pouvoir inhibiteur très important en comparaison à celui, elle a provoqué une inhibition de la croissance des trois champignons à partir de 125 µl/ml [89].

Des recherches rapportent que le thymol et le carvacrol contrôlent la croissance mycélienne en causant des troubles de l'activité vitale des parois cellulaires fongiques. Les composés phénoliques par leur nature chimique agissent au niveau de la membrane et sur les enzymes incorporés à la membrane. Ils se lient aux protéines membranaires et font augmenter la perméabilité de la membrane d'une part et d'autre part ils sont responsables de l'inactivation d'enzymes.

Chapitre II

Activité antibactérienne et effet de synergie

I. L'activité antibactérienne et la résistance bactérienne

I.1 Historique des antibiotiques

Paul Gerhard découvre l'activité antibactérienne des sulfamides synthétiques Domagk dans les années 1930 a été un événement important dans l'histoire des antibiotiques.

Ces produits sont donc les premiers antibiotiques de synthèse à être utilisés en clinique depuis 1936. Cependant, la véritable naissance de l'âge des antibiotiques a été marquée par cette découverte Alexander Fleming acquiert la pénicilline, un antibiotique naturel, en 1929 Via des moisissures du genre *Penicillium*. Cependant, Fleming n'a pas été en mesure de générer Des quantités considérables n'ont pas non plus élucidé la structure de ce composé, il faudra donc attendre jusqu'à ce que 1945 pour mettre cette bêtalactamine à la disposition du grand public [90].

Cet événement a ouvert la voie à l'identification de plusieurs autres classes Antibiotiques d'origine naturelle, dont les phénols, les tétracyclines, Aminoglycosides, macrolides, streptomycine, céphalosporines, et enfin Les carbapénèmes à la fin des années 1970. Dans les années 1980, une autre substance découverte de l'antibiotique naturel daptomycine, produit par *Streptomyces roseospora*, avec une activité spécifique contre les bactéries Gram positif. Il est en vente depuis les années 2000 [91].

I.2 Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent agir contre les bactéries par deux actions :

L'action bactériostatique qui empêche la croissance des bactéries et l'action bactéricide qui détruit les bactéries en ciblant leur paroi, leur ADN, leur membrane cytoplasmique et leur synthèse de protéines [92].

I.2.1 Action sur la paroi bactérienne

Les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi agissent sur des cibles extérieures de la cellule et ne sont actifs que sur les germes en croissance. Ils n'affectent pas les cellules au repos. Ils bloquent la synthèse du peptidoglycane, ce qui conduit à l'allongement de la cellule, qui finit par éclater en raison de la pression osmotique interne. Les β -lactamines utilisent ce mode d'action [92].

I.2.2 Action sur la membrane cytoplasmique

Ce mode d'action cible les membranes lipidiques en commençant par la membrane externe avant d'attaquer la membrane cytoplasmique. Une fois fixé, l'antibiotique perturbe la structure de ces membranes, les rendant perméables et entraînant ainsi une mort rapide de la bactérie [92].

I.2.3 Action Sur l'ARN des ribosomes

Dans ce mode, les antibiotiques sont efficaces contre les infections bactériennes en bloquant la synthèse de protéines. Leur action consiste à se fixer sur la sous-unité 30S, induisant des erreurs de lecture à des concentrations subthérapeutiques, et en inhibant l'élongation de la chaîne peptidique à des doses thérapeutiques. De plus, ils abaissent la concentration d'AMP cyclique intracellulaire, perturbant ainsi la barrière de perméabilité de la membrane cytoplasmique et provoquant une fuite des constituants intracellulaires vers l'extérieur. Les aminosides et les phénicoles agissent de cette manière [92].

I.2.4 Action sur l'ADN bactérienne

En inhibant la synthèse ou même le fonctionnement des acides nucléiques de différentes façons selon les familles d'antibiotiques soit par :

- Inhibition de la réplication de l'ADN.
- Inhibition de la transcription / ARN polymérase.
- Diminution de la synthèse des précurseurs nucléotidiques [93].

I.2.5 Les antibiotiques inhibiteurs du métabolisme intermédiaire

Par inactivation d'enzymes impliqués dans la synthèse des purines et de certains acides aminés essentiels [94].

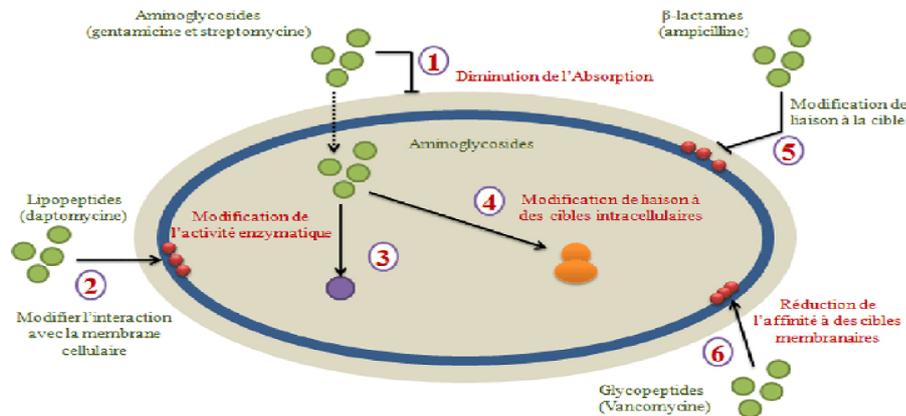


Figure II. 1: Mode d'action des antibiotiques.

I.3 Résistance des bactéries

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelle et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques [95].

I.3.1 Résistante naturelle

Il s'agit d'une résistance intrinsèque qui est présente dans une population et qui est principalement due à des gènes spécifiques [96]. Cette résistance se manifeste par des modifications structurales de la membrane externe chez les bactéries Gram-négatives, ou par des modifications métaboliques chez le bacille de la tuberculose qui le rendent insensible à de nombreux antibiotiques. Les gènes de résistance peuvent être exprimés de manière constante ou induite, en réponse à un signal enzymatique résultant de l'échappement au traitement antibiotique [97].

Comme c'est le cas des mycoplasmes, naturellement résistantes aux β -lactames, inhibant la synthèse des peptidoglycanes [98].

I.3.2 La résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes. La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux

mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine [99]. Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées [100].

La transmission de matériel génétique mobile, tel que les plasmides et les transposons, facilite l'acquisition de résistances par les bactéries. Ce processus peut être effectué par transduction, conjugaison ou transformation (voir **figure II.2**).

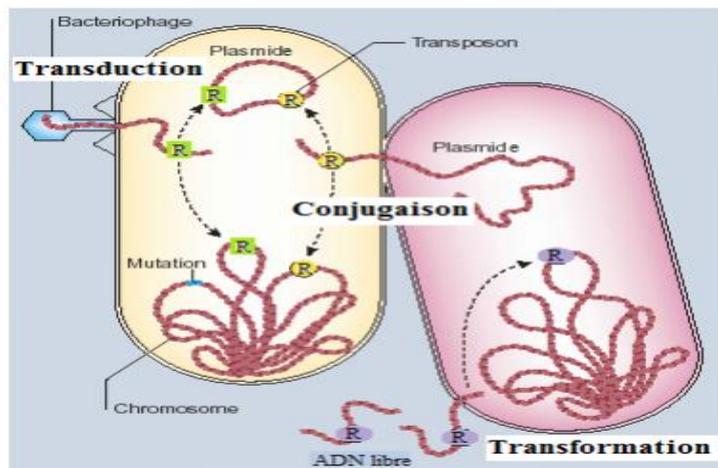


Figure II. 2: Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries [101].

I.4 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes [102]. Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes, et ils sont classés en plusieurs voies. Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents.

I.4.1 Inhibition d'antibiotiques

Certaines bactéries sont capables de produire des enzymes qui ont pour fonction d'inhiber l'action des antibiotiques en altérant leur structure chimique. Cette altération peut prendre différentes formes selon les réactions chimiques catalysées. Les enzymes produites par les bactéries peuvent inactiver certains antibiotiques tels que les aminoglycosides, le chloramphénicol, les streptogramines, les macrolides et les rifampicines, ou encore réduire leur affinité avec leurs cibles [103].

Les enzymes qui réalisent le blocage et/ou la dégradation des antibiotiques sont diverses. Par exemple, la β -lactamase est une métalloenzyme (possédant le zinc comme cofacteur) détruisant les antibiotiques de la famille des β -lactamines [104].

I.4.2 Modification des cibles des antibiotiques

Certaines souches pathogènes telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* et *Shigella dysenteriae* modifient l'affinité des protéines de liaison à la pénicilline (penicillin-binding proteins, PBP), ce qui leur permet de résister à des antibiotiques de la famille des β lactamines (les antibiotiques qui ciblent spécifiquement les enzymes de synthèse de la paroi bactérienne) [105].

En plus de la modification enzymatique, certaines souches pathogènes mobilisent le positionnement de leurs organites pour échapper à l'action des antibiotiques.

Par exemple, les ARN ribosomiques de méthylation (ARNr méthylase) peuvent, suite à des mutations chromosomiques, modifier l'emplacement topologique des ARNr 16S, privilégiant ainsi ces complexes face à l'action des antibiotiques de la famille des aminoglycosides [106].

I.4.3 L'efflux membranaire bactérien

Les bactéries peuvent avoir recours à un système d'efflux actif pour diminuer la concentration intracellulaire en antibiotique. Ces pompes permettent de rejeter dans le milieu extérieur les antibiotiques ayant pu pénétrer dans la cellule afin qu'ils n'atteignent pas une concentration létale pour la bactérie. Elles ont été observées pour la première fois dans un cadre de résistance à la tétracycline, à la fin des années 1970, chez *E. coli* [107]. La plupart de ces systèmes ne sont pas « antibio-spécifiques » et peuvent effluer un grand nombre de classes d'antibiotiques (ou d'autres molécules), ce qui fait qu'une bactérie possédant un système d'efflux est souvent multi-résistante [108]. Il existe cinq types de pompes d'efflux qui vont notamment se différencier par l'énergie fournie ainsi que le type de molécules effluées.

I.4.4 Bases génétiques de la résistance

La résistance, qu'elle soit innée ou acquise, repose sur la présence d'allèles spécifiques dans le pool génétique d'une souche bactérienne. Cette diversité génétique est le résultat de deux phénomènes majeurs : les mutations chromosomiques et, dans certains cas, les hyper-

mutations, ainsi que le transfert horizontal de gènes entre différentes espèces bactériennes de nature distincte [109].

• **Mutations chromosomiques**

Des mutations chromosomiques peuvent survenir spontanément lors de la réplication de l'ADN en l'absence d'un système de réparation fonctionnel, ce qui peut entraîner des altérations biochimiques des protéines. Un exemple bien étudié de ce type de mutation concerne *Escherichia coli*, où une mutation dans le gène *gyrA* peut conduire à une résistance accrue. De même, chez *Pseudomonas aeruginosa*, une mutation du gène *mexR* peut entraîner la répression de l'opéron *mexAB-oprM*, ce qui confère une multirésistance à cette souche pathogène [110].

• **Hypermuation**

L'hypermuation est un phénomène génétique transitoire observé chez certaines souches bactériennes, telles que *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Helicobacter pylori*. Ce phénomène se caractérise par un taux de mutation très élevé, qui peut permettre à la bactérie de développer une résistance aux antibiotiques ou de lutter contre d'autres agents pathogènes. En effet, certaines souches bactériennes utilisent cette stratégie pour augmenter leur capacité de survie face à des conditions environnementales difficiles ou pour améliorer leur compétitivité.

• **Transfert des gènes**

Les espèces microbiennes partagent des éléments génétiques entre elles d'une manière perpétuelle. Cet échange est appelé transfert horizontal du matériel génétique. Ce transfert est généralement réalisé grâce à trois phénomènes essentiels :

- la transduction : le transfert des gènes via les bactériophages ;
- la transformation : l'incorporation par une bactérie des fragments d'ADN libérés par d'autres bactéries ;
- la conjugaison : le transfert des fragments via des plasmides conjugatifs [111].

I.5 Mécanismes d'action antibactérienne des huiles essentielles

Le mode d'action des huiles essentielles dépend en premier lieu du type et des caractéristiques actifs, en particulier leur propriété hydrophobe qui leur permet de pénétrer dans la double couche phospholipidique de la membrane de la cellule bactérienne ce qui entraîne :

- L'augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaire.
- L'acidification de l'intérieur de la bactérie, bloquant ainsi la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- L'inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN des protéines et des polysaccharides [112].

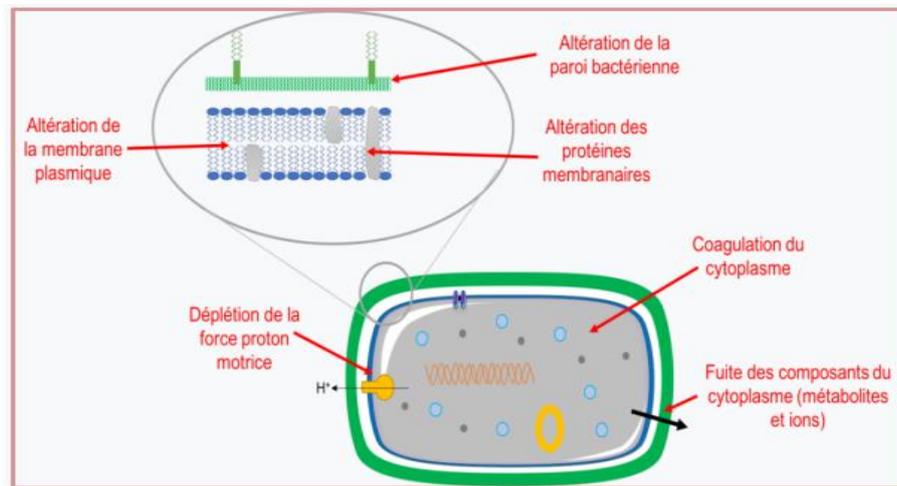


Figure II. 3: Mode d'action des huiles essentielles [113].

I.5.1 Action sur la membrane cellulaire

L'effet des composants des huiles essentielles sur les membranes cellulaires est le résultat de divers mécanismes d'action [114]. En raison de leur caractère lipophile, ces molécules peuvent facilement pénétrer la double couche phospholipidique et s'insérer entre les phospholipides, conduisant ainsi à des altérations de la configuration membranaire et perturbant le transport des nutriments à travers la membrane. L'effet de dysrégulation peut également être observé au niveau du gradient ionique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique [115].

Toutefois, certaines souches bactériennes ont développé des pompes ioniques pour contrecarrer ces effets indésirables [115].

I.5.2 Action sur les acides gras membranaires

Le métabolisme lipidique chez les bactéries constitue une voie prometteuse pour développer de nouvelles molécules antimicrobiennes [116]. Les HE, grâce à leur caractère hydrophobe, constituent de véritables candidats qui pourraient affecter la biosynthèse des lipides, ainsi les acides gras insaturés, et En modifiant la structure de la membrane cellulaire [117]. En effet, la présence des HE dans la cellule bactérienne, même à des concentrations inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI), diminue le taux des acides gras insaturés qui sont généralement responsables de la fluidité membranaire. Avec des perturbations

au niveau de l'enveloppe externe de la cellule sont légères, traduisant aussi des modifications structurales de la membrane. Par exemple, le thymol, le carvacrol et l'eugénol (composés phénoliques majoritaires de plusieurs HE) peuvent augmenter la quantité d'acide gras saturé en C16 et en C18 et diminuer la quantité d'acides gras insaturés en C18 [118].

I.5.3 Action sur les protéines

Les différentes substances actives présent dans les huiles essentielles peuvent interagir avec les protéines présentes dans les bactéries et ainsi influencer la division cellulaire. Par exemple, le cinnamaldéhyde est capable de stopper la séparation des cellules chez *Bacillus cereus*. Ce composant agit en inhibant l'assemblage du complexe FtsZ présent sur les sites de division cellulaire chez les procaryotes. De plus, il altère la morphologie des anneaux-Z et entrave la polymérisation des FtsZ de manière dépendante du GTP [119].

II. L'effet synergique

II.1 Définition

La synergie entre les HES et les ATBS a été rapportée dans plusieurs études, c'est une interaction positive créée quand l'association des deux agents, provoquent un effet inhibiteur supérieur à la somme de leurs effets individuel [120], Cette association est employée pour augmenter le spectre d'activité antimicrobienne, empêche l'apparition des mutants résistants et pour augmenter la vitesse de l'effet bactéricide [121].

L'association entre deux agents ne sera pas systématiquement synergique, il existe quatre types d'interaction [122].

Synergique : Qui correspond à une association dont l'effet de cette association est supérieur à la somme des effets de chacun seul à la même concentration [122].

$$\text{Effet [A+B]} > \text{Effet [A]} + \text{Effet [B]}$$

Additive : Qui correspond à une association dont l'effet est égal à la somme des effets de chacun seul à la même concentration [122].

$$\text{Effet [A+B]} = \text{Effet [A]} + \text{Effet [B]}$$

Indifférente : qui correspond à une association dont l'effet est égal à celui le plus efficace à la même concentration [122].

$$\text{Effet [A+B]} = \text{Effet [A]} \text{ ou Effet [B]}$$

Antagoniste : qui correspond à une association dont l'effet est inférieur à la somme des effets de chacun seul à la même concentration [122].

$$\text{Effet}[A+B] < \text{Effet}[A] + \text{Effet}[B]$$

II.2 Études antérieures sur l'effet de combinaison de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* et d'autres huiles

On teste actuellement une possible synergie entre les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles d'*Eucalyptus globulus* et d'*Origanum vulgare*. Cette combinaison est testée sur huit souches de SARM afin de déterminer son efficacité [36].

Des activités antibactériennes significatives sont obtenues en combinant ces deux huiles par le volume 5µl /5µl, et les Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de la combinaison sont déterminés dans ce tableau (II.1) [36].

Tableau II. 1: Diamètres des zones d'inhibition (mm) de la combinaison d'huile essentielle *Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* contre les SARM.

Souches bactériennes	HE d' <i>E.globulus</i> (5µl)	HE d' <i>O.vulgare</i> (5µl)	Combinaison des HE d' <i>E.globulus</i> et <i>O.vulgare</i> 5µl /5µl	Effet de synergie
SARM 45	08.0±0.0	51.0±1.41	60.5±0.70	Synergie
SARM 48	10.0±1.41	30.0±0.0	42.0±1.41	Synergie
SARM 47	0.0±0.0	25.5±0.70	31.0±0.0	Synergie
SARM 40	0.0±0.0	26.0±1.41	34.5±0.70	Synergie
SARM 05	08.0±0.0	31.5±0.70	41.0±0.0	Synergie
SARM 41	08.0±0.0	30.0±0.0	42.5±0.70	Synergie
SARM 59	12.0±0.0	53.5±0.70	66.5±0.70	Synergie
SARM 23	10.0±1.41	46.6±1.41	59.5±0.70	Synergie

Une autre étude, ils ont fait la combinaison entre *Eucalyptus globulus* et *Thymus mastichina* montrent qu'il y a des effets synergiques contre les souches de *S. aureus*, avec des FICI de 0.313 et de 0.5 respectivement [123].

En outre, le mélange d'huile de l'*Eucalyptus globulus* avec l'huile essentielle de cannelle a montré un effet synergique contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et les souches de *Salmonella* dont les diamètres d'inhibitions varient de 10 mm à 25 mm, de 29 mm à 30 mm et de 23 mm à 24 mm respectivement [124].

Par ailleurs, L'étude de la combinaison de trois huiles essentielles, l'*Eucalyptus globulus* avec le Cannelle et la Réglisse, réalisée par les mêmes auteurs, a démontré également des effets

synergiques contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* avec des diamètres d'inhibitions variant de 20 mm à 21 mm, de 30 mm à 35 mm et de 20 mm à 23 mm respectivement [124].

En fin, l'étude de la combinaison de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* avec la Réglisse a montré un effet synergique contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Salmonella* avec des diamètres d'inhibition variant de 8 mm à 35 mm [124].

II.3 Effets de combinaison de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* avec des antibiotiques

Un effet synergique relativement élevé a été distingué pour les huit SARM testées en combinant l'oxacilline et l'huile essentielle *Eucalyptus globulus*, avec des zones d'inhibitions allant de 18.5 ± 0.70 à 22.5 ± 0.70 mm [125].

En outre, la combinaison des composés majoritaires de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* tels que le 1,8-cinéol et le linalol avec les antibiotiques a été étudiée [126]. Les combinaisons binaires comprenant du linalol avec de l'oxacilline, de l'amoxicilline, de la gentamicine, de la ciprofloxacine ou de la tétracycline ont démontré des effets synergiques contre *S. aureus* et *S. epidermidis* avec une réduction allant de 4 à 25 fois dans les CMI des antibiotiques, ainsi que sur deux souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline avec une diminution des CMI de 4 à 32 fois. Les mêmes effets ont été observés par la combinaison linalol/tétracycline, contre *P. aeruginosa* et *E. coli*, avec la réduction des CMI de la tétracycline 8 fois et 250 fois respectivement.

Par ailleurs, l'étude concernant la combinaison du 1,8-cinéole avec la mupirocine a révélé une activité synergique contre les souches MRSAMupS et MRSAMupRL avec un de FICI de 0.28 à 0,44 [125].

Lorsque le 1,8-cinéole était associé à l'AMC (amoxicilline/acide clavulanique), une action synergique totale a été observée, entraînant une réduction de 4 fois de la CMI de l'antibiotique [125].

La combinaison de la gentamicine avec le 1,8-cinéole a entraîné un effet synergique complet contre la souche MRSA, avec une diminution de la CMI de 4 fois, tandis qu'une synergie partielle a été observée pour les deux autres souches. De nombreuses études ont

confirmé que les huiles essentielles associées aux antibiotiques présentent un effet synergique contre les micro-organismes [125].

Dans une étude comparative entre l'utilisation de l'AMC (amoxicilline/acide clavulanique) seul et en association avec le 1,8-cinéole puis avec la gentamicine, les résultats obtenus ont permis l'observation d'un effet synergique total contre *S. aureus*, lorsque le 1,8-cinéole est combiné à l'AMC [125].

Cette étude a été effectuée in vivo en utilisant un modèle expérimental d'ostéomyélite à *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) chez le lapin. Une réduction significative a été notée dans le nombre de colonies dans la moelle osseuse, lorsque les lapins étaient traités avec l'AMC associée au 1,8-cinéole ou à la gentamicine, par rapport aux lapins traités avec l'AMC, la gentamicine ou le 1,8-cinéole seul. Ces résultats ont démontré que le 1,8-cinéole présentait un effet synergique en combinaison avec l'AMC et la gentamicine, qui offrent des possibilités de réduction de l'utilisation d'antibiotiques. Aussi, l'AMC associée au 1,8-cinéole pourrait être utilisée pour traiter l'ostéomyélite à SARM [125].

De plus, Remmal et Akhmouch, ont montré que l'utilisation du 1,8-cinéole améliore l'efficacité de l'amoxicilline, car sa présence conduit à la formation de complexes stables d'amoxicilline contenant au moins trois molécules d'amoxicilline qui protègent l'antibiotique contre l'action des β -lactamases dans les bactéries résistantes. En outre, le 1,8-cinéole perturbe la membrane cellulaire ou affecte la respiration cellulaire, permettant ainsi à l'association avec des antibiotiques d'agir simultanément sur différents sites cibles et améliorant les résultats observés par rapport à l'effet antibiotique seul.

Enfin, ces résultats indiquent que cette combinaison renforce efficacement l'action antimicrobienne des antibiotiques et suggèrent ainsi une approche prometteuse pour développer de nouveaux médicaments contre les infections microbiennes.

II.4 Études antérieures sur l'effet de combinaison de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* et d'autres huiles

D'autre part, l'étude synergique des huiles essentielles *Cuminum cyminum* et *Thymus vulgaris* a été évaluée une activité antibactérienne contre deux bactéries Gram-positives (*Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*) et deux bactéries Gram-négatives (*Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*).

Les principaux composants de ces huiles essentielles étaient le thymol (64,45 %) pour *Thymus vulgaris* et le cuminaldéhyde (29,02 %) pour *Cuminum Cyminum*. Les résultats ont montré que ces huiles essentielles avaient une activité inhibitrice efficace contre la croissance bactérienne, en particulier contre *B.cereus*, avec des diamètres de zone d'inhibition allant jusqu'à 30 et 21 mm pour *Thymus vulgaris* et *Cuminum Cyminum*, respectivement, dans la méthode de diffusion sur disque de gélose. Ces résultats suggèrent que la possibilité d'utiliser ces huiles essentielles comme composés antimicrobiens appropriés et comme alternatives aux conservateurs chimiques dans l'industrie alimentaire [127].

II.5 Effets de combinaison des composés de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec des antibiotiques

Une étude qui vise à vérifier, in vitro, les mesures d'utilisation de l'amoxicilline ou de thymol qui induit la sélection de bactéries résistantes d'*E. coli* et à évaluer in vivo leurs effets sur le développement de la résistance antimicrobienne dans la flore intestinale des volailles [128]. Dans l'étude in vitro, la souche *E. coli* a été sous-cultivée sur des plaques de gélose contenant des concentrations croissantes d'amoxicilline ou de thymol. Ensuite, les concentrations minimales d'inhibition (CMI) de thymol, de l'amoxicilline et de deux autres antibiotiques, la tylosine et la colistine, ont été déterminées à l'aide de la méthode de micro dilution. Tandis que, dans l'étude in vivo, des groupes de poussins ont été soumis à un régime de 2 semaines d'amoxicilline ou de thymol ajouté à leur eau de boisson.

Le test in vitro a permis d'enregistrer pour *E. coli*, qui avait été sous-cultivé en série sur des concentrations croissantes d'amoxicilline, une augmentation de 32 fois de la CMI des valeurs pour l'amoxicilline et une augmentation de 4 fois pour la colistine et la tylosine. Cependant, la CMI du thymol pour cette souche est restée constante. Pour les *E. coli*, qui avaient été repiqués en série sur des concentrations croissantes de thymol, aucun changement dans les valeurs de CMI pour des antibiotiques et du thymol ont été observés. Le test in vivo a confirmé celui in vitro. Elle a démontré que l'exposition à l'amoxicilline induit une sélection de résistance antimicrobienne dans le TAMF et l'*E. coli* intestinal, alors que l'exposition au thymol ne l'a pas fait. Les résultats ont montré que le groupe recevant du thymol avait un indice de consommation plus faible par rapport aux autres groupes. "Cette étude démontre la faisabilité de ce produit naturel comme solution alternative à l'utilisation actuelle des antibiotiques en aviculture [128].

III. Résistante bactérienne des souches étudier

III.1 *Escherichia coli*

Elle a été isolée pour la première fois par Escherichi en 1885. Elle est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes [129].

Escherichia coli est un bacille à gram négatif, radio résistant de la famille des Enterobacteriaceae, asporulé. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 µm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes [130]. Il peut se déplacer au moyen de flagelles péritriches comme il peut être immobile.

Escherichia coli est une bactérie qui se retrouve fréquemment dans le colon humain, où elle est en grande quantité, mais qui a beaucoup de difficultés à survivre dans l'environnement. Cette bactérie peut causer diverses infections, telles que la diarrhée du voyageur, qui est provoquée par la contamination de l'eau ou de la nourriture par les matières fécales des personnes malades ou porteuses. Elle est également la principale cause des infections urinaires. Par ailleurs, *E. coli* peut également causer des infections pulmonaires chez les patients gravement malades qui sont souvent colonisés au niveau des voies respiratoires supérieures.

Escherichia coli résiste aux plusieurs familles d'antibiotiques par différents mécanismes acquis sont Les Céphalosporines (Céfalexine : C1G, C2G, C3G et C4G) et β-lactamines et les Aminoglycosides et Les Quinolones (Acide Nalidixique) et Les Fluoroquinolones (Ciprofloxacine et Enrofloxacin), Les tétracyclines, les mécanismes de β-lactamines et les Aminoglycosides et sont mentionnés dans le tableau (II.2).

Tableau II. 2: Les différents mécanismes de résistance acquise d'*Escherichia coli* aux antibiotiques [131].

Familles des antibiotiques	Mécanisme de résistance	Référence
β-lactamines	La résistance d' <i>Escherichia coli</i> aux β-lactamines est médiée par des enzymes nommées les βlactamases qui sont classées selon leurs propriétés fonctionnelles et structurelles en différents groupes et sous-groupes.	[132]
Les Aminoglycosides (Streptomycine, Kanamycine, Gentamicine, Néomycine, Amikacine)	Modification enzymatiques dès l'ATBs par la production des enzymes (denyltransferases et Nucleotidyltransferases(ANT/AAD), Acetyltransferases(AAC)et Phosphotransférases (APH) qui vont provoquer l'inactivation de l'ATBs cible.	

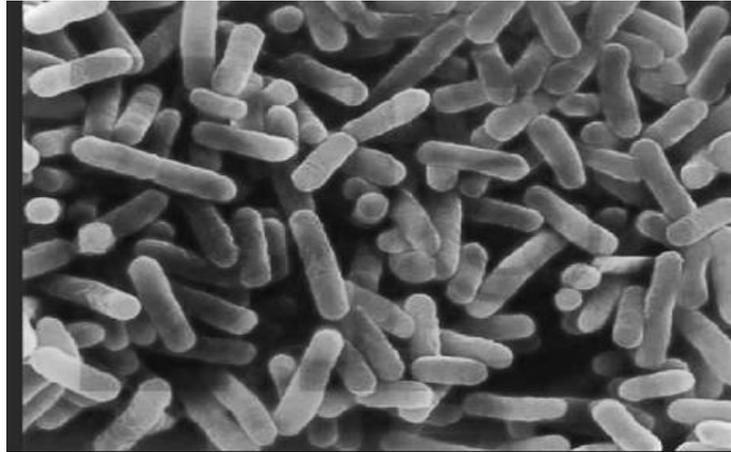


Figure II. 4: *Escherichia coli* au microscope [133].

III.2 *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques ont été identifiés pour la première fois en 1878 par Koch en Allemagne dans le pus d'abcès. Le terme *Staphylococcus* a été introduit en 1883 par Ogston et vient de la combinaison des termes grecs Staphylê, qui signifie grappe de raisin, et Kokkos, qui signifie grain.

Les staphylocoques sont classés au sein de la famille Staphylococcaceae [134], qui abrite différents genres tels que *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macrococcus* et surtout, *Staphylococcus* [135]. Ce genre contient actuellement 53 espèces et sous-espèces, mais leur nombre n'a cessé d'augmenter durant les 20 dernières années, occasionnant une révision de la classification du genre [136].

Le *Staphylococcus aureus* est une bactérie qui se présente sous la forme d'un coque Gram positif de 0,7 à 1,2 micromètre de diamètre. Elle peut être isolée seule, en paires ou en grappes dans différents environnements liquides et solides. De nature aérobie ou anaérobie facultative, cette bactérie est considérée comme une mésophile, sa température optimale de croissance étant de 37 °C.

Ce pathogène provoque un large éventail d'infections cliniques, allant des infections courantes telles que les infections de la peau et des tissus mous à des infections meurtrières comme la septicémie, la pneumonie et les toxinoses, telles que le syndrome du choc toxique [137].

Staphylococcus aureus résiste aux plusieurs familles d'antibiotiques par différents mécanismes acquis sont Fluoroquinolones et Cyclines et Phénicolés, Acide fusidique,

Glycopeptides (vancomycine), ces mécanismes sont mentionnés dans le tableau (II.3) [138], [139].

Tableau II. 3: Mécanismes de résistances aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*.

Antibiotiques	Mécanisme de la résistance
β-lactamines	Les différentes réactions impliquées dans la synthèse de la paroi bactérienne (synthèse des peptidoglycanes) à savoir : les réactions de transglycosylations et transpeptidations via l'acétylation des enzymes impliquées dans ces deux réactions (transglycosylations et transpeptidations), qui sont nommées protéines liant les pénicillines (PLP)
La méticilline	Cette résistance est due à la présence des gènes nommées mecA qui sont localisés sur un élément génétique mobile (chromosome) appelé (SSCmec), le gène mecA code pour une enzyme de liaison à la pénicilline 2a (PBP2a) qui une transpeptidase qui catalyse l'assemblage des peptidoglycanes

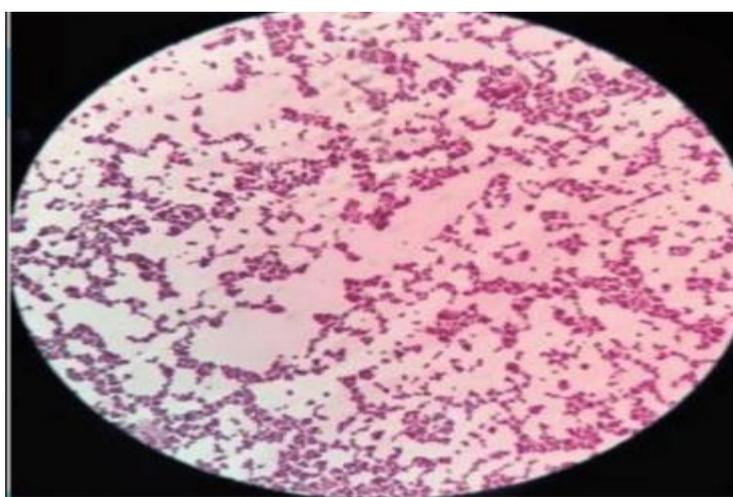


Figure II. 5: *Staphylococcus aureus* au microscope 100x [140].

III.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique ; du grec : puon : pus et kuanos : bleu foncé, elle est désignée sous le nom d'espèce *Pseudomonas aeruginosa* du latin : aeruginosa : couvert de rouille, le nom est lié à la pathogénéicité initiale, elle a été isolée en 1882 par Gessard dans le plus d'un pansement [133,134,135].

Le *Pseudomonas aeruginosa* est un type de bacille à Gram négatif qui mesure entre 1 et 3 μm de large. Il peut apparaître seul ou en groupes de courtes chaînettes et peut se déplacer grâce à un type de ciliature polaire monotriche. Bien qu'il ne soit pas capable de produire de spores ni de capsules, certaines souches peuvent former une pseudo-capsule appelée « slime » qui consiste en de l'alginate et peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de la bactérie [136,137].

Chez l'homme, *Pseudomonas aeruginosa* est l'agent du pus bleu des infections cutanées postchirurgicales de septicémies, d'endocardites... ; cette espèce est aussi pathogène opportuniste et elle constitue une cause majeure d'infections nosocomiales diverses chez des personnes fragilisées ou immunodéprimées (grands brûlés, cancéreux...) [138,139].

Pseudomonas aeruginosa résiste aux plusieurs familles d'antibiotiques par différents mécanismes acquis sont Les Céphalosporines (Céfalexine : C1G, C2G, C3G et C4G) et β -lactamines et les Aminoglycosides et Les Quinolones (Acide Nalidixique) et Les Fluoroquinolones (Ciprofloxacine et Enrofloxacine, les mécanismes de β -lactamines et aminosides : la tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la nétilmicine sont mentionnés dans le tableau (II.4).

Tableau II. 4: Mécanismes de résistances aux antibiotiques chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotiques	Mécanisme de la résistance	Référence
β-lactamines	Par production d'enzymes β-lactamases, qui catalysent de manière efficace et irréversible l'hydrolyse de la liaison amide du cycle β-lactame de ces antibiotiques, l'expulsion de ces antibiotiques par la surproduction d'un système d'efflux actif ou l'imperméabilité de la membrane causée par un déficit en porine OprD.	[140,141,142].
Aminosides: la tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la nétilmicine	Il s'agit notamment de la désactivation de ces antibiotiques par la famille des enzymes-modifiant les aminosides (AMEs) agissant sur des sites spécifiques de ces aminoglycosides et représentent le mécanisme majeur de résistance à cette famille d'antibiotique. D'autres mécanismes de résistance ont été décrits, incluant, la diminution de la perméabilité membranaire, l'altération structurale de la cible ribosomale, l'expulsion de l'antibiotique par les systèmes d'efflux ainsi que la méthylation du site de liaison des aminoglycosides.	[151].

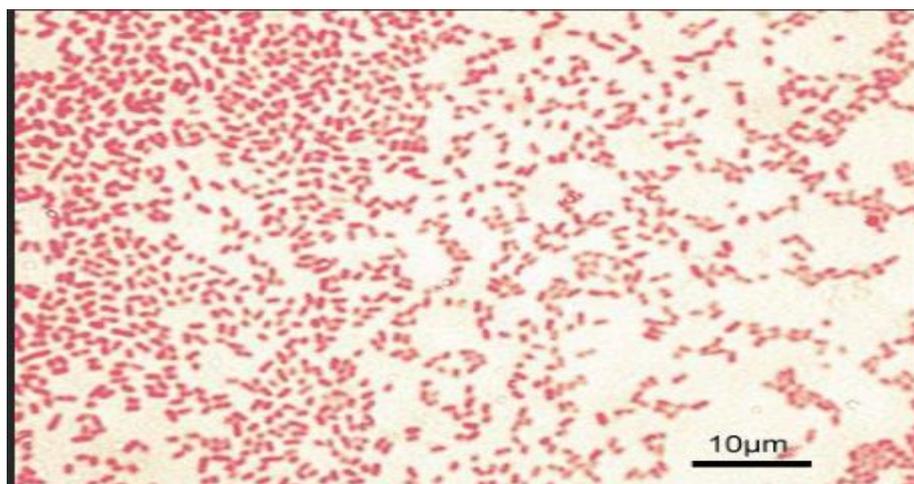


Figure II. 6: *Pseudomonas aeruginosa* au microscope.

Partie expérimentale

Description des travaux et Discussion de résultats

I. Description des travaux

I.1 Introduction

Cette étude a été réalisée au niveau de deux Laboratoire la partie chimique au niveau du laboratoire de l'université de Saad Dahleb Blida 1 et la partie biologique au niveau du laboratoire de Microbiologie de laboratoire d'hygiène de la wilaya de Blida.

Notre étude expérimentale concerne dans un premier temps l'extraction des huiles essentielles de deux plantes aromatiques et l'étude de leur activité antibactérienne puis dans un second temps l'étude de l'effet synergie entre ces deux huiles essentielles par deux méthodes différentes.

I.2 Matériel végétale

Dans ce travail, nous avons utilisés deux plantes aromatiques, et médicinales *l'Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*.

La première *l'Eucalyptus globulus* récoltés en mois du Mars 2023 et la deuxième en mois de juin 2022, les deux plantes ont été récolté région Menaceur à Tipaza.

Les feuilles de *l'Eucalyptus globulus* et les parties aériennes de *Thymus vulgaris* ont été séché dans un endroit sec pendant une semaine. Ensuite la matière végétale a été réduit en poudre, après conservés dans un endroit à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation pour l'extraction des huiles essentiels.



Figure III. 1: Les feuilles d'*Eucalyptus globulus*



Figure III. 2: Les parties aériennes de *Thymus vulgaris*

I.3 Matériel de laboratoire

L'ensemble du matériel utilisé est regroupé dans le tableau ci-dessous.

Tableau III. 1: Matériels utilisés.

Équipements et dispositifs	Balance analytique, chauffe-ballon, Clevenger, Autoclave, Incubateur microbiologique, becs bunsen, écouvillons.
Verreries	Ballon, bécher, port ballon, Pipettes pasteur, spatule, Boites pétris, tubes à vis, Pipettes pasteur, Eppendorf.
Milieux de Culture et Réactifs	L'eau physiologique, Muller Hinton, DMSO, disques en papier Wattman, L'eau distillée.

I.4 Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation

Dans ce travail, les huiles essentielles sont obtenues par la méthode d'hydrodistillation.

- **Conditions opératoires d'hydro distillation**

L'extraction des huiles essentielles est réalisée dans sa totalité à l'échelle du laboratoire sur un montage de type Clevenger. Ce montage se compose de quatre pallies principales :

- Le réacteur, un ballon dans lequel on introduit la matière végétale et l'eau.
- La colonne, un cylindre en verre placé au-dessus du réacteur qui recueille la phase vapeur.
- Le réfrigérant dans lequel se condensent les vapeurs.
- L'ampoule à décantation, où l'huile se récupère en deux phases, l'un est la phase organique (huile essentielle) et l'autre la phase aqueuse (hydrolat).

- **Protocole de l'extraction**

Le milieu réactionnel constitué par 160g de la matière végétale et 1300ml d'eau distillée dans un ballon de 2l est porté à ébullition grâce à un chauffe-ballon. Une fois, l'ébullition s'effectue les cellules éclatent et se commencent à dégager leur contenu en huiles essentielles, qui par la suite transportent avec le vapeur d'eau jusqu'à le réfrigérant.

Après condensation dans ce dernier l'huile se rassemble dans la partie de décantation.

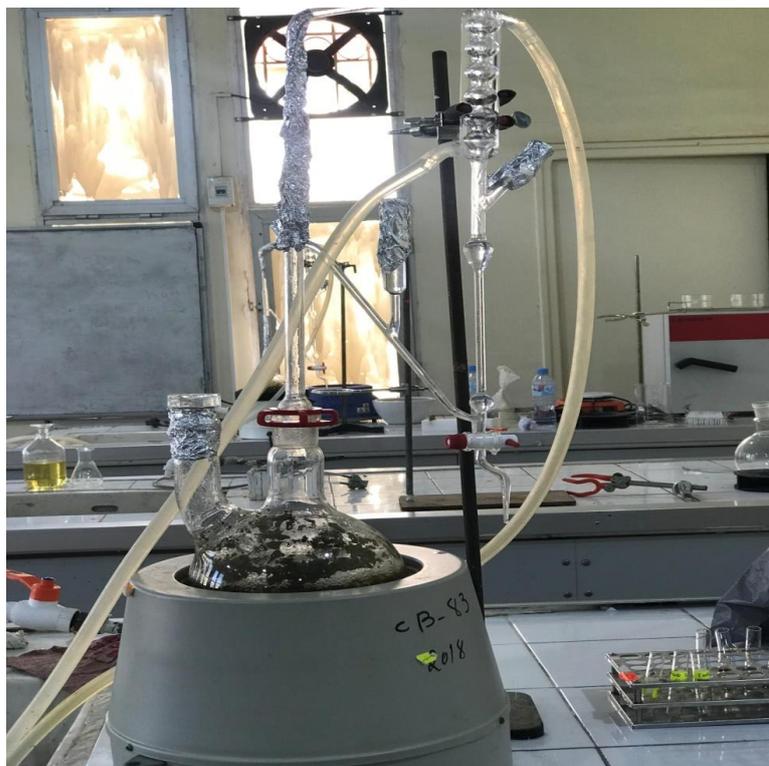


Figure III. 3: Montage d'hydrodistillation par Clevenger.

Après 3h de distillation l'huile essentielle obtenue est récupérée dans des flacons en verre fumé pesée, conservée dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation afin d'éviter sa dégradation.

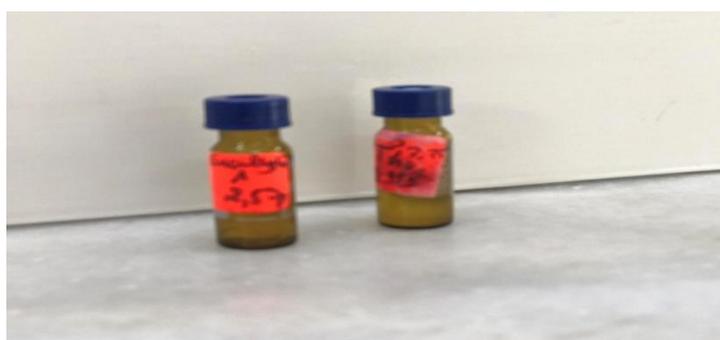


Figure III. 4: Les huiles obtenues de l'hydrodistillation.

I.5 Calcul du rendement

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière sèche de la plante, il est exprimé en pourcentage et est calculé par la formule suivante:

$$RHE = \frac{m_{HE}}{m_v} \times 100$$

RHE : Rendement en huile en %

mHE : Poids de l'huile en (g)

mv : Poids de la matière sèche de la plante en (g).

I.6 Évaluation de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée au niveau du Laboratoire d'hygiène de Blida, vis à-vis les trois souches bactériennes multirésistantes référentielles « *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa* ».

Tableau III. 2: Les souches bactériennes.

Les souches	Germe	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram +	ATCC6538
<i>Escherichia coli</i>	Gram -	ATCC 8739
<i>Pseudomonas aerginosa</i>	Gram-	Patients

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de deux plantes étudiées *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* a été effectuée en utilisant deux méthodes.

I.6.1 La méthode de diffusion sur disque

La méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé appliquée pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est celle décrite par Gulluce [152].

L'aromatogramme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des extraits végétaux [153]. Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir de la migration de l'huile essentielle ou de l'extrait aqueux par diffusion dans la gélose. Cette méthode permet la mise en évidence de l'effet antibactérien d'un extrait par la mesure du diamètre d'inhibition en millimètres autour d'un disque imprégné par un extrait. En fonction du diamètre d'inhibition nous pouvons classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes.

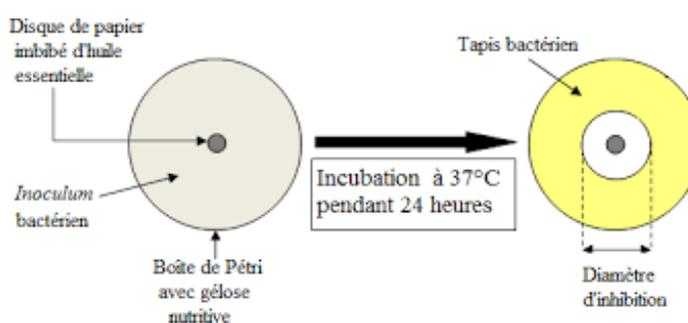


Figure III. 5: Méthode de diffusion sur disque.

I.6.2 La méthode de Microdilution en milieu liquide

La technique consiste à introduire l'inoculum dans une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. L'ensemble des tubes inoculés est incubé à la température optimale de la croissance du germe pendant 24 h. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la CMI de l'HE qui est le premier tube dépourvu de croissance bactérienne. Différentes techniques de dilution sont utilisées pour la détermination de la CMI, à savoir la macrodilution en milieu liquide [154,155] , et la microdilution en milieu liquide [156] et la microdilution en milieu solide [157] .

La CMI par définition correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne [158,159] (**Figure III.7**). Bien que cette méthode soit la plus utilisée parmi les chercheurs, sa définition diffère entre les publications, ce qui rend difficile la comparaison entre les études. Généralement, la CMI n'est pas bactéricide et les colonies bactériennes peuvent se développer après repiquage sur un milieu exempt d'inhibiteur.

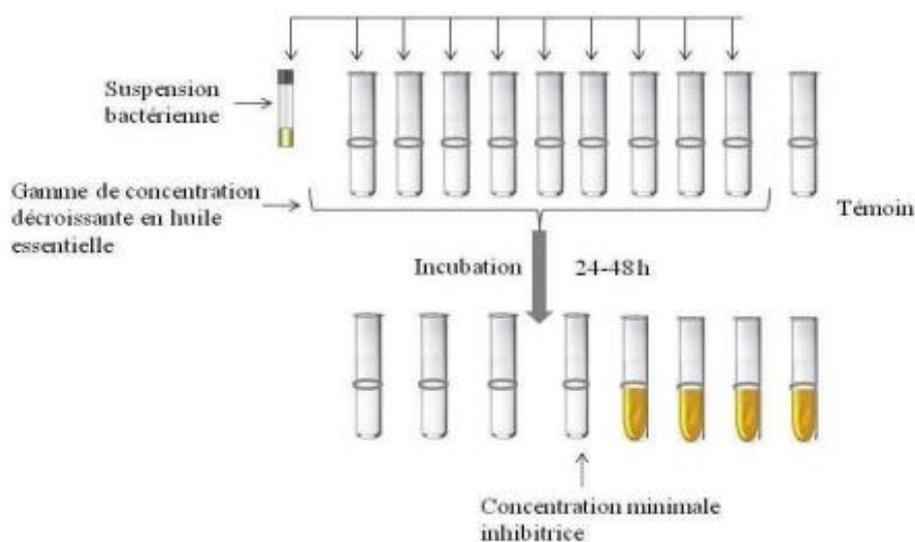


Figure III. 6: Méthode de détermination de la CMI en milieu liquide.

I.7 Protocole expérimentale de l'activité antibactérienne

I.7.1 Préparation des dilutions d'huile essentielle

Ce solvant organique est aprotique et polaire a été choisi pour son inactivité vis-à-vis les bactéries. Nous avons préparé une gamme de dilutions des deux huiles essentielles *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* dans le DMSO.

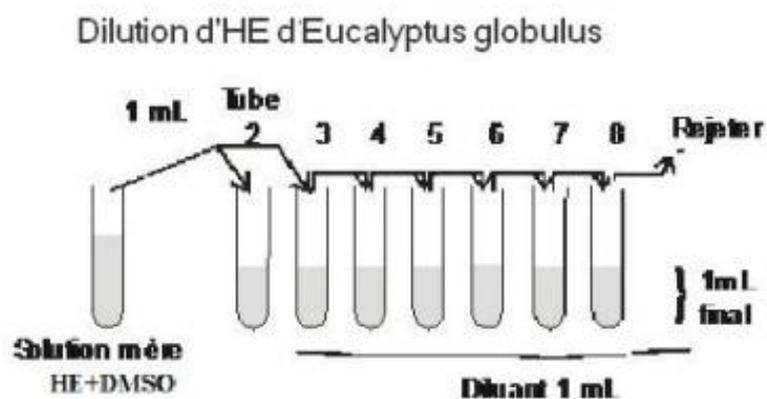


Figure III. 7: Dilution des huiles essentielles.

I.7.2 Préparation de Milieu de culture

Nous avons utilisé pour les bactéries, le milieu de Mueller Hinton (gélose riche en composés d'infusion de viande de bœuf, hydrolysate acide de caséine et amidon de maïs). La gélose Muller-Hinton (MH) est coulée en boîte de pétri sur épaisseur de 4 mm, les derniers sont préséchés avant l'emploi.

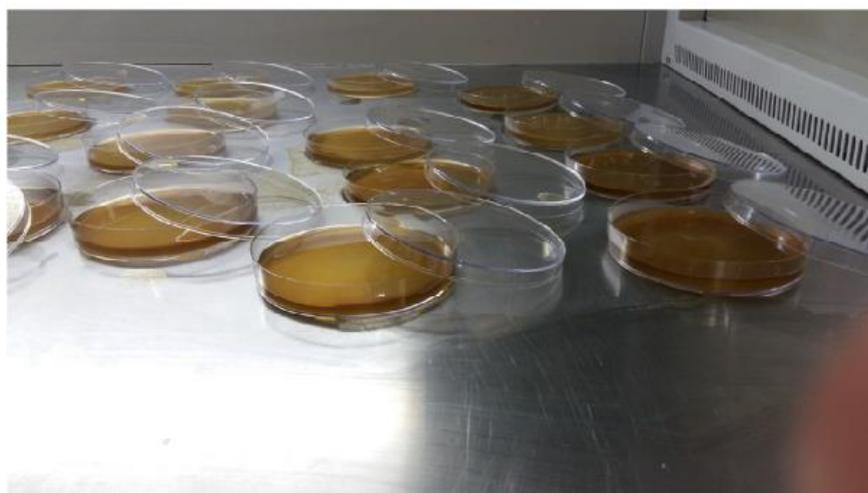


Figure III. 8: Collage de milieux gélosés.

I.7.3 Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (gélose nutritive) ayant au maximum 24h, nous raclons à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques. Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 5 ml d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne; son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland qui correspond à 10⁸ UFC/ml. Pour les bactéries, l'inoculum est ajusté à 10⁸ cellules/ml (une DO de 0,08 à 0,1) par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm.

I.8 Étude de l'effet synergique

L'effet de synergisme entre les deux huiles essentielles *d'Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* a été étudié par des méthodes différentes :

I.8.1 La méthode de diffusion sur disques

Cette technique est similaire à celle de l'aromatogramme, ou les disques imprégnés des combinaisons des deux huiles *d'Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* sont placés au centre de boîte pétri. Ce test permet de voir s'il y a une éventuelle synergie entre nos deux huiles.

Le protocole expérimental, On coule aseptiquement le milieu de culture gélosé, Mueller Hinton (M.H), en surfusion dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par boîte, à refroidissement et solidification à température ambiante, 100 ml de chaque suspension de culture bactérienne de concentration d'environ (10⁸ UFC/ml) est préparé à partir d'une culture de 18 heures, et ensuite étalée sur la surface du milieu gélosé M.H à l'aide d'un râteau.

Dépôt des disques : A l'aide d'une pince stérile, on prélève le disque de cellulose stérile (disque de papier filtre Whatman de 6 mm de diamètre) et on l'imbibe avec 10 µl l'H.E additionnée de DMSO à raison de 95/5 µl (V/V), en mettant en contact le bout du disque, celui-ci va absorber progressivement l'huile jusqu'à imprégnation totale. Ce dernier est soigneusement déposé sur la surface de la gélose au milieu de la boîte à l'aide d'une pince stérilisée au bec bunsen. Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et on le met dans étuve à une température de 37 °C pendant 24 heures.

Pour valider les résultats un témoin négatif est réalisé par dépôt de disques de papier Whatman imprégnés de 10 µl de DMSO au milieu des boîtes préalablementensemencées avec une suspension bactérienne standardisée, ainsi qu'un témoin positif par dépôt de 6 disques d'antibiotiques.

La lecture se fait par la mesure, à l'aide d'un pied à coulisse, du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. Les résultats sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition.

On mélange les deux huiles essentielles *d'Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* avec les proportions (70%/30%), (50%/50%), (30%/70%) à partir de la solution mère 80 mg/ml de DMSO.

Ces derniers sont ensemencés avec des suspensions standardisées des souches bactériennes : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les boîtes sont alors incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h et les zones d'inhibition sont ensuite mesurées.

I.8.2 Méthode de diffusion sur bandelettes

Cette méthode est basée sur le même principe de la méthode précédente elle repose sur l'utilisation de bandelettes de papier filtre stériles de dimension (0.4×5cm) au lieu des disques.

Le protocole expérimental consiste à déposer sur la boîte de pétri deux bandelettes de façon perpendiculaire la première est imprégnée par l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* et la deuxième par l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec les mêmes concentrations de combinaison réalisées dans la méthode de diffusion sur disques : (70/30), (50/50), (30/70) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et huile essentielle de *Thymus vulgaris*.

Ensuite, les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C, le schéma de croissance a été interprété par les diamètres des zones d'inhibition autour de chaque bandelettes la synergie est indiquée par élargissement de l'inhibition autour de l'angle (formation d'un trèfle) [160] .

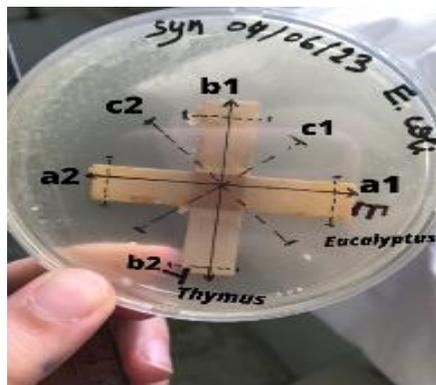


Figure III. 9: Effet synergique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* par la méthode des bandelettes.

$A = \frac{a1+a2}{2}$ diamètre d'inhibition d'HE d'*Eucalyptus globulus*.

$B = \frac{b1+b2}{2}$ diamètre d'inhibition d'HE de *Thymus vulgaris*.

$C = \frac{c1+c2}{2}$ diamètre d'inhibition entre les deux bandelettes des deux huiles essentielles.

- Si $A+B < C$: effet synergique
- Si $A+B = C$: effet additif
- Si $A+B > C$: effet antagoniste

I.8.3 La méthode Microdilution en milieu liquide

La méthode utilisée pour déterminer la CMI implique la réalisation d'une gamme décroissante de concentrations d'huile essentielle dans des tubes contenant une suspension bactérienne standardisée et un milieu liquide. Cette technique, décrite consiste à ajouter 80mg d'huile essentielle à tester, supplémenté en DMSO (5%, V/V), dans un tube stérile contenant 500ul de milieu MH. Une dilution de demi-demi est ensuite effectuée dans du milieu MH pour obtenir une gamme de concentration allant de 80 à 1,25 mg/ml. Cette gamme est obtenue en utilisant 7 tubes, dans lesquels 500ul d'un tube sont prélevés et placés dans le tube suivant jusqu'au 7ème tube, où 500ul sont prélevés et jetés [160].

Le protocole expérimental, consiste à mélanger les deux huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* avec les proportions (70/30), (50/50), (30/70) à partir de la solution mère.

Pour chaque combinaison on prépare une gamme décroissante de concentrations de mélange dans des tubes contenant une suspension bactérienne standardisée et un milieu liquide MH.

5µl d'un inoculum bactérien, de densité équivalente au standard UFC.ml⁻¹, sont déposés dans chacun des tubes de la gamme de dilution, les témoins sont également préparés.

Une fois la CMI indépendante déterminée, la concentration inhibitrice fractionnelle (FIC) a été calculée pour les combinaisons 50/50 et 70/30 et 70/30 de *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*. Le FIC est exprimé comme l'interaction de deux agents, où la concentration de chaque agent d'essai en combinaison est exprimée comme une fraction de la concentration qui produirait le même effet lorsqu'il est utilisé individuellement [161]. L'indice FIC est déterminé comme la corrélation entre les deux substances d'essai combinées.

II. Résultats et discussion

II.1 Rendement d'extraction des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est exprimé en pourcentage de la matière végétale, dans le tableau (III.3), Il est variable selon différents facteurs comme le séchage de la matière végétale, le broyage et la durée d'extraction.

Tableau III. 3: Rendement des huiles essentielles.

	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
mHE (mg)	1.28	5.38
mv (mg)	960	480
RHE %	0.23	1.22

Le rendement de l'huile essentielle obtenu par hydrodistillation de *Thymus vulgaris* est plus élevé que celui de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* obtenue dans les mêmes conditions. Cela peut être dû à la période de récolte de chaque plante.

Le rendement en huile essentielle de *Thymus vulgaris* (1.22%) correspond à la littérature, car les études menées sur l'huile de *Thymus vulgaris* récoltés dans différentes régions d'Algérie montrent un rendement qui varie entre 1.12 et 4.2%.

Par contre, le rendement en huile essentielle d'*eucalyptus globulus* est récemment inférieur à celui obtenu par Reghissia [25], 0.41% dans son étude effectuée sur l'huile essentielle de l'*Eucalyptus globulus* récolté en mois de Septembre 2020 dans la région de Guelma.

II.2 Caractères Organoleptiques des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*

Les paramètres organoleptiques (aspect, couleur, odeur) des huiles essentielles de l'*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau III. 4: Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris*.

Huile essentielle	Aspect	Couleur	Odeur
<i>Eucalyptus globulus</i>	Liquide	Jaune foncé	Fraiche et épicée
Référence [162]	Liquide mobile	Jaune très pale à transparent	Fraiche plus ou moins eucalyptolée selon l'origine.
<i>Thymus vulgaris</i>	Liquide	Brun	Odeur piquante
Référence [162]	Liquide mobile	Couleur traditionnellement allant du brun au brun-rouge.	Odeur caractéristique aromatique, phénolique (thymol) avec un fond légèrement épicé.

II.3 Étude l'activité antibactérienne

II.3.1 Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles seules

L'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de l'*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* a été réalisée vis à vis les trois souches bactériennes, par la méthode de diffusion sur gélose et la méthode de dilution en milieu liquide.

Le test d'aromatogramme a été effectué, sur l'huile essentielle pure et l'huile essentielle diluée dans DMSO (trois concentrations ont été testés à (70%, 50%,30%).

II.3.2 La méthode de diffusion sur gélose

La lecture a été réalisée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. À l'aide d'un pied à coulisse, les valeurs des diamètres pour les trois bactéries sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau III. 5: Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition d'HE *Eucalyptus globulus* vis-à-vis des trois bactéries.

Souche Bactérienne	Témoin négatif (DMSO)	Témoin positif		Concentration d'HE			
		Céphazoline	Gentamycine	Pure	70	50	30
<i>Escherichia coli</i>	6 mm	24mm	30 mm	11mm	8mm	9mm	7mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 mm	26 mm	25 mm	8 mm	8mm	7mm	9 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 mm	6 mm	17 mm	7 mm	9mm	8mm	6 mm

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.



(a)

(b)

(c)

Figure III. 10: Photographie montrant l'action d'HE d'*Eucalyptus globulus* sur les souches bactériennes : (a) *E.coli* (b) *S.aureus* (c) *P.aeruginosa*.

Les résultats qui sont exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition peuvent être symbolisés par des signes selon la sensibilité des souches vis-à-vis des huiles essentielles [163].

- Non sensible (-) ou résistante (R) : diamètre \leq 8mm
- Sensible (+) diamètre compris entre 9 à 14 mm
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- Extrêmement sensible (+++) : diamètre \geq 20 mm

Pour chaque boîte la mesure de la zone d'inhibition indique la sensibilité de ces germes, nous avons deux actions proposées à se produire :

- Soit une action bactéricide où nous ne remarquons aucune croissance microbienne autour des puits.

- Soit une action bactériostatique, dont il y'a des zones d'inhibition autour des puits disposés sur la surface de milieu de culture.

Tableau III. 6: Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions HE d'*Eucalyptus globulus* seule.

Souches bactériennes	Témoin négatif (DMSO)	Témoin positif		Concentration en HE			
		Céphazoline	Gentamycine	Pure	70	50	30
<i>Escherichia-coli</i>	-	+++	+++	+	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+++	+++	+	+	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	++	-	+	+	-

Les résultats présentés dans les tableaux et ainsi que les figures (a, b, c) indiquent clairement que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* présente une activité antibactérienne faible.

Vis-à-vis les trois souches bactérienne testées avec des diamètres zones d'inhibition de croissance (11 mm) pour *E.coli* , (9 mm) pour *S.aurus* et *pseudomonas aeruginosa*.

Ces résultats sont légèrement inférieurs aux ceux obtenus dans l'étude effectuée sur l'huile essentielle de la même espèce été récoltée de la réserve biologique de Djebel Ouahche à Constantine au mois de mars de l'année 2022, dans cette étude les auteurs ont montré une inhibition de la croissance bactérienne de la souche d'*E.coli* avec des diamètres allant de 25 mm à 8 mm et pour *staphylococcus aureus* de 15 mm à 10 mm et pour la souche *pseudomonas aeruginosa* des diamètres allant de 14 mm à 11 mm [164], légèrement supérieur aux résultats obtenus lors de notre étude.

Nous savons que les différents chémotypes d'une huile essentielle peuvent présenter des profils de composés chimiques distincts, ce qui peut influencer leur activité antibactérienne. Par exemple l'eucalyptol (1,8-cinéole) est souvent considéré comme un composé actif responsable

de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, cependant la teneur en 1,8-cinéole peut varier selon les chémotypes [165].

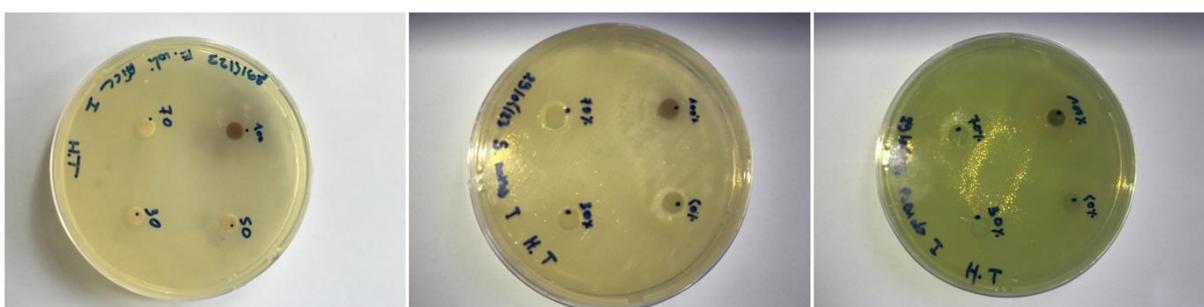
D'après le littératureur, L'action antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* dépend de sa composition chimique. Selon les travaux, il est possible que l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle *Eucalyptus globulus* soit attribuée aux monoterpènes oxygénés, comme le 1,8-cinéole, le α -pinène et le β -pinène, qui sont des constituants connus pour leurs activités antimicrobiennes [166].

Les valeurs des diamètres de la zone d'inhibition d'HE de *Thymus vulgaris* sur les trois bactéries sont regroupés dans le tableau suivant :

Tableau III. 7: Valeurs des diamètres de la zone d'inhibition d'HE de *Thymus vulgaris* vis-à-vis trois bactéries.

Souche Bactérienne	Témoin négatif (DMSO)	Témoin positif		Concentration en HE			
		Céphalozine	Gentamycine	Pure	70%	50%	30%
<i>Escherichia-coli</i>	6 mm	24 mm	30 mm	18mm	14mm	10mm	8 mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 mm	26mm	25 mm	15mm	11mm	10mm	8 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 mm	6 mm	17 mm	8 mm	11mm	7 mm	6 mm

Les diamètres des disques (6mm) sont inclus dans les mesures des zones d'inhibition.



(a)

(b)

(c)

Figure III. 11: Photographie montrant l'action d'HE de *Thymus vulgaris* sur les souches bactérienne : (a) *E.coli* (b) *S.aureus* (c) *P.aeruginosa*.

Les diamètres d'inhibition sont symbolisés par des signes selon la sensibilité est représentés sur le tableau (III.8).

Tableau III. 8: Transcription des diamètres d'inhibition des dilutions huile essentielle de *Thymus vulgaris* seule.

Souche Bactérienne	Témoin négatif (DMSO)	Témoin positif		Concentration d'HE			
		Céphazoline	Gentamycine	Pure	70	50	30
<i>Escherichia-coli</i>	-	+++	+++	++	+	+	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+++	+++	++	+	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	++	+	+	+	-

Les résultats présentés dans les tableaux (III.7) et (III.8) ainsi que les figures (a, b, c) indiquent clairement que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* pure présente une activité antibactérienne très prometteuse. Les données démontrent que souches les plus sensibles est *E.coli* avec une zone d'inhibition de (18 mm), suivie par *S.aureus* (15 mm) . Selon l'échelle de mesure de l'activité antibactérienne des huiles essentielles, *Pseudomonas* est considérée comme souche résistante ou non sensible.

Les résultats obtenus ont révélé une sensibilité de *E.coli* (Gram -) et *Staphylococcus* (Gram +) à la céphazoline, un antibiotique qui inhibe la production de la paroi cellulaire et agit comme un inhibiteur sélectif de la synthèse des peptidoglycanes. Le mécanisme initial de l'action de cette substance implique sa liaison à des récepteurs cellulaires appelés "protéines de liaison à la pénicilline". Cependant, il convient de noter que *Pseudomonas aeruginosa* présente une résistance à cet antibiotique. Par contre la gentamycine, a révélé une grande efficacité contre les trois souches bactériennes avec des larges diamètres d'inhibition.

Par comparaison avec la littérature, l'étude menée par Cheurfa et al., 2013 l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* montre une forte activité antibactérienne vis-à-vis sur cinq bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*) responsables de gastroentérites avec des diamètres d'inhibition variant de 22,00 à 45,00 mm.

II.3.3 La méthode de dilution en milieu liquide

Le tableau suivant présente les valeurs de CMI des deux HE d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* seuls vis-à-vis ont les souches bactériennes *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau III. 9: Les valeurs de CMI des HEs *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* vis-à-vis les bactéries testé (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

	CMI (mg/ml)		
	<i>Gentamicine</i>	<i>Eucalyptus globulus</i>	<i>Thymus vulgaris</i>
<i>E.coli</i>	2	1,25	20
<i>S.aureus</i>	2,6	5	5
<i>P.aeruginosa</i>	2,4	10	2,5

La présentation de tableau (III.9) dans deux Histogrammes suivant :

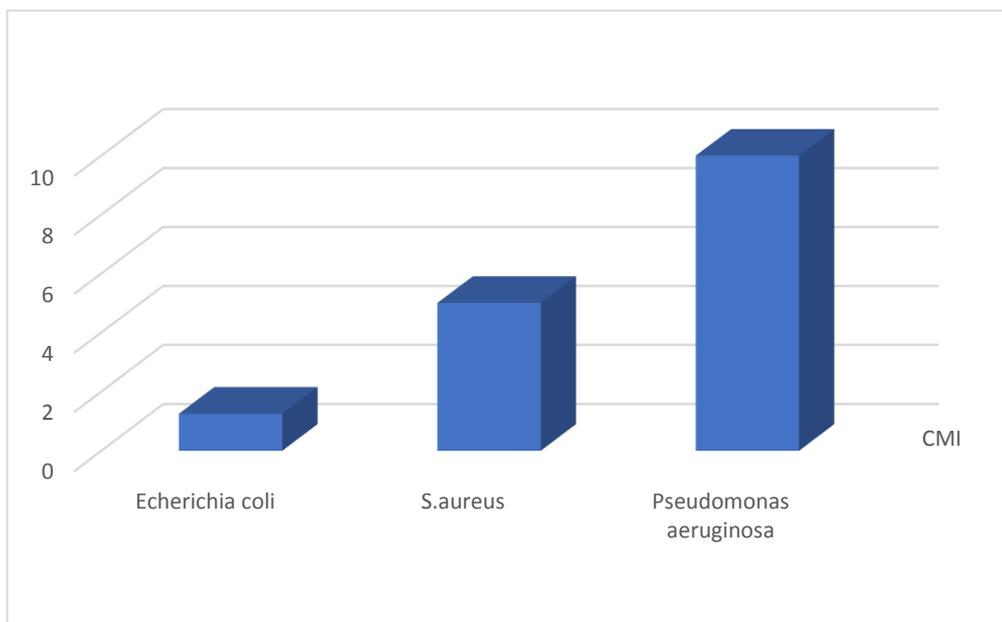


Figure III. 12: Histogramme les valeurs de CMI de *Eucalyptus globulus* vis-à-vis les bactéries testées.

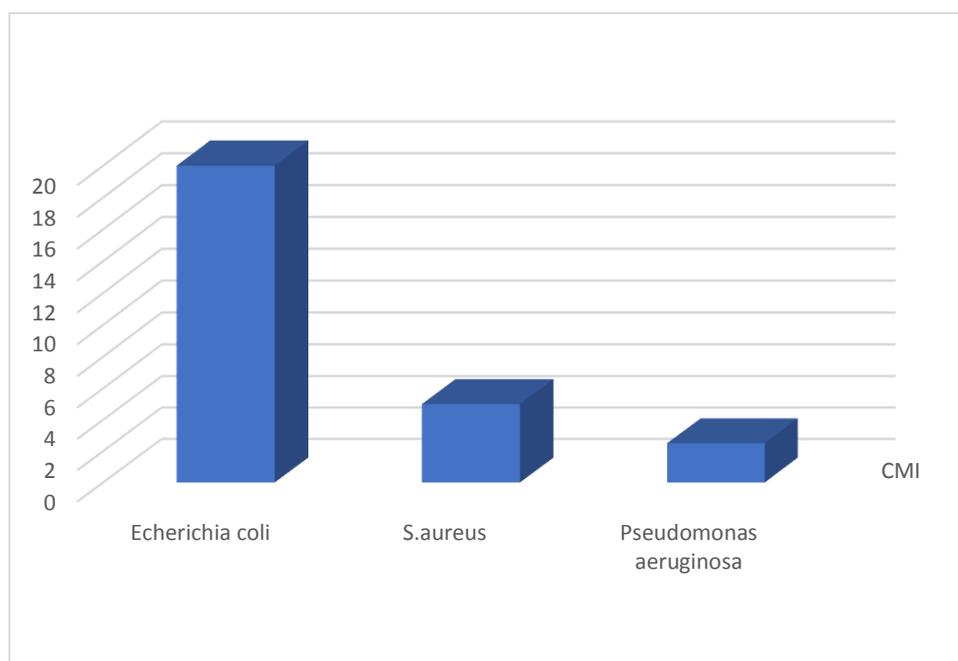


Figure III. 13: Histogramme les valeurs de CMI de *Thymus vulgaris* vis-à-vis les bactéries testées.

D'après les résultats obtenus de la détermination des CMI, nous observons que les valeurs obtenues varient en fonction de l'HE étudiée et de la souche microbienne testée.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a montré un effet inhibiteur contre la souche *Escherichia coli* à la dilution (1,56%) qui correspond à la concentration de 1,25 mg/ml et contre la souche *Staphylococcus aureus* à la dilution (6,25%) avec concentration de 5 mg/ml et contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* à la dilution (12,5%) qui correspond à la concentration de 10 mg/ml. Ces valeurs indiquent que l'HE d'*Eucalyptus globulus* présente une activité antibactérienne décroissante dans l'ordre *Escherichia coli* puis *Staphylococcus aureus* puis *Pseudomonas aeruginosa*.

D'autre part, l'HE de *Thymus vulgaris* a inhibé la croissance de la souche *E.coli* à la dilution (25%) qui correspond à la concentration 20 mg/ml et contre la souche *S.aureus* à la dilution (6,25%) avec concentration de 5 mg/ml et contre la souche *Pseudomonas aeruginosa* à la dilution (3,125 %) qui correspond à la concentration de 2,5mg/ml.

D'après ces résultats, l'HE de *Thymus vulgaris* a montré une efficacité très importante contre *Pseudomonas aeruginosa* avec une CMI de 2,5 mg/ml.

En outre, Les résultats obtenus montrent que pour *Escherichia coli*, la gentamicine a une CMI de 2 mg/ml, tandis que, l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* présente une CMI de 1,25 mg/ml et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* possède une CMI de 20 mg/ml.

Nous pouvons conclure que l'HE d'*Eucalyptus globulus* présente une activité antibactérienne contre *E.coli* la plus élevée mieux que celle de l'antibiotique la gentamicine.

Pour *Staphylococcus aureus*, la CMI de la gentamicine est de 2,6 mg/ml, tandis que l'huile d'*Eucalyptus globulus* et l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* ont toutes deux une CMI de 5 mg/ml.

En ce qui concerne *Pseudomonas aeruginosa*, la CMI de la gentamicine est de 2,4 mg/ml, tandis que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* présente une CMI de 10 mg/ml et l'huile de *Thymus vulgaris* a une CMI de 2,5 mg/ml, de cela, l'HE de *Thymus vulgaris* très efficace vis-à-vis la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces résultats suggèrent que les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Thymus vulgaris* peuvent présenter une activité antibactérienne similaire ou supérieure à celle de la gentamicine, en fonction de la souche bactérienne étudiée. Cependant, d'autres tests et études

sont nécessaires pour évaluer leur efficacité et leur potentiel thérapeutique dans différentes conditions d'utilisation.

II.4 Évaluation de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles en combinaison

Dans cette partie nous avons réalisée des combinaisons entre les deux huiles étudiées. L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisé par 3 méthodes : diffusion sur disque, les bandelettes, la macrodilution (CMI) vis-à-vis les trois souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

II.4.1 La méthode de diffusion sur disques

Afin de développer les résultats des huiles testées, nous avons essayé de faire des mélanges entre les deux huiles essentielles, Les résultats sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau III. 10: Valeur des diamètre moyens de la zone d'inhibition de combinaison d'HE *Eucalyptus globulus* et d'huile de *Thymus vulgaris* vis-à-vis des trois bactéries.

Bactéries	Diamètres d'inhabitations en combinaison (EG/TV) (mm)			Diamètres d'inhibition des témoins	
	70 /30	50/50	30/70	Témoin + (Gentamycine)	Témoin – (DMSO)
E. coli	11 mm	19 mm	9 mm	30 mm	6 mm
S. aureus	12 mm	11 mm	11 mm	25 mm	6 mm
P.aeruginosa	10 mm	10 mm	11 mm	17 mm	6 mm

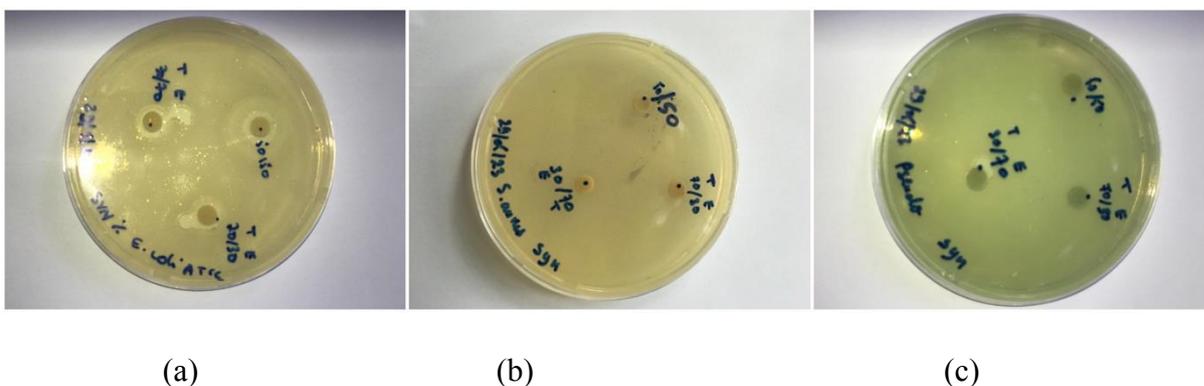


Figure III. 14: L'action de la combinaison des HEs *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* vis-à-vis les trois souches bactérienne (a) *E.coli* (b) *S.aureus* (c) *P.aeruginosa*

Nous observons que toutes les souches bactériennes testés sont sensibles à toutes les proportions de combinaisons. La souche la plus sensibles est *Escherichia coli* dans la combinaison (50E/50T) avec un large diamètre d'inhibition 19 mm, la plus faible activité antibactérienne est enregistrée pour la proportion (30/70) (9 mm) toutes les combinaisons pour *Escherichia coli*, les autres combinaisons possèdent une activité moyenne avec des diamètre entre 10 et 12 mm. Pour les souches *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Par la comparaison avec les résultats de l'activité antibactérienne deux huiles essentielles chacune seule, nous constatons que l'effet de la combinaison pour toutes les proportions est plus important.

II.4.2 La méthode de diffusion sur bandelettes

Les résultats ont été interprétés en comparant la somme des diamètres des zones d'inhibition avec la valeur C (diamètre d'inhibition entre les deux bandelettes des deux huiles essentielles). Les résultats obtenus sur les trois souches *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* et *pseudomonas aeruginosa* sont présenté dans le tableau suivant :

Tableau III. 11: Résultat de l'effet synergisme par la méthode de diffusion sur bandelettes.

	Diamètres de la zone d'inhibition des HEs seules				Résultats
	EG(A)	TV(B)	A+B	C	
<i>E.coli</i>	20.5	20.5	41	56	Synergie
<i>S.aureus</i>	17	18.5	35.5	30	Antagoniste
<i>P.aeruginosa</i>	0.5	15.5	16	23.5	Synergie
	Diamètres de la zone d'inhibition des combinaison EG/TV à (50/50)				
<i>E.coli</i>	5.5	18	23.5	41	Synergie
<i>S.aureus</i>	6	13	19	40	Synergie
<i>P.aeruginosa</i>	0.5	0.5	1	1	Aucun effet
	Diamètres de la zone d'inhibition des combinaison EG/TV à (70/30)				
<i>E.coli</i>	5.5	5.5	11	7.5	Antagoniste
<i>S.aureus</i>	6.5	5	11.5	12	Synergie
<i>P.aeruginosa</i>	0.5	0.5	1	0	Aucun effet
	Diamètres de la zone d'inhibition des combinaison EG/TV à (30/70)				
<i>E.coli</i>	10	7	17	19.5	Synergie
<i>S.aureus</i>	5.5	9	14.5	12.5	Antagoniste
<i>P.aeruginosa</i>	0.5	0.5	1	0	Aucun effet

D'après le tableau ci- dessus, Les résultats obtenus pour les huiles essentielle *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* seul et en combinaison, on observe l'effet synergique pour *Escherichia coli* sauf la proportion (70E/30T) donne un effet antagoniste.

Staphylococcus aureus donne un effet synergique avec les combinaisons (50E/50T) et (70E/30T) et effet antagoniste avec les huiles essentielles seules et la proportion (30E/70T).

Pseudomonas est la souche plus résistante a donné un effet synergique avec les huiles essentielles seules et aucun effet avec les autres proportions.

En conclusion, la méthode de diffusion sur bandelettes basée sur les zones d'inhibition de la croissance bactérienne a permis de démontrer l'existence d'effets synergiques et antagonistes entre les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Thymus vulgaris*. Ces résultats soulignent l'importance de prendre en compte les interactions entre les composants bioactifs des huiles essentielle lors de leur utilisation dans des applications antimicrobiennes. Les mécanismes sous-jacents de ces interactions et pour évaluer l'effet synergique dans d'autres conditions expérimentales.

II.4.3 La méthode de CMIs

L'activité antibactérienne des différentes associations de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* avec combiner à l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* vis-à-vis les trois souches bactériennes étudiées présentée dans le tableau ci-dessous, Nous remarquons que les CMIs résultants de la combinaison d'*Eucalyptus globulus* avec du *Thymus vulgaris* à des proportions différentes.

Tableau III. 12: Les concentrations minimales inhibitrices de l'HE d'*Eucalyptus globulus* associés à l'HE de *Thymus vulgaris* et du standard.

Les souches Bactérienne	CMIs (mg/ml) des combinaison EG/TV		
	(50/50)	(70/30)	(30/70)
<i>E.coli</i>	20	1,25	1,25
<i>S.aureus</i>	10	5	1,25
<i>P.aeruginosa</i>	10	2,5	1,25

Les résultats de tableau (III.12) présenter dans l'histogramme suivant :

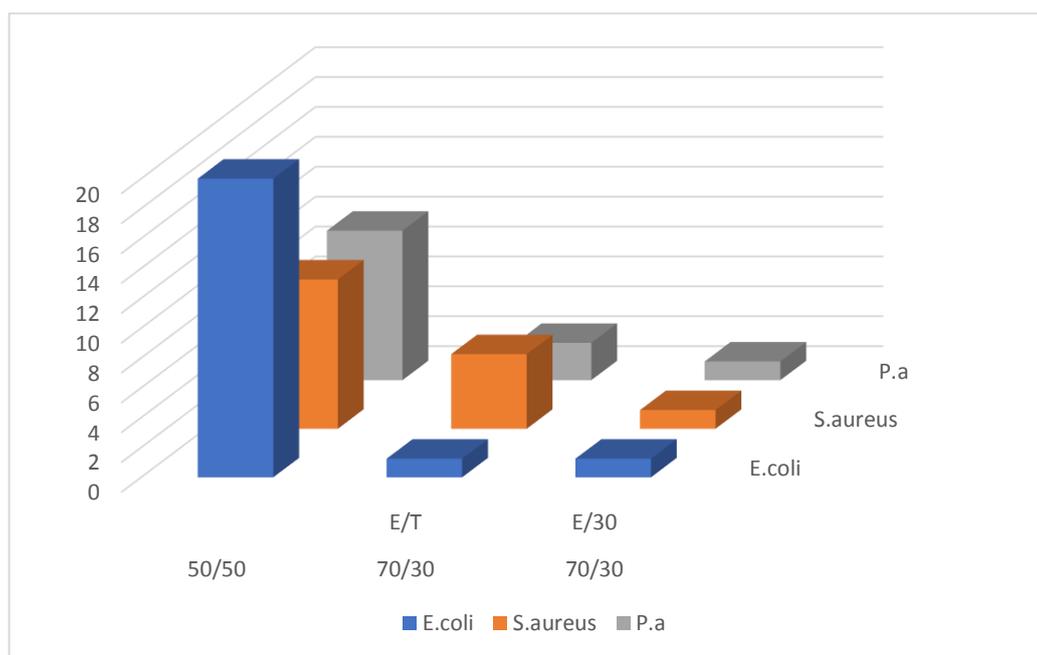


Figure III. 15: Histogramme les CMI de l'HE d'*Eucalyptus globulus* associés à l'HE de *Thymus vulgaris*.

Les CMI résultant de la combinaison d'*Eucalyptus globulus* avec le *Thymus vulgaris* a 30/70 sont inférieure à l'addition des activités individuelles de chaque huile essentielle, par contre les résultats de les CMI de la combinaison **50/50** sont proche des valeurs des CMI de chaque huile seule, pour l'*Eucalyptus globulus* est 1,25 mg pour *E.coli* ,5mg pour *S.aureus* ,10mg pour *P.aeruginosa* .

Et pour *Thymus vulgaris* est 20mg pour *E.coli* ,5mg pour *S.aureus* et 2,5 pour *P.aeruginosa* .

La combinaison de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (30%) associés au l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* (70%) à donner une inhibition totale de la croissance de toutes ces souches bactériennes *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, avec la concentration minimale inhibitrice la plus faible 1,25 mg/ml.

L'effet synergisme a été déterminé en calculant l'indice de concentration inhibitrice fractionnelle (FICI) à l'aide de la formule suivante [122] :

$$FICI = FIC(A) + FIC(B)$$

$$FIC(A) = \frac{\text{CMI de l'agent A en combinaison}}{\text{CMI de l'agent A seul}}$$

Où

$$FIC(B) = \frac{\text{CMI de l'agent B en combinaison}}{\text{CMI de l'agent B seul}}$$

Les valeurs d'indice des concentrations inhibitrices fractionnaires ont été interprétées comme suit : $FICI \leq 0,5$ signifie synergie ;

$0,5 < FICI \leq 0,75$ signifie une synergie partielle ;

$0,76 \leq FICI \leq 1$ signifie effet additif ;

$1 < FICI \leq 4$ signifie aucune interaction (non différentiel) ;

$FICI > 4$ signifie antagonisme.

Les résultats obtenus en termes de valeurs d'indices FIC des différentes associations (EG/TV) à des proportions de (70/30 ,50/50,30/70) sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau III. 13: Les valeurs FICI pour les différentes associations d'*Eucalyptus globulus* avec *Thymus vulgaris*.

Combinaison 70/30 (EG/TV)							
Souches	CMI A EG	CMI B TV	CMI de combinaison EG/TV	FIC A	FIC B	FICI	Résultat
<i>E.coli</i>	1,25	20	1,25	1	0,062	1,062	Additif
<i>S.aureus</i>	5	5	5	1	1	2	Aucune interaction
<i>P.aeruginosa</i>	10	2,5	2,5	0,25	1	1,25	Aucune interaction
Combinaison 50/50 (EG/TV)							
<i>E.coli</i>	1,25	20	20	16	1	17	Antagonisme
<i>S.aureus</i>	5	5	10	2	2	4	Aucune interaction
<i>P.aeruginosa</i>	10	2,5	10	1	4	5	Antagonisme
Combinaison 30/70 (EG/TV)							
<i>E.coli</i>	1,25	20	1,25	1	0,062	1,062	Additif
<i>S.aureus</i>	5	5	1,25	0,25	0,25	0,5	Synergie
<i>P.aeruginosa</i>	10	2,5	1,25	0,12	0,5	0,6	Synergie partielle

L'application combinée entre et 30% d'*Eucalyptus globulus* et 70% de *Thymus vulgaris* a produit un effet synergique tel que défini par les indices FIC inférieurs, le FICI de cette combinaison était 0,5 et 0,6 contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, Cette combinaison à donner un effet synergique contre les bactéries de Gram (-) et Gram (+).

D'autre part, les deux combinaisons 30% d'*Eucalyptus globulus* et 70% de *Thymus vulgaris* de 70% d'*Eucalyptus globulus* et de 30% *Thymus vulgaris* a donné un effet additif avec la valeur de FICI= 1,026 contre *Escherichia coli* et l'autre souche a donnée aucune interaction.

L'activité antagoniste n'a été notée que pour le rapport (50/50) testée pour les deux souches bactériennes de Gram (-) *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* par les valeurs de FICI entre 5 à 17.

Dans cette étude, l'amélioration de l'activité d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a été observée lorsqu'elle est associée au l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* par une concentration plus élevée (30E/70T), il permet d'obtenir un effet synergique qui renforce considérablement l'activité antibactérienne de d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.

En conclusion, Le rôle de 1,8-cinéole est potentialise l'activité d'autres composés antibactériens lorsqu'il y est associé. En augmentant la perméabilité de la paroi, il cause un déséquilibre dans la membrane des bactéries et facilite ainsi la pénétration d'autres composés plus actifs [167].

Ainsi, bien que le 1,8-cinéole possède une faible activité antibactérienne, c'est son utilisation en synergie avec d'autres composés tels que des phénols, qui laisse entrevoir tout son potentiel antibactérien.

Conclusion

Le présent travail a été réalisé dans le but de déterminer l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Thymus vulgaris* sur trois souches bactériennes multi-résistantes à savoir ; *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que l'effet d'interaction de ces huiles essentielles en combinaison. L'objectif principal était de trouver des synergies entre les composants des deux huiles essentielles étudiées, afin de soutenir la recherche dans la lutte contre la résistance bactérienne.

L'extraction des huiles essentielles par hydrodistillation a permis d'obtenir des rendements de 0,23% pour les feuilles sèches d'*Eucalyptus globulus* et de 1,22% pour la partie aérienne du *Thymus vulgaris*. Ces résultats sont satisfaisants, compte tenu du fait que cette technique est longue et que les rendements obtenus sont généralement très faibles.

D'après les résultats obtenus de l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles seules des deux plantes, nous avons constaté qu'un effet antibactérien a été observé pour les trois souches bactériennes. La concentration minimale inhibitrice (CMI) pour la souche *Staphylococcus aureus* est de 5 mg/ml pour les deux huiles essentielles. Cependant, l'huile d'*Eucalyptus globulus* a montré une activité antibactérienne plus importante que l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* contre *Escherichia coli*, avec des CMI de 1,25 mg/ml et 20 mg/ml respectivement, et moins importante contre *Pseudomonas aeruginosa*, dont les CMI sont de 10 mg/ml et 2,25 mg/ml respectivement.

Les tests de sensibilité effectués par la méthode de diffusion sur disque ont montré une forte activité antibactérienne pour l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* avec des diamètres d'inhibition de 18 mm, 15 mm et 8 mm et modérée pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* avec des diamètres d'inhibition de 11 mm, 9 mm et 8 mm pour *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, respectivement.

L'étude de la combinaison de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* avec l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* à des proportions de 70/30, 50/50 et 30/70 a été réalisée par la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats obtenus ont montré la présence de l'effet de synergie à la combinaison 30/70, pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec un indice de concentration fractionnaire (FICI) de 0,5 et 0,6 respectivement et un effet additif contre *Escherichia coli* avec une valeur de FICI de 1,026.

Par ailleurs, une activité antagoniste a été observée à la combinaison 50/50 contre les deux souches bactériennes, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

L'étude de l'association des deux huiles essentielles par la méthode des bandelettes croisées a permis de démontrer que les interactions entre les composants bioactifs ont conduit à des effets synergiques et antagonistes variables selon les souches bactériennes ciblées.

En conclusion, cette étude met en évidence le potentiel antibactérien prometteur de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et de l'huile de *Thymus vulgaris*. Leur utilisation seule ou en combinaison pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections bactériennes difficiles à traiter. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes d'action et l'efficacité des huiles essentielles dans des modèles in vitro plus complexes.

Références

- [1] Durand et Guillaume, **2018** «Incompatibilités de culture bactérienne.Thèse de doctorat en Pathologies humaines-maladies infectieuses. Aix-Marseille: Faculté de médecine.» p. 311.
- [2] Florence et Raghu, **2016** «Épidémiologie de la résistance chez les entérobactéries isolées sur les ECBU réalisés dans un service d'urgence.Thèse de doctorat .Université Paris Diderot - PARIS 7 : Faculté de Médecine.» p. 81.
- [3] Allison et Muller, **2017** «Bon usage des antibiotiques: résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé.Thèse de doctorat en Sciences de la vie et de la santé .Université de Bourgogne franche comte.» p. 194.
- [4] Bruneton.J, **1999**. Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3ème édition, Tec & Doc. Lavoisier, Paris» p. 1120.
- [5] Deans.GC, Noble C.R., Mac Pherson, A.Penzes, L., Imre, G.S.,Hofecker, G. Skalicky Ageing Series. Facultas Press, Vienna, **1994**, p. 173.
- [6] Yahyaoui.N, **2005** «Thèse de Magister : Extraction,analyseet évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de MentheSpicata LsurRhyzoperlhu dominicu (F .)(Coleoptera, Bostrychidae) et Triboiumconfusm (Duv.) (Coleoptera,Tenebrionidae).INA, El-H».
- [7] Hinou.JB, Harvala.CE et Hinou.EB, **1989** « pharmacies ; 44 » p. 302–304.
- [8] Griffin.SG, Wyllie SG, Markham JL, Leach DN, **1999**. Arôme Parfum J.14 p. 322–332.
- [9] «Nouvelle faculté de médecine du Jiangsu. Dictionnaire de la matière médicale chinoise, Maison d'édition scientifique et technique de Shanghai, Shanghai », **1985**, p. 1793 .
- [10] Benrabah.Hanen et Dekichene.Mohamed, **2017** «Contribution à l'étude de la qualité et la stabilité d'un lait fermenté alicament additionné d'extrait à l'éthanol de Thymus vulgaris (Thym) récolté dans la région de Naama ».
- [11] Kesbi.A, **2011** «Etude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'eucalyptus globulus dans la région de Ouargla.» p. 61.
- [12] Heywoodv.H, **1996** « les plantes a fleurs : 306 familles de la flore mondiale. ed. nathan, Paris.» p. 336.
- [13] Judd.w, C. C.S, K. E.A et Stevens.p, **2002** « botanique systématique une perspective phylogenetique. ed. deboeck université, Paris» p. 467.
- [14] Botineaum, **2010** « Botanique Systématique et Appliquée Des Plantes A Fleurs. Ed. Tec & Doc, Paris» p. 1335.
- [15] Warot.S, **2006** « Les Eucalyptus utilisés en Aromathérapie .Préparatrice en pharmacie. Mémoire de fin de formation en Phyto-aromathérapie » p. 3.

- [16] Bruneton.J, **2009** « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème édition. Edition Tec & Doc, Lavoisier ».
- [17] Foudi.C, **1991**. Étude comparative des huiles essentielle algériennes d'Eucalyptus globulus labil et camaldulensis .Thèse magistère U.S.T.H.B.Alger.» p. 159.
- [18] Boukhatem, M.N, Ferhat, Kameli et Mekarnia, **2017** « Eucalyptus globules (Labill) : un arbre à essence aux mille vertus. Lavoisier SAS».
- [19] Anton.R et Wichtl.M, **2003** «Plantes thérapeutiques. 2ème édition. Edition Tec & Doc, Edition médicales internationales. Lavoisier».
- [20] Boulekbache.Makhlouf, Meudec.E, Chibane.M, Mazauric.JP, Cheynier.V, Slimani.S, Henry.M et Madani.K, **2010** «Analyse des composés phénoliques dans les fruits de Eucalyptus globulus cultivé en Algérie par chromatographie liquide haute performancedétection par barrette de diodes spectrométrie de masse . J. Agric. Chimie alimentaire » p. 12615–12624.
- [21] Shu.Y, Kwok, ESC, Tuazon, Atkinson et Arey.J, **1997** «Produits des réactions en phase gazeuse du linalol avec les radicaux OH, les radicaux NO et O . Science et technologie de l'environnement» p. 896-904.
- [22] «<https://www.ethnoplants.com/fr/graines-plantes-tropicales-exotiques/461-eucalyptus-globulus-gommier-bleu-graines.html>».
- [23] Kara.kahina et Saidi.Siham, **2016** «Thèse: "Contribution à l'étude comparative du rendement et des composés chimiques de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus L entre les feuilles âgées et les feuilles jeunes de la forêt de Harouza (Commune de Tizi-Ouzou)"».
- [24] Viliam.B et K. Š, **2013** «Métabolites secondaires isolés du genre Eucalyptus».
- [25] Reghaissia.Imène, **2020** «Thèse : Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de l'Eucalyptus Globulus :Application comme insecticide.Université 8 Mai 1945 Guelma».
- [26] Fischer.J et Dethlefsen.U, **2013** «Efficacité du cinéole chez les patients souffrant de bronchite aiguë : un essai en double aveugle contrôlé par placebo. Toux 9 (1), 25. doi : 10.1186/1745-9974-9-25».
- [27] lu, X.qQ, Tang, F.dD, Wang, Zhao.T et Bian, **2004** «Effet de l'huile d'eucalyptus globulus sur la bronchite chronique induite par les lipopolysaccharides et l'hypersécrétion de mucine chez les rats]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 29 (2)» p. 168-171.
- [28] «<https://booksofdante.wordpress.com/2014/11/12/les-huiles-essentielles-a-oxydes/>» .
- [29] Maniliang.TANy, Ligang.ZHOU, Yongfu.HUANGy et YE.WANGz, **2007** «College of Agronomy and Biotechnology, ,Activité antimicrobienne du globulol isolé des fruits d'Eucalyptus globulus Labill. China Agricultural University, Pékin».
- [30] «<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.16737082.html>».
- [31] Grisen.RJ, Cocker.DR, Flagan.RC et Seinfeld.JH, **1999** « Formation d'aérosols organiques à partir des oxydations des hydrocarbures biogéniques. Journal of Geophysical Research 104» p. 3555-3567.

- [32] K. Calogirou.A et Kettrup.A, **1995** « Oxydation atmosphérique du linalol. *Naturwissenschaften* 82» p.288-289.
- [33] Calogirou.A, Larsen.BR et Kotzias.D, **1999** «Produits d'oxydation des terpènes en phase gazeuse : une revue. *Atmospheric Environment* 33» p. 1423-1439.
- [34] Topiar.M, Sajfrtova.M et Machalova.Z, **2015** «Comparaison des techniques de fractionnement des extraits au CO2 d' Eucalyptus globulus composition et activité insecticide . *J. Supercrit. Fluides* 97» p. 202–210.
- [35] Coppen.jjw, **2002** «Eucalyptus ;the genus Eucalyptus .Medicinal and aromatic plants industrial profiles .Volume 22 .Edition Taylor and Francis, Londres, Grande –Bretagne.».
- [36] Bourasse.M , **2019** «THEME Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de certaines plantes de l'est algérien sur des souches résistantes aux antibiotiques.».
- [37] Koziol.Nathalie, **2015** «Huiles essentielles d'Eucalyptus globulus, d'Eucalyptus radiata et de Corymbia citriodora: qualité, efficacité et toxicité. Thèse de doctorat en Pharmacie. Lorraine : Université de Lorraine » p. 129.
- [38] Raho.Bachir, **2017** «Activité antimicrobienne des huiles d' eucalyptus globulus, Département de biologie, Université de Mascara, Mascara, Algérie.».
- [39] Nezhad, FM, Zeigham.H, Mota.A, Sattari.M et Yadegar.A, **2009** « Antibacterial activity of eucalyptus extracts on methicillin resistance Staphylococcus aureus. *Res J Biol Sci* » p. 905-908.
- [40] O. Samoussa, A. Abdellaoui et A. Kettani, **2018** «Étude de la Sensibilité Aux Huiles Essentielles de Cinnamomum Verum, Eucalyptus Globulus, et Glycyrrhiza Glabra L Ainsi qu'aux Antibiotiques de Certains Germes Issus de la Restauration Collective Milan ».
- [41] Mulyaningsih.S, Sporer.F, Reichling.J et Wink.M, **2011** «Activité antibactérienne des huiles essentielles d' eucalyptus et de composants sélectionnés contre les agents pathogènes bactériens multirésistants. *Biologie Pharmaceutique*» p. 893-899.
- [42] Mieres.Castro,**2021** « Activités antivirales des huiles essentielles d'eucalyptus : leur efficacité comme cibles thérapeutiques contre les virus humains. *Produits pharmaceutiques.*».
- [43] Sharma.A.D, **2020** «Eucalyptol (1,8 cinéole) issu de l'huile essentielle d'eucalyptus, un inhibiteur potentiel de Infection par le virus corona COVID 19 par Études d'amarrage moléculaire.PG département de biotechnologie, Lyallpur Khalsa College Jalandha».
- [44] Gavanji.S, Sayedipour, SS, Larki.B et Bakhtari.A, **2015** «Activité antivirale de certaines huiles végétales contre le virus de l'herpès simplex de type 1 en culture cellulaire Vero.».
- [45] Vimalanathan.S et Hudson.J, **2014** « Activité anti-grippale des huiles essentielles et des vapeurs.».
- [46] Cermelli.C, Fabio.A, Fabio.G et Quaglio.P, **2007** « Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses. *Curr Microbial.* Vol n° 56. Edition Springer.» p. 89–92.

- [47] Bouaine.A, **2017** «étude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales : lentisque et myrte. Mémoire de master et science et techniques. Fès : université Sidi Mohamed Ben Abdellah.» p. 44.
- [48] H. Moteki et Hibasami, **2002** «Specific induction of apoptosis by 1,8- cineole in two human leukemia cell lines, but not a in human stomach cancer cell line. Oncology Reports.»
- [49] Murata, **2013** «Antitumor effect of 1, 8- cineole against colon cancer. Oncology Reports. Vol. 30, n° 6» p. 2647 2652.
- [50] Vilela, **2009** « Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. Journal of Stored Products Research.» p. 108 -111.
- [51] Upson.T et Andrews.S, **2019** «the evaluation of Lamiaceae, with particular emphasis on subfamily Lamioideae. Cambridge universty press».
- [52] Quezel.P et S. Santa, **1963** «Nouvelle flore de l'algérie et des Régions Désertiques Méridionales, Tome 2.Editions du centre national de la Recherche Scientifique. 15,quai Anatole-France-Paris».
- [53] Naghibi.F, Mosaddegh.M; M.S, Mohammadi; Ghorbani.A , **2005** « Labiatae Family in folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to Pharmacology-Iranian journal of pharmaceutical research, vol. 2 : p. 63-79.».
- [54] Dob.T, Dahmane D., Chelghoum.C , **2006**. «Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss&Reut –the International Jornal of Aromatherapy , Vol .16 : p. 95-100 ».
- [55] Jalas.J, **1971** «Note of *Thymus* L. (Labiatae) in Europe.I. Supraspecific classification and nomenclature. Botanical Journal of the Linnean Society» p. 199-215.
- [56] Kabouche.A , Kabouche.Z , Bruneau.C, **2005**. Flavour Fragr. J. 20, 235.».
- [57] Benayache.F , **2013** «Etude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret. Mémoire de Master, Université Constantine 1, Algérie» .
- [58] Saadallah.H, Radjeh B., Dakhli D , **2020** «Les activités biologiques des constituants bioactifs de thym (*Thymus algeriensis*). Mémoire de master , Université Mohammed Sedik Benyahia, Jijel, Algérie.».
- [59] Morales.R , **2002**. «The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In *Thyme* ».
- [60] Teuscher.E, Anton.R et Lobstein.A, **2005**. Plantes aromatiques Epices, aromates,condiments et huiles essentielles. Tec & Doc. Lavoisier, Paris» p. 521.
- [61] Charles.DJ, **2012** ««Antioxidant properties of spices, herbs and other sources.Springer Science & Business Media. New York Heidelberg Dordrecht London» p. 588 .
- [62] N. zeghad, **2009** «Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Diplôme de Magister, Université des Frères Mentouri, Constantine. Algérie.».

- [63] «MNHN et OFB. Fiche de *Thymus vulgaris* L., 1753. Inventaire national du patrimoine naturel (INPN) [Ed]. 2003-2023».
- [64] Zeghib.A, **2013** «Etude phytochimique et activite antioxydante, antiproliférative antibactérienne et antivirale d'extraits et d'huiles essentielles de quatre espèces endémiques du genre thymus. Thèse Doctorat. Univ. Constantine 1».
- [65] Amiot.J, **2005** «*Thymus vulgaris*, un cas de polymorphisme chimique pour comprendre l'écologie évolutive des composés secondaire. Thèse de doctorat-Ecole nationale supérieure d'Agronomie de Montpellier.».
- [66] Abdelli.W, **2017** «Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperus phoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem, Algérie.».
- [67] E. OUALI et E. AKHAL, **2013** «Composition chimique et activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques du centre nord marocain : *thymus vulgaris* et *thymus satureioïdis*».
- [68] Benmadi.Z et Abida.H, **2018** «Effet des extraits de *Thymus vulgaris* chez *Escherichia coli* responsable des infections uro-génitales , Université Abdel Hamid Ibn Badis, Mostaganem, Algérie.,».
- [69] Binate.G et Dikes.L, **2018** «Etude de l'effet antibactérien et prébiotique des extraits de *Thymus vulgaris* et de *Thymus serpyllum* Mémoire de Master, Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana, Algérie ».
- [70] Benabed.KH, Gourine.N, Ouinten.M, Bombarda.I, Yousfi.M , **2017**. «Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Three Algerian Lamiaceae Species; Current Nutrition and Food Science, Bentham Science Publishers,13» p.97-109.
- [71] Sidali.L, Brada.M , Fauconnier M.L., Lognay.G , **2014** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* du Nord d'Algérie. *PhytoChem & Biosub Journal*, 8(3):10-163» .
- [72] Bouguerra.N, D. F.T et Soltani.N, **2017** «Algerian *Thymus vulgaris* essential oil: Chemical composition and larvicidal activity against the mosquito *Culex pipiens*. *International Journal of Mosquito Research*, 4(1): 37-42».
- [73] David.M, **2019** « Le thymol - sources propriétés et applications. Thèse de Doctorat, Université de Limoges, France.».
- [74] Lakhder.L, **2015** « Evaluation de l'activite antibacterienne d'huiles essentielles marocaines sur aggregati bacter actinomycetem comitans : Etude in vitro. Thèse de Doctorat, Université de médecine dentaire de Rabat, Maroc».
- [75] Shazia.S, Muzafar.G, Wagay , **2011**. essential oil composition of *thymus vulgaris* L. and their uses. *j essent oil res*, 16: 69-74».
- [76] Jadcak.D et Wesolowska.A, **2006** «Comparison of the Chemical Composition of Essential Oils Isolated from Two Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Cultivars. *Not Bot Horti Agrobo*, 47(3): 829-835.».

- [77] Erica.A, Juan F., Jorge A., Eva N. , Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*. *Chemical composition and fungicidal*, 4 (16): 1-7».
- [78] Deschepper.R, **2017** « Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie Mémoire de Doctorat, Université d'Aix-Marseille,France».
- [79] Agili.F.A, « Chemical composition, antioxidant and antitumor activity of *Thymusvulgaris* L. essential oil. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 21(10): 1670-1676.».
- [80] Szentandrassy.N, Szentesi, P , Magyar.J , Nanasi.P. , Csernoch.L , **2003** «Effect of thymol on kinetic properties of Ca and K currents in rat skeletal muscle. *BMC Pharmacology*.» p.1-9.
- [81] E. Ipek, Zeytinoglu.H , Okay.S , Tuylu.B. A , Kurkcuoglu.M, Can Baser, **2005** « Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/ microsomal test. *Food Chemistry*.» p. 551-556.
- [82] L. Crowell.P, « Gould, M. N.Chemoprevention and therapy of cancer by d-limonene.*Crit Rev.Oncog*,» p. 1-22.
- [83] C. E. Eslon, **1995** «Suppression of mevalonate pathway activities by dietary isoprenoids:protective roles in cancer and cardiovascular disease. *J Nutr*» p.1666-1672.
- [84] K. Ito et M. Ito, **2013** «The sedative effects of inhaled terpinolene in mice and its structure activity relationships. *J Nat .Med*.» p. 833-7.
- [85] Zachariah.E, **2013** «SUNTRES,1,2 JOHN COCCIMIGLIO,1,2 et MISAGH ALIPOUR1.La Bioactivité et la Toxicologie Actions du Carvacrol».
- [86] Furmanowa.M et Olszowska.O, **1992** «Micropropagation of thyme (*Thymus vulgaris* L.). In: *High-Tech and micropropagation III* (coordonné par Y.P.S Bajaj) » p. 230-243.
- [87] Q. Benameur, Teresa, Gervasi , Vito , Pellizzeri, Mária , Pluchtová, **2019** «Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential oil alone and in combination with cefotaxime against blaESBL producing multidrug resistant Enterobacteriaceae isolates».
- [88] L. F. Shallal et M. A.-A. Ahmed, **2022** «Experimental In vitro Study to Assess the Antibacterial Activity of *Thymus vulgaris* Oil on *Streptococcus Sanguinis*» *Journal of Baghdad College of Dentistry*.
- [89] L. W-L, Lai.W-L, Chuang.H-S, Lee.M-H, Wei.C-L, Lin.C-F, Tsai.Y-C, **2012** « Inhibition of herpes simplex virus type 1 by thymol-related monoterpenoids. oct 2012;78(15):1636-8» *Planta Med*.
- [90] Hamdani.F, Ziri.S , Benallou.A , Djani.H, Belkacemi.A, **2021** «Fort potentiel antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et *Tetraclinis articulata* ».
- [91] M. K.I.,**2016** « History of Antibiotics Research. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*» p.237-272.
- [92] Taylor.SD et Palmer.M, **2016** «The action mechanism of daptomycin. *Bioorg. Med. Chem*» p. 6235-6268.

- [93] Mehdi.S, **2008** «La fréquence des bactéries multi résistante a l'hôpital Hassan ii de Settat .Thèse pour l'obtention de doctorat en pharmacie.RABAT,Université MOHAMMED.Faculté de médecine et pharmacie.» p. 48-51.
- [94] Meskine.A et Benabdelkader.L, **2016** «Etude de la résistance et la multirésistance aux antibiotique de souches .Spécialité : Microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes.».
- [95] Lavigne.J, **2007** «EFFETS DES ANTIBIOTIQUES et MÉCANISMES DE RÉSISTANCE, MB7 : Bactériologie, Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes.».
- [96] Julian.D, **2010** «Dorothy D Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev 74.,» p. 417–33.
- [97] Allen.HK, Donato J, Wang HH, et al Call of the wild, **2010** « antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol» p. 251–9.
- [98] Doyle.MP, **2006** «Antimicrobial resistance: implications for the food system. Compr Rev Food Sci Food Saf 5» p. 71–137.
- [99] Muylaert.A, Mainil, J.G, **2012** « Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Annales de Médecine Vétérinaire, Vol n°156. Université de Liège.» p. 109- 123.
- [100] Goossens.H, Guillemot.D, Ferech.M, Schlemmer.B, Costers.M, van Breda.M, Baker.LJ, Cars.O, **2006** «Davey PG National campaigns to improve antibiotic use. Eur. J. Clin. Pharmacol.» p. 373-379.
- [101] Yagupsky.P, **2006** « Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. Pediatr. Infect. Dis. J.» p. 974-976.
- [102] «<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s10298-017-1118-z.pdf>,».
- [103] Gedraitiene.A, Vitkauskiene.A, Naginiene.R, **2011** «Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria.» p. 137–46.
- [104] Dezdic.S, Suskovic.J, Kos.B,**2008** « Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. Food Technol».
- [105] J. GA, **2005** «Munoz-Price LS The new beta-lactamases. Engl J Med 352» p. 380–91.
- [106] P. K, **2004** «Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell Molife Sci 61:2200–23»
- [107] J. S, **2006** «Deb JK Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl Microbiol Biotechnol 70:140–50».
- [108] S. e. M. L. Levy, **1978** « Plasmid-Determined Tetracycline Resistance Involves New Transport-Systems for Tetracycline. Nature 276, p.90–92.».
- [109] A. e. S. H. Kumar, **2005** «Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 1486–1513.».

- [110] w. DG, **2005** «Alekhshun MN, McDermott PF *Frontiers in antimicrobial resistance: a tribute to Stuart B Levy*. ASM Press, washington, DC.».
- [111] A. L, Sutherland A, Srikumar R, **2002** «The mexR multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J Bacteriol* 184:4308–12».
- [112] S. MOA, Dantas G, Church GM, **2009** « Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 325:1128–31».
- [113] D. e. B. Y. Benaziza, **2017** «Etude de l'activité antibactérienne de certaines huiles essentielles sur un des agents responsables de Scombrototoxicité (*Klebsiella pneumoniae*). Mémoire de Master, Université Djilali Bounaama, Khemis Miliana, Algérie.».
- [114] « <https://laboratoireumani.fr/>, » .
- [115] B. C, Calsamiglia S, Chaves AV, **2008** «A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim Feed Sci Technol* 145:209–28».
- [116] C. SD, Mann CM, Markham JL, **2001** « Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 91:492–9».
- [117] H. RJ, 2004 «Rock CO Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *Curr Opin Invest Drugs* 5:146–53».
- [118] B. SA et R. RD, **2003** «Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36:162–7».
- [119] D. P. R, Betts.G, Hoskins.N, **2007** « Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 55:4863–70».
- [120] D. P, Swarup.S, Bhunia.A, **2007** « Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem Pharmacol* 74:831–40».
- [121] Chouhan, Sonam, Sharma, Kanika, Guleria, Sanjay, **2017** « Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. In : *Medicines*».
- [122] Denes.E et Hidri.N, 2009 «Synergie et antagonisme en antibiothérapie. In : *Antibiotiques*, vol 11, n° 2» p. 106-115.
- [123] Herve.C, **2017** «Potentialité in vitro de 10 huiles essentielles, seules ou en association, dans le traitement des infections bactériennes cutanées. Thèse d'état de doctorat en pharmacie. France : Université de Limogne.» p. 137.
- [124] Vieira.M, Lucinda.J.B, Rosario, M.M., Silvia, A., Antonio P.S., Teixeira, Angelo M., Paulo, M.DC et Anabela, D.F.B. **2017** «Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* LABILL. and *SevenMedit*».
- [125] Abdellaoui.A, **2018** «Étude de la Sensibilité Aux Huiles Essentielles de *Cinnamomum Verum*, *Eucalyptus Globulus*, et *Glycyrrhiza Glabra* L Ainsi qu'aux Antibiotiques de Certains Germes Issus de la Restauration Collective Milan Oba Samoussa, Abderrazak Abdellaoui, Anass Kettani».

- [126] Remmal.A, Hriouech.S et Akhmouch.A, **2020** «The Antistaphylococcal Activity of Amoxicillin/Clavulanic Acid,Gentamicin, and 1,8-Cineole Alone or in Combination and Their Efficacy through a Rabbit Model of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Osteomyelitis».
- [127] Aelenei.P , Rimbu C. M., Guguianu.E , Dimitriu.G , Aprotosoai.AC , Brebu.M , Horhoga.C. E et Miron.A , **2018** «Essential oil and linalool - interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Letters in Ap».
- [128] Valizadeh.S, Katirae.F ,Mahmoudi.R , **2016** «Étude des effets phytochimiques, antibactériens et antifongiques de Huiles Essentielles Thymus Vulgaris et Cuminum Cyminum : Département de la santé et de la sécurité alimentaire, Université Qazvin,Iran».
- [129] Remmal.A et S. Hriouech, **2020** «In Vitro and In Vivo Comparison of Changes in Antibiotics Susceptibility of E. coli and Chicken's Intestinal Flora after Exposure to Amoxicillin or Thymol.».
- [130] Monteil. H, **1992** « Bactériologie chimique. ére Ed. MarKeting. Paris.».
- [131] Farmer.J, Boatwright K. D , Janda J. M , **2007** «Enterobacteriaceae : Introduction and Identification. In Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L.; Pfaller, M. A.,(Eds.). Manual of Clinical Microbiology 9th ed.» p. 649-669.
- [132] UM et Maryse.Michèle, **2016** «Escherichia coli entérohémorragiques et/ou résistantes aux antibiotiques: contamination des effluents d'origine bovine.Thèse de doctorat en Microbiologie. Université de Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier).» p. 218.
- [133] VON.Baum, Heike, Marre et Reinhard, **2005** «Antimicrobial resistance of Escherichia coli and therapeutic implications. In : International Journal of Medical Microbiology, vol. 295, n° 6-7.» p. 503-511.
- [134] «<https://archimer.ifremer.fr/doc/00414/52540/53353.pdf>».
- [135] Garrity.G, Johnson, K.L, Bell, J and Searles, D.B. Bergy's, **2002** «Mannual of Systematic Bacteriology, second ed. Springer-verlag, New York.60.».
- [136] Dworkin.M, Falkow.S, Rosenberg.E, Schkeufer, K.H, Stackebrandt.E, **2006** «The Prokaryotes: Bacteria:Firmicutes, Cyanobacteria.3 eme éd.Springer,New-York,. Vol 4.».
- [137] Touaitia.R, **2016** « Thèse de Doctorat : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline : Emergence et mécanismes de résistance. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.».
- [138] Alioua.M, **2014** « Thèse de doctorat : Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de Staphylococcus aureus Résistant à la Méticilline. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.» p. 219.
- [139] Foster et Timothy.J, **2017** « Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. In: FEMS microbiology reviews vol. 41, n° 3 »p. 430-449.
- [140] Riffaud et Camille, **2019** «Etude fonctionnelle et régulations croisées de systèmes toxineantitoxine de type I exprimés par Staphylococcus aureus.Thèse de doctorat en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Rennes 1.» p.271.

- [141] «https://www.researchgate.net/figure/Morphological-view-of-Lactococcus-culture-under-microscope-100x-after-Gram-Staining_fig1_327238774».
- [142] J. Avril et F. e. M. Denis, **2000** «Bactériologie clinique. 3ème ed :Ellipes.» p. 310-311.
- [143] Eyquem.A et Montagnier.L., **2000** «Traité de microbiologie clinique.,» p. 238.
- [144] Flandrois.J et Carret.G, **1997** «Bactériologie médicale. Press universitaire de Lyon.» p. 209-210.
- [145] Liolios, C.C., G ortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I. Liposomal , **2009** « incorporation of carvuacrol and thymol isolated from the essential oil of *origanum dictamnus L.*» p. 12 -77-83.
- [146] Fraillery.D, **2001** « La mise au point de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez les souris et l'utilisation à des fins d'immunoprévention passive.».
- [147] Camille.D, **2007** « Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Ed : Lavoisier.» p. 339-354.
- [148] Hélène, **2008** « Brossard., Guy, Leyral ,Odette, Terry. Activités technologiques. Ed :Scérén.» p. 112-119.
- [149] Philippon.A, Bure.A, Legrand.P, Arlet.G, Jarlier.V et Paul.G, **1988** «Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. E».
- [150] Masuda.N, Sakagawa.E, Ohya.S, Gotoh.N, Tsujimoto.H et Nishino.T, **2000** «Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 44» p. 3322-3327.
- [151] Li.H, Luo.YF, Williams.BJ, Blackwell.TS et Xie.CM, **2012** « Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. Int J Med Microbiol 302» p. 63-68.
- [152] Shakil.S, Khan.R, Zarrilli.R et Khan.AU, **2008** « Aminoglycosides versus bacteria--a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. J Biomed Sci ». p. 15: 5-14.
- [153] Gulluce.M, Sahin.F et Sokmen.M, **2007** « Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. Food Chemistry, 103(4), 1449».
- [154] Chapuis.M, **2007** «Évaluation de l'activité antimicrobienne d'extraits de plantes par la méthode des aromagrammes (Doctoral dissertation, Université de Rennes 1).».
- [155] Singh.B et Singh.B, **2009** «Polyphenolics from various extracts/fractions of red onion (*Allium cepa*) peel with potent antioxidant and antimutagenic activities. Food Chemistry, Toxicol, 47.» p. 1161–1167.
- [156] Singh.R, Shushni.MA et Belkheir, **2011** «Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita L.* Arabian Journal of Chemistry. DOI: 10.1016/j.arabjc.2011.01.019L.».

- [157] Cosentino.S et Tuberoso.CI, **1999** «In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. Letters in Applied Microbiology, 29.» p. 130– 135.
- [158] Ponce.AG et Fritz.R, **2003** «Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. LWT - Food Science and Technology, 36(7)».
- [159] Burt.S, **2004** «Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology, 94 (3)» p. 223–253.
- [160] Oussalah.M, Caillet.S, Saucier.L et Lacroix.M, **2007** «Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E. coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. Food Control, 18(5)» p. 414 – 420.
- [161] Oussou.KR, Kanko.C, Guessend.N, Yolou.S, GERARD.K, Dosso.M, N'Guessan.YT et F. e. Chalchat.JC, **2004** «Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-D'ivoire. Comptes Rendus de Chimie., 10-11(7)».
- [162] Berenbaum.MC, **1978** « Infecter. Dis. ; 137 :,» p. 122–130 .
- [163] AFNOR, **2000** «huiles essentielles.Ed.paragraphie.Tomel-Echantillonnage et méthode d'analyse» p. 471.
- [164] Ponce.AG, Fritz.R, DelvalleC et Roura.SI, **2003** «Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard.LebensmittelWissenschaft and Technologic .» p. 679-684.
- [165] Djendli.sabiha et Bouali.leila, **2022** «Thèse : Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la plante.université frère Mentouri.».
- [166] Brophy.JJ, Goldsack.RJ et Fookes.CJR, **1991** «Variation in the leaf essential-oil Composition of Eucalyptus globulus Labill.AustJ Bot.;39(4)» p. 363-76.
- [167] Assagaf.H, **2022** «Singular and Combined Effects of Essential Oil and Honey of Eucalyptus Globulus on Anti-Inflammatory, Antioxidant, Dermatoprotective, and Antimicrobial Properties: In Vitro and In Vivo Findings».
- [168] Franchomme.P, Jollois.R et Penoel.D, **2001** « L'aromathérapie exactement : encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. s.l. : Roger Jollois, . 978-2878190014.».
- [169] «Contribution a l'étude comparative du rendement et des composés chimiques de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus L entre les feuilles âgées et les feuilles jeunes de la forêt de Harouza (Commune de Tizi-Ouzou).» 2016.
- [170] Mebarki.N, **2010** «.Extraction de l'huile essentielle de Thymus fontanesii et application à la formulation d'une forme médicamenteuse - antimicrobienne. Thèse de Doctorat Université M'hamed Bougara, Boumèrdes, Algérie.».
- [171] Venskutonis.R, **2012** « Thyme.In Handbook of herbs and spices Woodhead Publishing», p.499-525.
- [172] Zambonelli.A, Zechini D'Aulerio A, Bianchi A, **1996** « Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro J Phy topathol 144:491–4».

- [173] V. Brezáni et Karel, «Métabolites secondaires isolés du genre Eucalyptus».
- [174] Kwiatkowski.P, Pruss, A., Wojciuk, B., Dołęgowska, B., Wajs-Bonikowska, A., Sienkiewicz, M., Mezynska, M. et Łopusiewicz.L, **2019** «The Influence of Essential Oil Compounds on Antibacterial Activity of Mupirocin-Susceptible and Induced Low-Level Mupiro».
- [175] Bruneton.J, **1999** «Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris».
- [176] Sakkas.H et Gousia.P, **2016** « In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. Journal of Intercultural Ethnopharmacology. 5(3): 212».
- [177] M. B. Levy SB, **2004** «Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. Nat. Med.» p. 122-129.