

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 أوت 1955 - سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Intitulé

Etude comparative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon* avec l'action de quelques antibiotiques.

Présenté Par :

- ❖ Aoussat Hala
- ❖ Gouffi Roumaïssa
- ❖ Sebbagh Chahrazad
- ❖ Tandjir Loubna

Membre de Jury:

Mme. Aggoun A. (MCB)	Président	Université du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Ouamane S. (MCA)	Promoteur	Université du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Ghannem M. (MCB)	Examineur	Université du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

D'abord, nous remercions *Allah* le tout puissant pour nous donné le courage et la force et la patience et la volonté nécessaire de mener au terme ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude particulièrement à Mme *Quamane Souheila* notre encadreur d'avoir accepté d'encadrer, sa grande disponibilité, ses efforts, et son savoir dans le suivi tout le long de la réalisation de ce travail.

Nous tenons particulièrement à remercier les membres de *jury* d'avoir acceptés de juger ce travail :

Mr *Bouzebda* d'avoir accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de présider ce jury de mémoire. Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect.

Mme *Shannem* d'avoir d'examiner ce travail et de participer au jury de ce mémoire.
Veuillez accepter notre profonde gratitude.

Nous tenons aussi à remercier Monsieur *Zaid Nacer* le chef service de laboratoire de santé de la wilaya Skikda pour son disponibilité et son aide tout au long de notre stage.

Nous remerciments étendent également à tous nos *Enseignements* et nos *Doctorants* durent notre cursus universitaire et surtout l'adorable professeure Mme *Maachia*.

Sincères remerciements et gratitude à nos *Familles* qui nous a soutenus tout au long de notre parcours scientifique.

En fin, on souhaite démonter notre plus sincère gratitude à tous les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicaces

Je remercie tout d'abord Allah le tout puissant de nos avoir donné la santé, la patience, la puissance et la volonté pour réaliser ce mémoire.

A moi-même, je me remercie pour la patience, la force et l'effort que j'ai mis dans ce travail. Je suis fière de moi.

A mes chers parents Saad et Djamila, je remercie le Dieu parce que j'ai la chance d'avoir un papa et une maman exceptionnels, grâce à leurs tendes encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de notre étude. Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, mon considération et mes profonds sentiments envers eux. Que Dieu te donne longue de vie, santé et bonheur éternel.

A mes frères Walid et Adel, je leur souhaité le bonheur et la réussite dans leurs vies.

A la diplômée, Ouazzi Sabrina, de l'université de Bouira, qui m'a guidé pour la première fois dans le choix de ce thème d'étude. Merci beaucoup pour toutes les explications et les avis que vous m'avez donnés. Je souhaité le bonheur et Dieu que protège.

A mes copines dans ce travail; Hala, Chahrazad, Roumaissa. merci à tous les moments et les souvenir que nous avons passé ensemble. J'ai honoré de travailler avec vous.

A mes chères amies; Aya, Houda, Chaima, Narimane et mes camarades de la promotion M2 Microbiologie Appliquée, je vous souhaité une belle carrière professionnelle et une belle vie privé de joie et d'amour.

Tandjir Loubna...





Dédicace

Du profond de mon cœur, Je dédie ce modeste travail :

Avant toute chose je remercie Dieu Tout puissant pour m'avoir donné la force la volonté et la patience de continuité toute ma vie.

Aux deux être les plus chers au monde, qui ont souffert nuit Et jour pour nous couvrir de leur amour, Pour leur soutien et encouragements, La prunelle de mes yeux, et mon amour, ma mère.

À mon précieux offre du ALLAH et mon soutien, mon père.

A celui qui m'a toujours encouragée et soutenue moralement, la plus chère de mon cœur, Ma sœur.

À mes frères Qui m'ont soutenue dans les moments les plus difficiles.

A mes collègues qui ont travaillé avec moi pour atteindre les objectifs, Hala, Loubna et Chahrazad.

A mon meilleure amie Nechwa, qui me soutien, tu es plus qu'une amie, que dieu te garde dans ma vie.

Je prie Allah de vous récompenser pour tout ce que vous avez fait pour moi,

Que ses bénédictions soient sur vous tous et que notre vie soit remplie de réussite, de prospérité et de bonheurs.

*A mes camarades de la promotion **MD Microbiologie Appliquée**, je vous souhaite une belle carrière professionnelle.*

A toute ma famille et mes proches à mon cœur, qu'ils m'ont encouragé même avec un mot Gentil et toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Gouffi Roumaissa... 



Dédicace

Je commence par rendre grâce à Dieu tout puissant, pour la patience, La compétence et le courage qu'il m'a donné pour arriver à ce stade et de m'avoir donné la force d'accomplir mes études.

Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce modeste travail a :

Les deux personnes, les plus chers au monde mes parents pour tous leurs efforts et sacrifices. Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée, pour leur présence permanente, leur disponibilité, leur confiance et leur soutien en toutes circonstances mes chères parents : Saïd et Nadia

A mes chères sœurs Yasmine, Imene pour leurs encouragements permanents, et leur Soutien moral.

A mon cher frère Imed, pour leur appui et leur encouragement.

A ma cousine Nour El houda, une sœur qui m'a toujours soutenu.

A toutes mes amis, particulièrement Hadjer.

A mes collègues ; Loubna, Roumisa et Chahrazad, Je vous remercie pour vos soutiens moraux et encouragements, Vos patienteses vos dévouements à ce travail.

*A mes camarades de la promotion *MP Microbiologie Appliquée*, je vous souhaite une belle carrière professionnelle.*

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Aoussat Hala... 



Dédicace

A mes très chers parents Mr ABD ELOUHAB et Mme ZAGHDA ;

Qui m'ont tant offert sans jamais se lasser, qui m'ont transmis le désir et m'ont toujours accompagné tout au long de mes études avec leur amour, leur soutien, leur compréhension, leurs encouragements et leurs prières, et m'ont permis de devenir ce que je suis, avec tout amour et reconnaissance.

A mes sœurs, Aya, Ahlam, Sounia.

A mes frères, Abd Ellatif, Djalal, Abd Elhalim.

Aux enfants de ma sœur et de mon frère, Haroun, Haythem Et ma Belle Loudjien.

A mes amies, DJEGHADER Chaima et DJEGHADER Loubna.

Et mes collègues, Loubna, Hala et Roumaissa

A tous les moments qu'on a passé ensemble, à tout nos souvenirs !

Je vous souhaite à tous longue vie professionnelle pleine de bonheur et de prospérité.

Je vous dédie ce travail en témoignage de ma reconnaissance et de mon respect.

Merci pour tous les moments formidables qu'on a partagés.

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

Sebbagh Chahrazad ...



Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques de l'Est algérien, nous avons entrepris ce travail qui consiste à évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles obtenus à partir des feuilles d'*Eucalyptus globulus* et d'écorces de *Citrus limon* vis-à-vis de souches multi résistantes aux antibiotiques.

Les plantes étudiées ont été récoltés dans la région de Skikda, le rendement d'extraction obtenu de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est égal à 0,158% et celui de l'huile essentielle de *Citrus limon* égal à 0,169%.

Les résultats de l'antibiogramme sur milieu solide ont montré que sur quatre antibiotiques utilisés (Ampicilline, Tétracycline, Chloramphenicol, Gentamicin), les quatre souches bactériennes testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Staphylococcus aureus*), étaient sensibles à trois antibiotiques (Tétracycline, Chloramphenicol, Gentamicin) est sont résistantes à l'Ampicilline.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des deux plantes a été réalisée par deux méthodes, l'aromatogramme de diffusion en disques, et l'aromatogramme de diffusion en puits. Les résultats indiquent que les deux huiles essentielles ont un pouvoir inhibiteur important vis-à-vis les souches testées ; la méthode de diffusion en puits montrant plus d'efficacité.

Les rapports CMB/CMI obtenus par la méthode de dilution en milieu liquide ont montré que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est dotée d'une action bactéricide et que l'huile essentielle de *Citrus limon* présente une action bactériostatique.

A l'issu de ce travail, nous pouvons conclure que les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon* de l'Est algérien pourraient être exploitées comme des phytomédicaments pour soulever le problème des infections causées par des bactéries multi résistantes aux antibiotiques.

Mots clés : Activité antibactérienne, Antibiotiques, *Citrus limon*, *Eucalyptus globulus*, Huile essentielle.

Abstract

Within the framework of the valorization and aromatic plants of the Algerian east, we have taken this work which consists in evaluating the antibacterial activity of the essential oils obtained from the leaves of *Eucalyptus globulus* and peel of *Citrus limon* with to the multi-resistant strains to antibiotics.

The plants studied were harvested in the region of Skikda, the extraction yield obtained from the *Eucalyptus globulus* equal to 0,158% and the *Citrus limon* equal to 0,169%.

The results of antibiogram on solid medium showed that on four tested antibiotics (Ampicillin, Tetracycline, Chloramphenicol, Gentamicin) and the four tested bacterial strains: *Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *staphylococcus aureus*, are sensitive to the three ATB (tetracycline, chloramphenicol, gentamicin) and are resistant to the Ampicillin.

The evaluation of the antibacterial activity of the two plants was carried out by two methods: disc diffusion and the well diffusion. The results showed that both essential oils revealed a significant inhibitory power towards the tested strains with the most efficiency of the well diffusion method.

The CMB/CMI ration obtained by the liquid dilution method showed that the essential oils of *Eucalyptus globulus* had a bactericidal action and the essential oil of *Citrus limon* had a bacteriostatic action.

At the end of this work we can conclude that the essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Citrus limon* the Algerian east could be exploited as phytomedicines to raise the problem of infection caused by bacteria multi-resistant to antibiotics.

Key words: Antibacterial activity, Antibiotics, *Citrus limon*, *Eucalyptus globulus*, *Essential oil*.

الملخص

في إطار تثمين النباتات الطبية العطرية للشرق الجزائري، قمنا بإنجاز هذا العمل الذي يتمثل في تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت الأساسية المتحصل عليها من أوراق *Eucalyptus globulus* و قشور *Citrus limon* ضد سلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية.

تم حصاد النباتات المدروسة في منطقة سكيكدة ، ومردود الاستخلاص المتحصل عليه من أوراق *Eucalyptus globulus* يساوي 0.158% و قشور *Citrus limon* يساوي 0.169%.

أظهرت نتائج اختبار المضادات الحيوية الأربعة على الوسط الصلب Ampicilin, Tétracycline: *Escherichia coli*, Gentamicine و Chloramphenicol ضد السلالات البكتيرية الأربعة:

Pseudomonas aeruginosa, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* أنها حساسة لثلاثة مضادات حيوية Ampiciline, Tétracycline, Chloramphenicol و Gentamicine ومقاومين لـ Ampiciline.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للنباتات من خلال طريقتين طريقة نشر الأقراص وطريقة الثقوب. بينت النتائج أن الزيوت الأساسية أظهرت قوة مثبطة مهمة ضد السلالات المختبرة بفعالية كبيرة في طريقة الثقوب.

أظهرت نسب CMI / CMB المتحصل عليها من خلال طريقة التخفيف في الوسط السائل أن الزيت الأساسي *Eucalyptus globulus* يتمتع بمفعول مثبط قاتل لنمو البكتيريا وأن الزيت الأساسي *Citrus limon* يتمتع بمفعول كابح لنمو البكتيريا.

في نهاية هذا العمل يمكننا أن نستنتج أن الزيوت الأساسية المستخرجة من نبات *Eucalyptus globulus* و *Citrus limon* من شرق الجزائر يمكن استغلالها كأدوية عشبية لحل مشكل الالتهابات الناتجة عن البكتيريا متعددة المقاومة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية :

نشاط مضاد للبكتيريا، مضادات حيوية، *Eucalyptus globulus*، *Citrus limon*، زيت الأساسي.

Sommaire

Résumé

Liste d'abréviation

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction01

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les huiles essentielles04

1.1. Définition04

1.2. Répartition et localisation.....04

1.3. Composition chimique des huiles essentielles04

1.4. Rôle physiologique des huiles essentielles dans la plante04

1.5. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles05

1.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles05

1.6.1. Hydrodistillation05

1.6.2. Distillation à la vapeur d'eau.....06

1.6.3. Expression à froid06

1.6.4. Extraction par solvant.06

1.7. Activités biologiques des huiles essentielles.....06

1.7.1. Activité antibactérienne06

1.7.1. Activité antioxydante07

2. Présentation des plantes étudiées	08
2.1. <i>Eucalyptus globulus</i>	08
2.1 .1. Origine et classification.....	08
2.1.2. Description botanique	08
2.1.3. Composition chimique	09
2.1.4. Usages et propriétés thérapeutiques.....	09
2.2. <i>Citrus limon</i>	09
2.2.1. Origine et classification	09
2.2.2. Description botanique	10
2.2.3. Composition chimique	10
2.2.4. Usages et propriétés thérapeutiques.....	11
3. Les souches bactériennes étudiées et les antibiotiques	12
3.1. Les souches bactériennes	12
3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	12
3.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
3.1 .3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
3.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
3.2. Les antibiotiques.....	13
3.2.1. Définition d'antibiotiques	13
3.2.2. Modes d'action des antibiotiques	14
3.2.3. Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action	14

3.2.4. Définition d'antibiorésistance	14
---	----

Chapitre II : Etude expérimentale

1. Matériels et méthodes	17
1.1. Matériels.....	17
1.1.1. Matériel végétal	17
1.1.2. Matériel du laboratoire.....	18
1.2. Méthodes.....	18
1.2.1. Extraction des huiles essentielles.....	18
1.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne	19
1.2.2.1. Origine et choix des souches	19
1.2.2.2. Choix des milieux de culture	20
1.2.2.3. Identification des souches	20
1.2.2.4. Teste de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme par méthode de diffusion en disque.....	20
1.2.2.5. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielle.....	23
1.2.2.5.1. Aromatogramme par diffusion en milieu solide	23
1.2.2.5.1.1. Méthode de diffusion en disques	23
1.2.2.5.1.2. Méthode de diffusion en puits	24
1.2.2.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	25
1.2.2.5.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	26

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Rendement d'extraction.....	29
--------------------------------	----

2. Identification des souches testées.....	30
2.1. Observation macroscopique des colonies	30
2.2. Observation microscopique des colonies.....	31
3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	33
3.1. Teste de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme	33
3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	36
3.2.1. Aromatogramme de la diffusion en disques.....	36
3.2.2. Aromatogramme de la diffusion en puits.....	38
3.2.3. Étude comparative entre la méthode de diffusion en disques et la méthode de diffusion en puits.....	42
3.2.4. Étude comparative entre les résultats de l'antibiogramme et de l'aromatogramme des antibiotiques et les huiles essentielles	43
3.2.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	43
3.2.6. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	46
Conclusion et perspectives.....	51
Les références bibliographiques.....	54
Les annexes.....	64

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

AM: Ampicillin.

ARN: Acide Ribonucléique.

ATB : Antibiotique.

C° : Degré Celsius.

C: Chloramphenicol.

Cm: Centimètre.

CMB : concentration minimale bactéricide.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

CN: Gentamicine.

Do : Densité optique.

g : Gramme.

Gram- : Gram négatif.

Gram+ : Gram positif.

h : Heure.

HE : Huile essentielle.

HEs: Huiles essentielles.

IVU : Infection des voies urinaires.

L : Litre.

LPS : Lipopolysacharide.

MH: Mueller Hinton.

MHB : Bouillon Mueller Hinton.

Mg/m : Milligramme par millilitre

Mm: Millimètre.

nm : Nanomètre.

pH : Potentiel d'hydrogène.

R% : Rendement en Pourcentage %.

T : Témoin.

TE : Tétracycline.

Ul : Microlitre.

Um : Micromètre.

V : Volume.

V/V : Volume par volume.

α: Alpha.

β : Beta.

γ : Gamma.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
08	Arbre d' <i>Eucalyptus globulus</i> (photo original).	17
09	Arbre de <i>Citrus limon</i> (photo original).	17
10	Appareil d'hydrodistillation (photo original).	18
11	Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disques.	22
13	Méthode de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en disques.	24
14	Méthode de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en puits.	24
15	Protocole de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).	26
16	Protocole de la détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).	27
17	Coupe transversale des feuilles d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	29
18	Observation macroscopique des souches testées sur leurs milieux sélectifs.	30
19	Résultats de l'antibiogramme par la méthode diffusion en disques.	33
20	Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en disques de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	36
21	Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en disques de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i> .	37
22	Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en puits de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	39
23	Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en puits de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i> .	40
24	Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	44

25	Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>.	45
26	Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMB) (mg/ml-1) de l'huile essentielle d'<i>Eucalyptus globulus</i>.	46
27	Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMB) (mg/ml-1) de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>.	47

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
06	Liste des antibiotiques testés avec spectre d'activités pour les souches utilisées.	22
07	Résultats du rendement d'extraction d'<i>Eucalyptus globulus</i> et de <i>Citrus limon</i>.	29
08	Etude macroscopique des bactéries testées.	31
09	Observation microscopique des souches étudiées (avec grossissement X100).	31
10	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des antibiotiques testés.	34
11	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielles d'<i>Eucalyptus globulus</i> par la méthode de diffusion en disques.	37
12	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i> par la méthode de diffusion en disques.	38
13	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielles d'<i>Eucalyptus globulus</i> par la méthode de diffusion en puits.	39
14	Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielles de <i>Citrus limon</i> par la méthode de diffusion en puits.	40
15	Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'<i>Eucalyptus globulus</i>.	44
16	Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>.	45
17	Résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle d'<i>Eucalyptus globulus</i>.	47
18	Résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle de <i>Citrus limon</i>.	48



Introduction

Les antibiotiques sont des substances chimiques utilisés pour traiter les infections bactériennes. Leur action peut être bactéricide ou bactériostatique. Ces substances chimiques ont permis de réduire le taux de mortalités et de morbidité mondiales depuis longtemps (Bouyahya et *al.*, 2017).

Or, l'usage fréquent et excessif des antibiotiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne est l'un des principaux facteurs accélérant le phénomène d'antibiorésistance, ainsi que l'émergence de bactéries multi résistantes, faisant perdre leurs efficacités à de nombreux antibiotiques. La résistance aux antibiotiques constitue donc aujourd'hui un problème majeur de santé publique à l'échelle mondiale.

Actuellement, face à ce problème, les chercheurs motivés par la découverte de substances alternatives efficaces contre ces microorganismes, se sont tournés vers le monde végétal et plus exactement vers l'aromathérapie. L'aromathérapie repose fortement sur l'utilisation de molécules actives présentes au niveau des plantes aromatiques afin de soigner, calmer ou prévenir les maladies.

Ces molécules actives sont les huiles essentielles, qui sont des mélanges complexes odorant et volatils possèdent des activités biologiques.

Des études récentes ont montré que les huiles essentielles et leurs constituants représentent une ressource importante en tant qu'agents antimicrobiens. Elles possèdent une activité antibactérienne, antivirale, antimycotique, antioxydante, antiparasitaire, et aussi un effet insecticide (Bey Ould, 2014).

L'Algérie est un pays très riche en plantes médicinales qui poussent généralement à l'état spontané (Baba Aissa, 1991).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressées à deux espèces végétales répandues en Algérie et reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques, "*Eucalyptus globulus*" et "*Citrus limon*". L'objectif étant d'évaluer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de ces plantes vis-à-vis des bactéries multi résistantes.

Pour cela notre travail est structuré en trois chapitres :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique comprenant des généralités sur les huiles essentielles, une brève description des deux plantes étudiées et enfin des généralités sur les souches bactériennes testées et sur les antibiotiques.

Un deuxième chapitre correspond à la partie expérimentale de notre travail, il traite du matériel et des méthodes utilisées, il est axé sur :

-L'extraction des huiles essentielles.

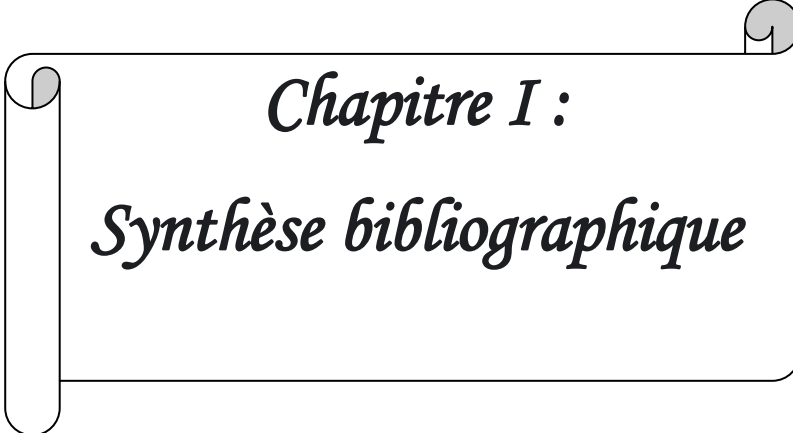
-Les tests de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme).

-L'évaluation in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles vis-à-vis des souches sélectionnées, en utilisant deux méthodes de l'aromatogramme : la méthode de diffusion en disques, et la méthode de diffusion en puits.

-Ainsi qu'une mise en évidence in vitro des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des huiles essentielles étudiées.

Le dernier chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

Et enfin, nous terminerons par une conclusion et des perspectives permettent d'améliorer ou de poursuivre notre travail.



Chapitre I :
Synthèse bibliographique

1. Les huiles essentielles

1.1. Définition

Le terme huile essentielle désigne la matière active d'un remède naturel (Burt, 2004). Les huiles essentielles (HE) sont des mélanges complexes de composés liquides, lipophiles, volatils et aromatiques ; synthétisés par les organes spécialisés des plantes aromatiques (Teuscher et *al.*, 2005). Une HE est défini par l'Organisation Internationale de Normalisation comme le produit obtenu à partir de matière végétale après séparation physique de la phase éventuellement aqueuse par distillation à l'eau, à la vapeur ou à sec, ou par traitement mécanique de l'exocarpe des agrumes (Feyaerts et *al.*,2020).

1.2. Réparation et localisation

Les huiles essentielles s'accumulent dans les cellules granulaires après leurs production dans le cytoplasme, elles sont stockés dans des poches sécrétrices (Bruneton ,1999 ;

Hazzit, 2002 ; Boz et *al.*, 2009).

Les HE sont stockés presque dans tous les organes de la plante, comme indiqué dans le tableau 01 (voir annexe I).

1.3. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont composées principalement par des hydrocarbures terpéniques (monoterpènes, sesquiterpènes et di terpènes) et des substances oxygénés (les esters, les aldéhydes, les cétones, les alcools, les phénols, les oxydes, les acides lactones, et des composés soufrés et azotés généralement en trace) (Lawless, 2002).

1.4. Rôle physiologique des huiles essentielles dans la plante

Les composants volatils, depuis longtemps considérés comme des métabolites secondaires, ont des rôles encore mal définis au sein des plantes (Obame, 2009).

La volatilité et le parfum des huiles essentielles aident les plantes à communiquer entre elles. En effet, ces substances jouent un rôle important en polinisant et en dispersant les spores, elles sont souvent défensives contre les agents pathogènes (microbes, insectes, champignons, herbivores) (Ariba et *al.*, 2020). Elles sont impliquées dans des processus allélopathiques (une

série d'interactions biochimiques) et des interactions tri trophiques. L'essence peut être une source d'énergie lorsque l'activité photosynthétique n'est pas suffisante (Deschepper, 2017).

1.5. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

On peut citer parmi les principales propriétés :

- ✓ Les huiles essentielles sont liquides à température ambiante, volatiles, aromatiques, et généralement incolore ou jaune pale.
- ✓ La densité des huiles essentielles est souvent élevée avec le pouvoir de rotatoire.
- ✓ Sont peu solubles dans l'alcool et les solvants organiques.
- ✓ On conserve les huiles essentielles dans des flacons en verre coloré bien bouchés (Bruneton, 1999 ; Durafour et Lapraz, 2012).
- ✓ Les HE s'oxydent à la lumière, elles absorbent l'oxygène et se transforment en résine en même temps.
- ✓ Le caractère lipophile des huiles essentielles leur permet de traverser très efficacement les membranes physiologiques notamment la peau (Touhami, 2017).

1.6. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Il existe de nombreuses méthodes pour extraire les huiles essentielles, et le choix d'utilisation de l'une de ces méthodes varie selon le type de plante, les caractéristiques physiques et chimiques de l'huile extraite, et aussi de l'usage prévu pour cette huile.

➤ Voici les principales méthodes d'extractions :

1.6.1. Hydrodistillation :

Elle consiste à immerger le matériel végétal entier dans un réacteur en le mettant directement en contact avec l'eau dans un distillateur puis à porte à ébullition. Le mélange « eau +HE » se condense sur la surface froide et huile essentielle est séparée par différence de densité. Cette technique est utilisée en laboratoire à l'aide d'un appareil du type Clevenger (Goore, 2017) (figure01) (voir annexe II).

1.6.2. Distillation à la vapeur d'eau :

Celle-ci consiste à faire passer de la vapeur d'eau à travers la matière végétale placée dans l'alambic. L'huile essentielle est libérée des tissus végétaux sous l'influence de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'HE est entraînée par la vapeur ; le mélange de « vapeur-HE » se condense sur une surface froide et après sont séparés par décantation (Bruneton, 1993) (figure02) (voir annexe III).

1.6.3. Expression à froide :

C'est une technique physique spécifique aux agrumes qui écrase l'écorce pour en extraire l'essence. Les composés volatiles ne subissent pas de modification chimique (Obame, 2009) (figure 03) (voir annexe IV).

1.6.4. Extraction par solvant :

Les plantes sont immergées dans un solvant, qui fonctionne pour extraire l'huile essentielle de la plante. On utilise cette méthode pour extraire les huiles essentielles des fleurs délicates à la distillation par la vapeur (Gregory, 2013) (figure04) (voir annexe V).

1.7. Activités biologiques des huiles essentielles**1.7.1. Activité antibactérienne**

La majorité des plantes aromatiques et leurs huiles essentielles ont des propriétés antimicrobiennes qui peuvent arrêter/ inhiber la croissance des micro-organismes nuisibles et pathogènes, et ainsi améliorer considérablement la sécurité alimentaire (Sacchetti et *al.*, 2005 ; Souza et *al.*, 2006).

L'activité biologique des huiles essentielles est liée principalement à leurs compositions chimiques. De façon générale, les composés oxygénés ont une plus forte action que les composés hydrocarbonés (Guinoiseau, 2010).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles est une combinaison de plusieurs modes d'actions, sur différents sites cellulaires (Ouis, 2015).

Ces actions consistent à des modifications morphologiques bactériennes telles que la précipitation des protéines et des acides nucléiques, ou encore l'inhibition de la formation des ADN, ARN, protéine et peptidoglycanes (Cusson, 2018).

1.7.2. Activité antioxydante

L'activité Antioxydante est déterminée par des groupes fonctionnels spécifiques, c'est le cas des alcools, éthers, cétones, mono terpéniques et aldéhydes tels que : linalol, 1,8-cinéol, géraniale, citronellal et certains monoterpènes, dont le γ -terpinène et l' α -terpinolène (Edris, 2007).

Lorsqu'on parle d'activité antioxydante, on distingue deux types selon le degré d'action (Chemloul, 2014) :

- Activité primaire :

Les composés sont interrompus dans la chaîne d'oxydation anticatalytique.

- Activité prophylactique :

Les composés sont capables de retardés l'oxydation par des mécanismes indirects.

2. Présentation des plantes étudiées

2.1. *Eucalyptus globulus*

2.1.1. Origine et classification

Le terme *Eucalyptus* dérive du mot grec «*eu* » : vrai et «*Kalyptus* » : couvercle ou opercule (Slimani, 2009).

Eucalyptus globulus, a été découvert en 1792 par le botaniste français la Billardier. C'est un arbre originaire de Tasmanie (Australie) (Koziol, 2015). Mais on le retrouve également en Amérique du Sud, en Afrique et en Europe où il a appris à s'acclimater (Abdounai et Merghadi, 2021).

La classification d'*Eucalyptus globulus* est montrée dans le tableau 02 (voir annexe VI).

2.1.2. Description botanique

Eucalyptus globulus, de la famille des myrtes, est également connu sous les noms de "gommier bleu", "arbre à koala" et "arbre à fièvre". Il peut atteindre 30 à 40 mètres de hauteur. (Djendli et, Bouali 2022).

-Le tronc comprend une écorce à la base foncée et rugueuse et, en hauteur, lisse et gris cendre.

-Les feuilles sont persistantes, coriaces, glabres mais différentes en fonction de l'âge des rameaux :

- Les jeunes rameaux : possèdent des feuilles larges, courtes, opposées, sessiles, ovales, bleu-blanc et cireuses, avec un vrai limbe nervuré.
- Les rameaux plus âgés : possèdent des feuilles aromatiques, falciformes, longues de 12 à 30 cm, étroites, pointues, épaisses, vert foncé, courtement pétiolées, alternes et pendantes verticalement

-Les fleurs naissent à l'aisselle des feuilles de couleur blanc crème.

-Le fruit ligneux est une grosse capsule glauque prenant une teinte marron à maturité, dure, anguleuse et verruqueuse.

-Les Eucalyptus sont connus pour leur capacité à coloniser des terrains nus ou dévastés à cause de leurs graines très nombreuses (Bey Ould, 2014).

-Le bois : Brun-jaune clair, texture lâche, fibre fréquemment entrecroisées (Reghaissia, 2020). La figure 05 montre un dessin d'arbre *Eucalyptus globulus* (voir annexe VII).

2.1.3. Composition chimique

- Les principaux constituants dans la feuille sont:

Les flavonoïdes, les flavines, les acides phénols, les tanins galliques, les aldéhydes phloroglucidiques, les substances lipidiques anti oxydantes et les huiles essentielles (Sarda, 2012).

Les principaux constituants de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sont présentés dans le tableau 03 (voir annexe VIII).

2.1.4. Usages et propriétés thérapeutiques

L'Eucalyptus est traditionnellement utilisé pour traiter les infections respiratoires aiguës et chroniques, car c'est un anti-infectieux et un antiseptique des voies respiratoires (Ariba et *al.*, 2020).

Il possède des propriétés antibactériennes et cicatrisantes en raison de la présence de 1,8-cinéole, il est utilisé pour désinfecter les blessures, les brûlures et même les plaies (Sugumar et *al.*, 2014). Cet arbre est efficace pour traiter les bronchites, gripes et affections pulmonaires et pour soigner les maux de passage (Ariba et *al.*, 2020).

2.2. *Citrus limon*

2.2.1. Origine de *Citrus limon*

L'espèce *Citrus limon* plus connu sous le nom de citron, appartient à la famille des Rutacées et au genre Citrus. Le Citron est d'origine asiatique plus exactement d'Asie du Sud Est et de l'Inde (Boukabache et Boudjefdjouf, 2016).

La classification de *Citrus limon* est montrée dans le tableau 04 (voir annexe IX).

2.2.2. Description Botanique

C'est une tonnelle méditerranéenne robuste avec des branches qui atteignent 2 à 4 mètres de hauteurs. Les feuilles du citronnier sont vivaces, alternes entre le vert foncé et luisantes, et sont pales sur les bords, une forme fusiformes odoriférants longues de 6 à 11 cm qui a des pétioles sporadiquement ailés. Les feuilles sont très parfumées en raison des nombreuses poches riches en huile essentielle. Les fruits ont des formes ovales et sont juteux, acides, intensément parfumés (Brahmane et Djebrit ,2022).

Une écorce jeune assez épaisse remplie de glandes sébacées, sous laquelle on trouve une pulpe blanche spongieuse de la pectine, riche en antioxydants tels que la vitamine C et les flavonoïdes (Berkani, 2022). Le jus est généralement riche en acides citriques et juteux, avec quelques pépins, ce qu'il donne sa saveur acide (Brahmane et Djebrit ,2022).

2.2.3. Composition chimique

- Les principaux consistants chimiques du ciron sont :

-Le citron est un fruit très juteux avec une teneur en eau de 90% et une acidité élevée (pH inférieur ou égal à 3).

-L'acidité est principalement due à l'acide citrique avec des quantités d'acide malique, caféique, et ferulique.

-Une large gamme de vitamine B avec une teneur élevée en vitamine C et des grandes quantités de flavonoïdes.

-Une teneur de glucides faible mais les fibres représentent 2.1% du poids total (cellulose, pectine, hémicellulose), avec une teneur de protéine ne dépassant pas 1g /100g.

-Le Citron contient divers minéraux comme le potassium qu'est le minéral le plus abondant (Bouacherine et Boudraa, 2018).

- La composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus limon* :

Celle-ci varie en fonction de la saison, de la maturité du fruit et de son origine géographique. La composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus limon* est présentée dans le tableau 05 (voir annexe X).

2.2.4. Usages et propriétés thérapeutiques

De nombreuses études ont montré que les citrons sont riches en substances actives tels que les composés phénoliques et les flavonoïdes, qui sont utilisées dans les domaines thérapeutiques, cosmétiques ou alimentaires (Hama et Asloune, 2017).

Le citron est utilisé en médecine comme antiseptique naturel mais il est aussi pour d'autres

Propriétés : antirhumatismale, anti-scorbique, antifatigue, diététique, digestive, expectorante, contre les effets causés par les allergies (Bousbia, 2011).

Le citron a été utilisé contre l'insomnie, l'asthme et pour dissoudre des cristaux rénaux (Okwu et Emenik, 2006). Il est utilisé aussi en parfumerie, il entre dans la composition de nombreux parfums (Bousbia, 2011).

3. Les Souches Bactériennes étudiés et les antibiotiques

3.1. Les Souches Bactériennes

3.1.1. *Escherichia coli*

En 1885, elle a été décrite par le pédiatre allemand Theodore ESCHERICH (1857-1911) dans les excréments d'un enfant souffrant de diarrhée et il l'a nomma *Bacterium coli* commune (Mainil, 2013). *Escherichia coli* est un bacille de forme bâtonnet ou coco bacillaire, de 2 à 3µm de longueur et 0,6µm de largeur, à Gram négatif, mobile grâce à une ciliature péritriche, non sporulé, encapsulé. Les colonies développées par cette bactérie ont un aspect bombé, lisse, homogène, ronde à bord régulier et de 2 à 3 mm de diamètre (Ousaad et Rabet, 2017). Elle joue le rôle d'une bactérie commensale mais peut devenir pathogène suite à l'acquisition des facteurs de virulence (Ayad, 2017). Sa virulence confère à *Escherichia coli* la capacité d'échapper aux défenses de l'hôte et de développer une résistance aux antibiotiques courants. *Escherichia coli* peut causer des infections des voies urinaires (IVU), une pneumonie, une bactériémie et une péritonite, entre autres (Mueller et Tainter, 2023).

3.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

C'est le pharmacien français Carle Gessard qui a décrit pour la première fois *Pseudomonas aeruginosa* dans son étude « Sur la coloration bleue et verte des bandages » en 1882 (Diggle et Whiteley, 2020).

C'est une bactérie Bacille à gram négatif, très mobile (possède des flagelles polaires), aérobie, non sporulé et elle a la capacité de résister à de nombreux antibiotiques et aux antiseptiques (Hellal, 2011). Elle est pathogène opportuniste contaminant particulièrement tous les milieux aquatiques. On la retrouve sur les mains des soignants, mais surtout dans les conduites d'eau, les réservoirs, les siphons, et surtout les aérosols produits lors de la chasse d'eau des sanitaires. Elle représente 11% des infections nosocomiales, incluant les infections des voies urinaires, du sang, des plaies et des voies respiratoires (Pibiri, 2006).

3.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

Le nom *Klebsiella* a été nommé par le bactériologiste Klebs en 1877. (Boughachiche et Sebais, 2016). C'est une bactérie qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, immobiles et non flagellés. *Klebsiella pneumoniae* est un

pathogène opportuniste qu'on retrouve couramment dans la nature, les végétaux, le tube digestif de l'Homme et des animaux, et dans les voies respiratoires (Merabet et Sekhsoukh, 2020). Il est opportuniste et peut causer de nombreuses infections comme la pneumonie, des infections des voies urinaires, bactériémie, principalement chez les personnes hospitalisées ou immunodéprimées (Bengoechea et *al.*, 2019).

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* sont devenues de plus en plus résistantes aux antibiotiques, ce qui rend l'antibiothérapie plus difficile. (Wyres et *al.*, 2018).

3.1.4. *Staphylocoques aureus*

Staphylocoque aussi appelé staphylocoque doré, nommé ainsi par Rodenbach en 1884. En effet, la production de caroténoïdes confère aux bactéries une pigmentation superficielle caractéristique (Badaoui, Cherouat et Defif, 2020). Les genres staphylocoques appartiennent à la famille des Micrococcaceae, présent dans l'eau, le lait, l'air ...etc. (Hellal, 2011). Cette bactérie sont de forme Cocci à Gram positif et majoritairement sont aérobie-anaérobie facultatives, non sporulés, non mobiles et non capsulé. Ils sont appelés aussi Staphylocoques à coagulas positive ou négative et à catalase positive (Kaim et Kouache, 2020). *Staphylocoques aureus* est une bactérie responsable à des infections bactériennes les plus courantes chez l'Homme, y compris la bactériémie, l'endocardite infectieuse, les infections de la peau et des tissus mous, ostéomyélite, arthrite septique, infections de prothèses, infections pulmonaires, gastro-entérite, méningite, syndrome de choc toxique et infections des voies urinaires (Tong et *al.*, 2015).

➤ Cependant, la mauvaise application des antibiotiques, leur utilisation excessive, la flexibilité et la plasticité mutable des microorganismes notamment les bactéries, ont conduit au développement d'un programme spécifique de résistance et ont permis à certaines espèces de se défendre contre l'action des antibiotiques (Bouyahya et *al.*, 2017).

3.2. Les antibiotiques

3.2.1. Définition d'antibiotiques

Le terme antibiotique dérive du grec anti (« contre ») et bios (« vie »), les antibiotiques sont des substances naturelles, hémi-synthétiques ou synthétiques qui sont capables d'inhiber la croissance bactérienne ou de tuer les bactéries (Veyssiere et *al.*, 2019). Les antibiotiques sont

des agents chimio thérapeutiques qui peuvent être synthétisés par des micro-organismes ou par méthodes chimiques indépendantes de l'activité microbienne (Chebbah et *al.*, 2010).

3.2.2. Modes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne. Il existe 5 modes d'action :

- ✓ Perturbation de la synthèse du peptidoglycane
- ✓ Altération de la paroi
- ✓ Perturbation de la synthèse des protéines
- ✓ Perturbation de la synthèse des acides nucléiques
- ✓ Antibiotiques agissant par inhibition compétitive (Mokrani et Hamdani 2017).

3.2.3. Classification des antibiotiques selon leurs sites d'action (Prescott et *al.*, 2010).

Les antibiotiques sont regroupés selon leurs sites d'action comme suivant :

- Les lactamines, et les glycopeptides, inhibaient la synthèse de la paroi cellulaire.
- Les poly myxines, modifiaient la perméabilité de la membrane cytoplasmique.
- Les aminosides, les macrolides, les tétracyclines et les chloramphénicols, inhibaient la synthèse protéique.
- Les rifampicines, les quinolones, inhibaient la synthèse des acides nucléiques.
- Les sulfamides et les triméthoprime, inhibaient des voies métaboliques de l'acide folique.

Les modes d'action des antibiotiques sont montrés dans la (figure 06) (annexe XI).

3.2.4. Définition de l'antibiorésistance

L'antibiorésistance ou résistance bactérienne est définie comme la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques ou des biocides supposés contrôler leur croissance ou les tuer (Sophie, 2014).

➤ Il existe deux origines de résistances aux antibiotiques :

- a) **Naturelle ou intrinsèque** : est un caractère présent chez toutes les bactéries de la même espèce ou de même genre bactérien. Elle délimite le spectre d'action de l'antibiotique. (Azmoun, 2016).

b) Acquisie : ne concerne que quelques souches d'une même espèce mais peut s'étendre

(El Brahmi, 2013). Elle peut se faire soit par mutation génétique ou par acquisition des gènes transférables d'un autre microorganisme (Aboya, 2013).

Les deux grands types d'antibiorésistance, la résistance naturelle ou intrinsèque et la résistance acquise sont indiquée dans la (figure 07) (voir annexe XII).



Chapitre II :

Etude expérimentale

Notre travail a été effectué au sein de deux laboratoires : l'extraction des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon* a été réalisée dans laboratoire COOPERATIVE AGRICULTITRRE RUTAL WOMAN (El Harouche, Skikda). Alors que la détermination de l'activité antibactérienne pour les deux huiles essentielles a été réalisée au niveau du laboratoire de la Santé de la Wilaya (Merdj Eddib, Skikda).

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

1.1.1. Matériel végétal

Deux plantes ont été utilisées dans cette étude (*Eucalyptus globulus*, *Citrus limon*) (figures 08 et 09). Les feuilles d'*Eucalyptus globulus* ont été récoltées dans la région de la Cité Aissa Boukerma (Skikda), et les fruits de *Citrus limon* ont été récoltés dans la région d'El Hadaiek (Skikda), durant la période du Mois Mars 2023.



Figure 08 : Arbre d'*Eucalyptus globulus* **Figure 09 :** Arbre de *Citrus limon*

(Photo original).

(Photo original).

1.1.2. Matériel du laboratoire

L'ensemble des matériels, appareils et produits utilisés dans notre travail seront cités au fur et à mesure de leur utilisation.

1.2. Méthodes

1.2.1. Extraction des huiles essentielles

➤ Principe d'extraction utilisée

L'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et *Citrus limon*, a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un montage similaire à un dispositif de type Clevenger.

Ce montage est constitué d'une cocotte en aluminium de 70 L de capacité, placée sur un chauffage à gaz naturel, et surmontée d'un tube en cuivre qui la relie au condenseur. Ce dernier est formé d'un serpentin de cuivre prolongé dans un réfrigérant ou circule de l'eau fraîche en permanence. Puis le mélange « l'huile essentielle et l'eau » est récupéré dans un essencier et séparé après par une ampoule à décanter (figure 10).



Figure 10 : Appareil d'Hydrodistillation (Photo original).

➤ Mode opératoire d'extraction

- Pour l'HE d'*Eucalyptus globulus*, nous avons mis dans la cocotte 7kg de feuilles d'*Eucalyptus* avec 17 litre de l'eau distillée.

- Pour l'HE de *Citrus limon*, on a mis 5kg d'écorces de Citron avec 15 litre d'eau distillée.
- Après 3heurs de distillation, l'extraction permet à d'obtenir deux phases huile essentielle et hydrolat.

Le rendement

Le rendement de l'extraction de nos huiles correspond au rapport entre le poids de l'huile essentielle extraite et le poids de la matière végétale.

Le rendement, exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{M \text{ huile}}{M \text{ plante}} \times 100$$

R : Rendement en huile essentielle (%).

M huile : Masse de l'huile essentielle en g.

M plante : Masse de la plante en g.

Conservation de l'huile essentielle

Une fois l'HE récupérée, elle est conservée à 4°C dans des flacons opaques en verre à l'abri de la lumière et l'humidité pour une utilisation ultérieure.

1.2.2. Evaluation de l'activité antibactérienne

1.2.2.1. Origine et choix des souches

Les souches utilisées ont été fournies par le laboratoire d'analyses médicales « Al Amal », (Skikda). Nous avons sélectionnés ces bactéries en fonction de leur pouvoir pathogène pour l'Homme. Elles sont entre tenues par repiquage sur gélose sélective favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C. Ont été testées 3 bactéries à Gram- et une bactérie à Gram+ :

- **Les bactéries à Gram négatif**

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*

- **Bactérie Gram positif**

Staphylococcus aureus

1.2.2.2. Choix des milieux de culture

Selon les méthodes utilisées dans l'essai et selon les souches, nous avons utilisés les milieux suivants :

- La gélose Hektoen et Chapman pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.
- La gélose Mueller Hinton pour l'étude de la sensibilisation des bactéries aux antibiotiques et les huiles essentielles.

1.2.2.3. Identification des souches

➤ **Examen microscopique**

Coloration de Gram

Après fixation des bactéries sur une lame à l'aide d'un bec benzène, on dépose quelque goutte de violet de gentiane, on laisse agir 4 à 6 secondes et on égoutte sans rance. Par suite, on dépose quelques gouttes de lugol, puis nous avons lavées la lame avec l'alcool. Enfin, nous ajoutons une goutte de la fuchsine. Après séchage, on passe à l'observation microscopique (Romdhane, 2011).

1.2.2.4. Teste de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme par méthode de diffusion en disque

➤ **Principe**

Cette méthode consiste àensemencer à la surface d'une gélose une quantité calibrée de la souche à tester puis d'y déposer un disque d'antibiotique. La croissance bactérienne va se faire autour du disque d'antibiotique en créant un halo d'inhibition de la croissance bactérienne (Leysour, 2020).

➤ Mode opératoire

Préparation de l'inoculum

-A partir d'une culture pure de 24h sur milieu gélose sélectif, racler à l'aide d'une anse de platine 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques.

-Décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, bien homogénéiser la suspension bactérienne, et passer dans un spectromètre pour confirmer que l'opacité est équivalente à 0,5 McFarland c'est à dire d'une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625nm. Attende 15 minutes puis faire l'ensemencement.

Ensemencement

-On chauffe au bain-marie le milieu Mueller Hinton, ensuite couler dans les boites pétries à une épaisseur de 4mm.

-Après solidification de la gélose, tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum, en le tournant sur la paroi interne de tube afin de décharger au maximum.

-Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose en stries serrées, répéter l'opération 3 fois en retournant la boite de 60° à chaque fois, et finir par passer l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Application des disques d'antibiotiques

-Les disques d'antibiotiques ont été placés à l'aide d'une pince stérile dans la boite pétrie.

-Le nombre de disques par gélose, leurs positions et la distance entre ces derniers sont des paramètres sur lesquels une attention particulière doit être portée (Leysour, 2020).

-Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h.

La lecture

-La lecture du diamètre d'inhibition de croissance se fait à l'œil nu. Les diamètres doivent être mesurés en millimètre à l'aide d'un pied à coulisse métalliques ou bien une règle.

-Selon le diamètre de disques en classe les bactéries dans l'un des catégories : sensibles, intermédiaire, résistantes (Andrews, 2001).

La figure 11 représente la technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disques.

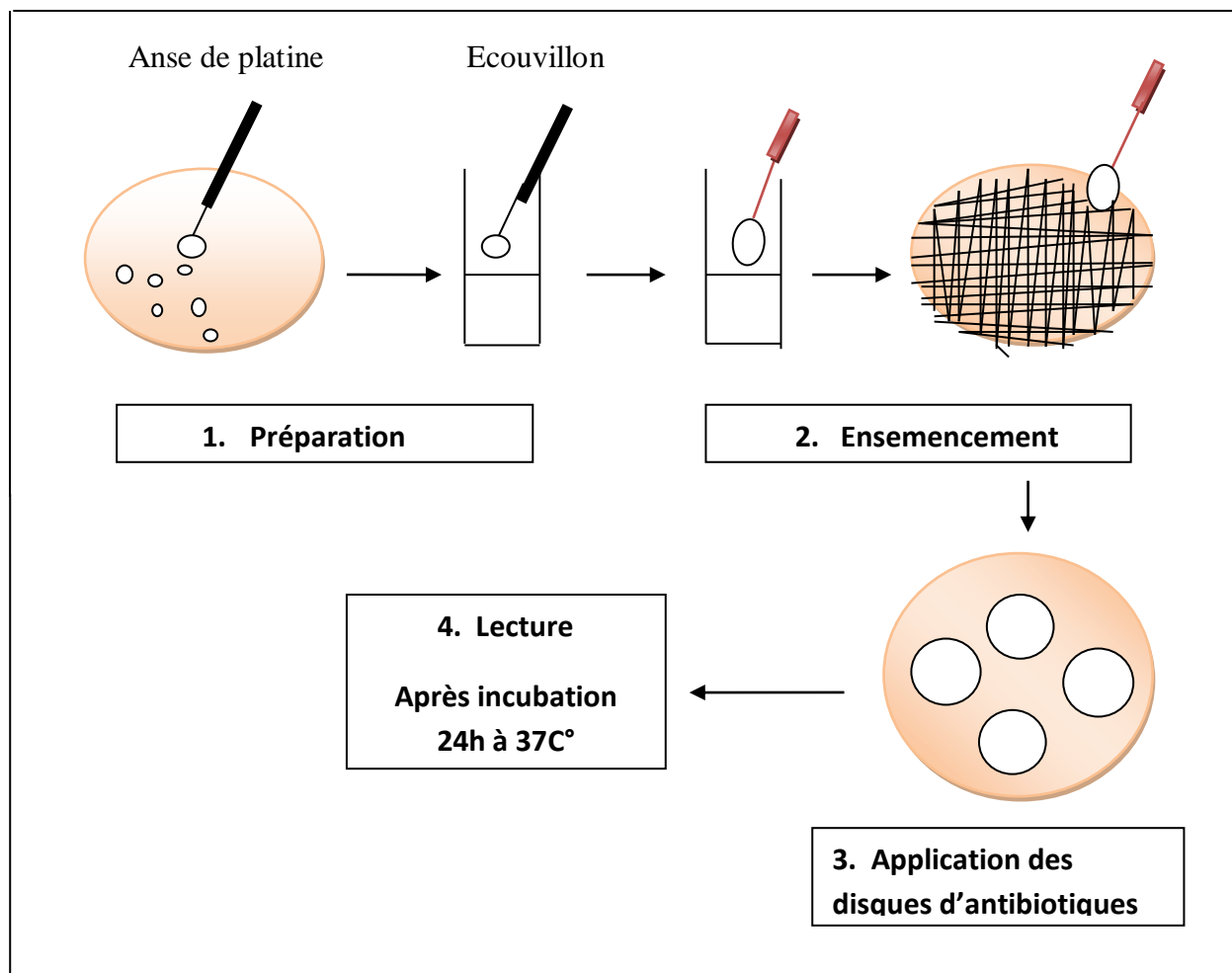


Figure 11 : Technique de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque.

Le tableau 06 est présente la liste des antibiotiques testés avec leurs spectres d'activités.

Tableau 06 : Liste des antibiotiques testés avec spectre d'activités pour les souches utilisées

Famille	Antibiotique	Gram+	Gram-
B-lactamines	Ampicilline (AM)	+	+
Tétracyclines	Tétracycline (TE)	+	+
Phénicolés	Chloramphenicol (C)	+	+
Aminosides	Gentamicine (CN)	+	+

1.2.2.5. Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

Dans notre travail l'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et l'huile essentielle de *Citrus limon* sur un vitro vis-à-vis des souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, a été réalisé par les techniques suivantes :

1.2.2.5.1. Aromatogramme par diffusion en milieu solide

➤ Principe

C'est une méthode de mesure in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles. Différent types d'aromatogrammes en milieu solide ou liquide sont exploitables. Cependant en pratique quotidienne, c'est le milieu solide qui est le plus simple et le plus facilement reproductible (El Amri et *al.*, 2014). Cette méthode équivaut à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles.

1.2.2.5.1.1. Méthode de diffusion en disques

➤ Mode opératoire

Préparation des disques

-A partir de papier Whatman, nous avons coupés des disques de 6 mm, ces disques sont mis dans une boîte en verre recouvert de papier aluminium, puis en stérilisés à l'autoclave à 180°C pendant 30 minute.

La figure 12 montre un tube stérile contenant les disques de papier Whatman. (Voir annexe XIII).

Préparation d'inoculum

A partir d'une culture pure de 24h sur milieu gélose sélectif :

-On mélange 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques avec une quantité de 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%, son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland c'est-à-dire d'une DO de 0,08 à 0,10 lue à 625nm.

Ensemencement

-Après solidification de la gélose Mueller Hinton, ensemercer la surface de la gélose par la méthode d'écouvillonnage avec l'inoculum.

-Un disque de papier Whatman stérile imprégné de l'huile essentielle est placé à la surface de la boîte de pétrie, et accompagné d'un disque témoin imprégné de bouillon MH avec tween 80.

-Incuber les boîtes à 37°C pendant 24h.

La figure 13 montre la méthode de l'aromatogramme par diffusion de disque.

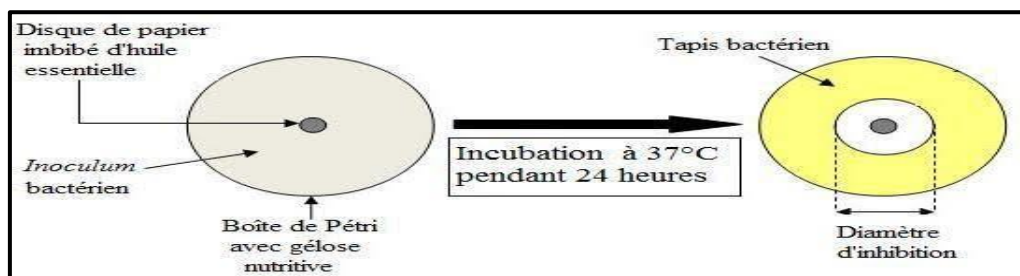


Figure 13 : Méthode de l'aromatogramme par diffusion de disque (Zaibet, 2016).

1.2.2.5.1.2. Méthode de diffusion en puits

➤ Mode opératoire

-C'est le même mode opératoire que la méthode des disques, sauf qu'au lieu de placer des disques de papier Whatman, on coupe des puits d'un diamètre de 6mm sur la gélose de Mueller Hinton (fig14a), à l'aide d'un emporte-pièce au bien d'une pipette stérile. Puis à l'aide d'une micropipette, on remplit les puits par une quantité de 50 ul de l'huile essentielle (fig14b). Un puit témoin a été rempli avec de bouillon MH avec tween 80.

-Incubation 37°C pendant 24h (fig14c).

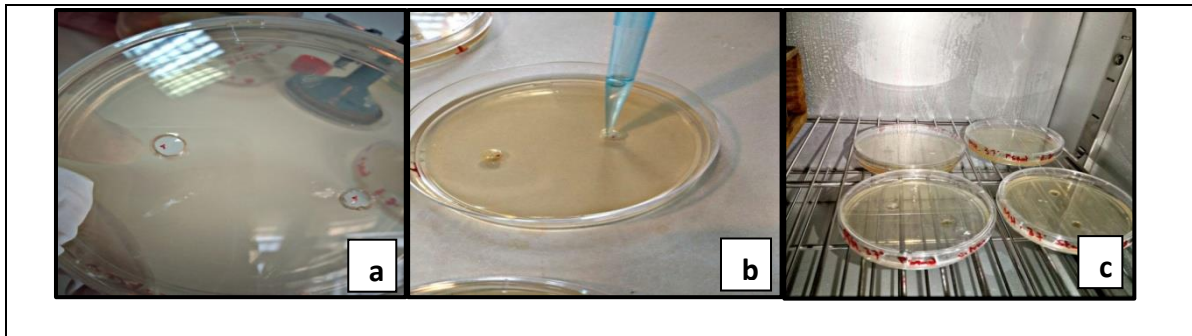


Figure 14 : Méthode de l'aromatogramme de diffusion en puits.

-Lecture de l'aromatogramme

La sensibilité aux différentes huiles essentielles est appréciée selon le diamètre des zones d'inhibition comme suit :

-Non sensible : pour le diamètre < 8mm

-Sensible (+) : pour un diamètre entre 9-14 mm

-Très sensible (++) : pour un diamètre entre 15-19 mm

-Extrêmement sensible (+++) pour le diamètre plus que 20 mm (Ponce et *al.*, 2003).

1.2.2.5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

➤ Principe

Cette technique consiste à inoculer, par un inoculum standardisé, une gamme de concentration décroissante en huile essentielle. Après incubation, l'observation de la gamme permet d'accéder à la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne (Guinoiseau, 2010).

➤ Mode opératoire

Nous avons utilisées **la technique de macrodilution en milieu liquide** selon le protocole de (Bouchaale et *al.*, 2015):

400 μl de l'huile essentielle à tester sont placés dans un tube stérile contenant 4,6 ml de milieu MHB, supplémenté en tween 80 (0,001%, v/v). Une dilution en cascade est effectuée dans un milieu MHB-tween 80 (0,01%, v/v), de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 80 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et 0,3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (fig15a).

13 μl d'un inoculum bactérien, de densité équivalente au standard 0,5 de McFarland (10^8 ufc. mL^{-1}), sont déposés dans chacun des tubes de la gamme, ceux-ci sont ensuite placés à 37°C sous agitation, pendant 24h. Un témoin de la croissance bactérienne est réalisé, il contient 13 μl de l'inoculum standardisé dans du milieu MHB-tween 80 (0,001%, v/v), est réalisée (fig15b).

Après incubation, les tubes sont centrifugés à 5000g, pendant 5 minutes à 210°C. La CMI (% v/v) de l'huile essentielle testée est déduite à partir du premier tube de la gamme dépourvu de croissance bactérienne (fig15c).

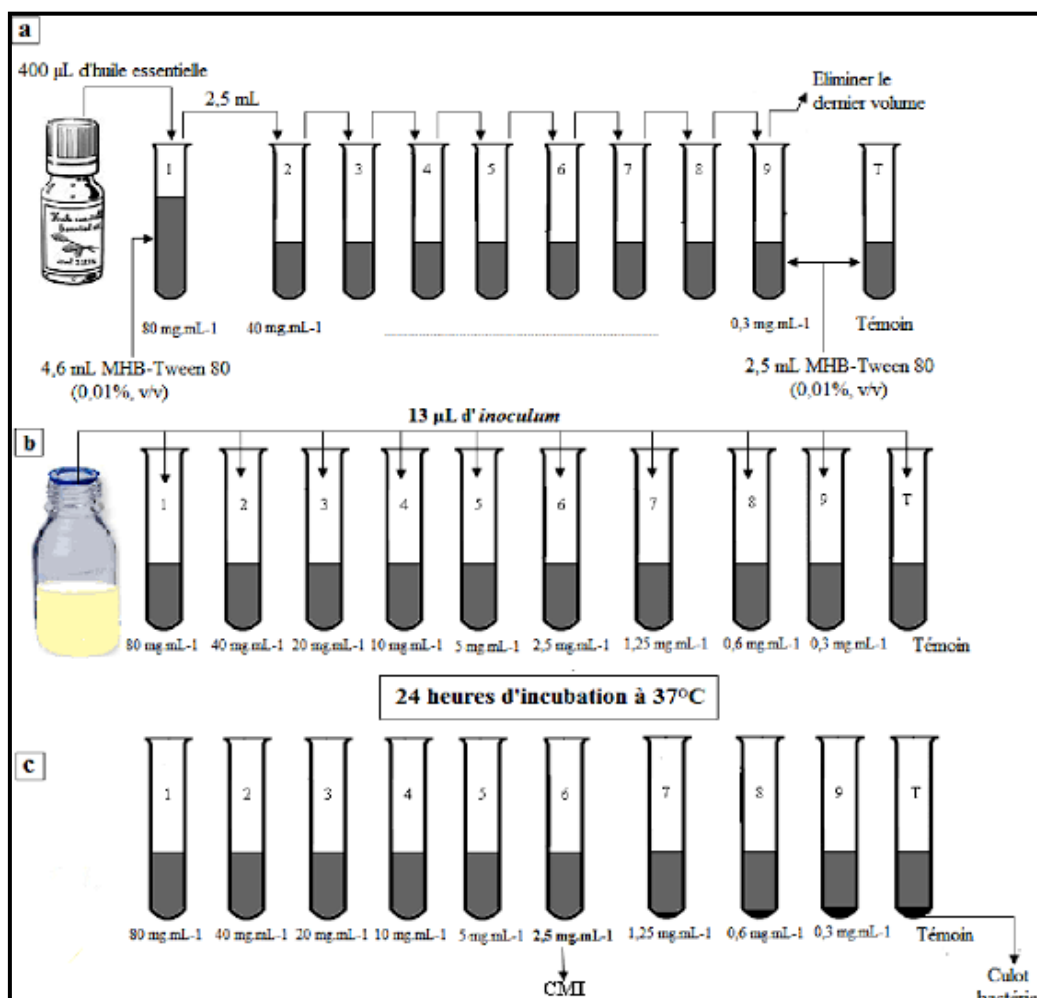


Figure 15 : Protocole de détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Bouchaale et al., 2015).

1.2.2.5.3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

➤ Principe

La concentration minimale bactéricide CMB correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9% de inoculum bactérien initial (soit moins de 0,01% de survivant). Elle définit l'effet bactéricide d'une huile essentielle (Guinoiseau, 2010).

➤ Mode opératoire

Selon le protocole de (Bouchaale et *al.*, 2015) :

La même gamme des concentrations réalisées par la technique de macrodilution en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la CMI et la CMB de l'huile essentielle testée (fig 16).

Les prélèvements sont effectués dans le tube témoin et dans chacun des tubes dépourvus de culot bactérien, puis déposés en stries sur la gélose MHA ; les boîtes ensemencées sont ensuite incubés 24h à 37°C.

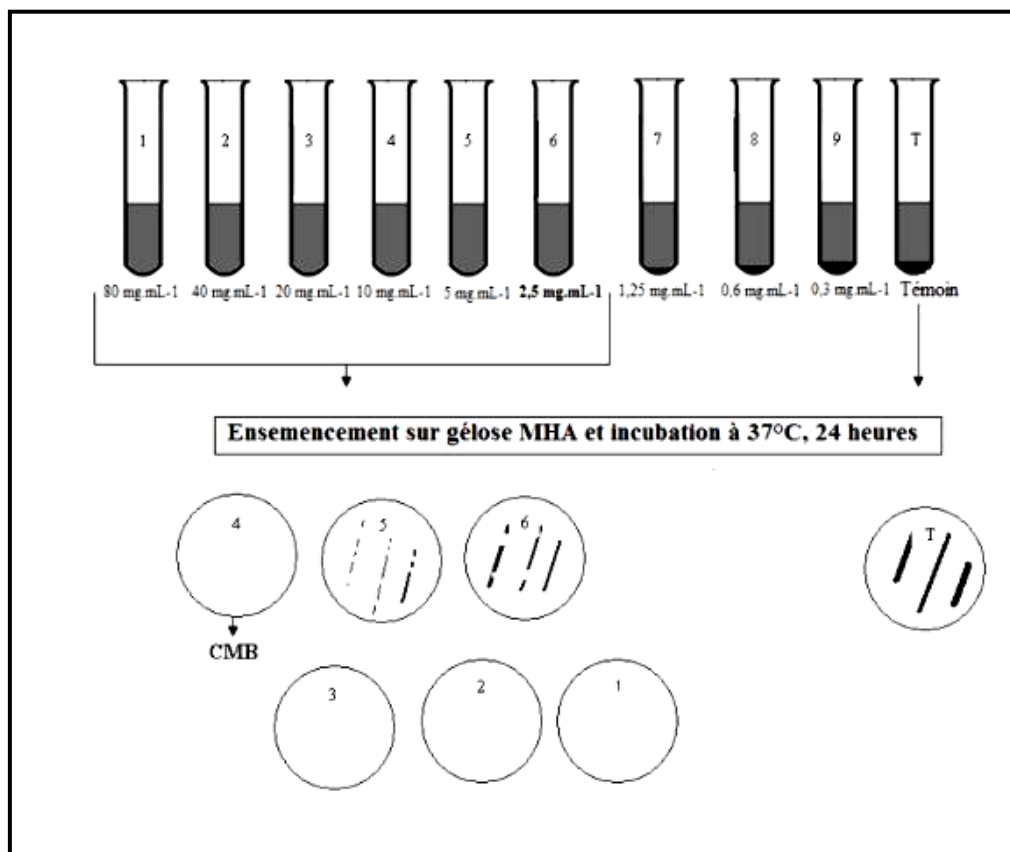
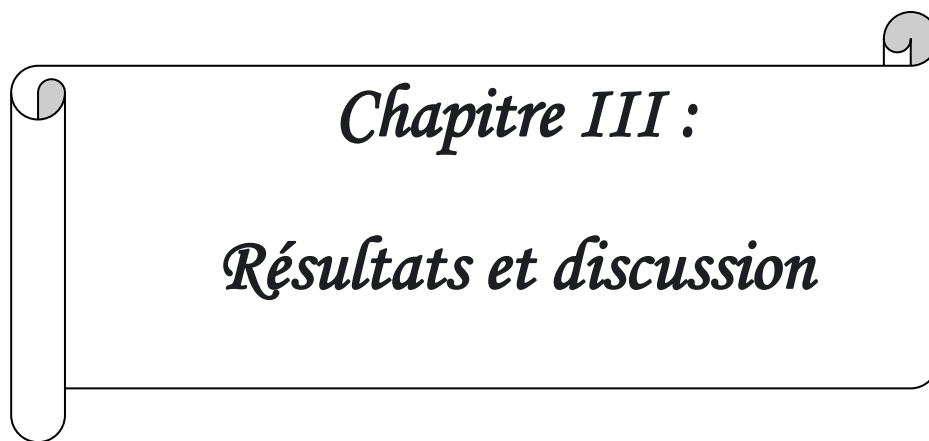


Figure 16 : Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) (Bouchaale et *al.*, 2015).



Chapitre III :
Résultats et discussion

Rendement d'extraction

L'extraction par hydrodistillation qui été réalisée sur les feuilles d'*Eucalyptus globulus* et sur l'écorce de *Citrus limon*, a permis l'obtention d'une huile liquide de couleur jaune pâle, limpide et ayant une odeur caractéristique et épicée.

Le rendement obtenu pour nos huiles est indiqué dans le tableau 07.

Tableau 07: Résultats du rendement d'extraction d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon*

Plantes	Rendement d'extraction(%)
<i>Eucalyptus globulus</i>	0,158
<i>Citrus limon</i>	0,169

Les résultats obtenus ont été exprimés en pourcentage de la masse d'huile essentielle par rapport à la masse de la plante (*Eucalyptus globulus*, *Citrus limon*).

Nous avons observé que le rendement de l'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est égal à 0,15 %. Ce résultat est inférieur à celui trouvé par Karmiche et Chaougui (2013), qui est égal à 0,48%. Pour la même espèce, le rendement obtenu par Bey Ould (2014), d'une valeur égal à 0, 1%, est plus proche de notre résultat. Cette différence pourrait être expliquée par la méthode d'extraction utilisée, ou même par le taux d'humidité des organes. En effet, Bey Ould (2014), a justifié son résultat par l'effet de la saison de la récolte ou des modifications de conformation des canaux sécréteurs des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* à travers la saison comme le montre la figure ci-dessous (figure17).

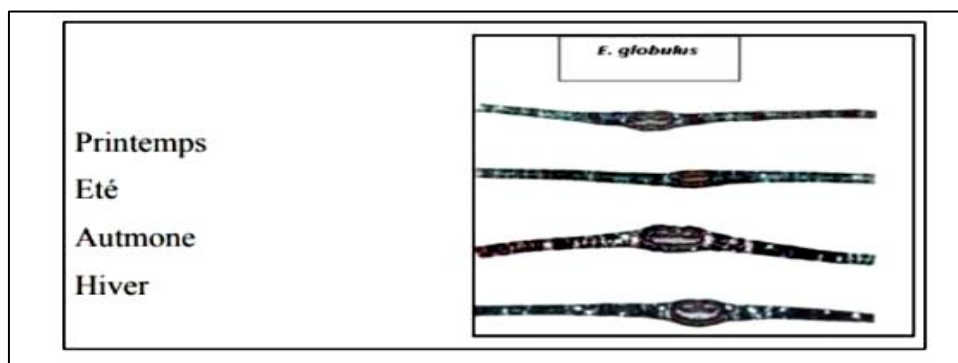


Figure 17 : Coupe transversale des feuilles d'*Eucalyptus globulus* (Bey Ould, 2014).

Pour le rendement de l'extraction de l'huile essentielle de *Citrus limon*, on a obtenu 0,16%. Ce résultat est inférieur à ceux obtenus par Hamdani et Allem (2017), et par Bourgou et *al.* (2012), qui ont enregistré comme rendement respectifs 1,02 % et 1,30%. Cependant, les rendements enregistrés sont proches de celui obtenu par Tinado et *al.* (1995), qui est égal à 0,19%.

Cette différence pourrait s'expliquer par l'effet de la période de récolte, les conditions d'environnement, la variété de même espèce et mode d'extraction (Bourgou et *al.*, 2011).

1. Identification des bactéries testées

1.1 Observation macroscopique des colonies

L'observation macroscopique des bactéries testées est présentée dans la figure 18, et l'étude macroscopique est indiquée dans le tableau 08.

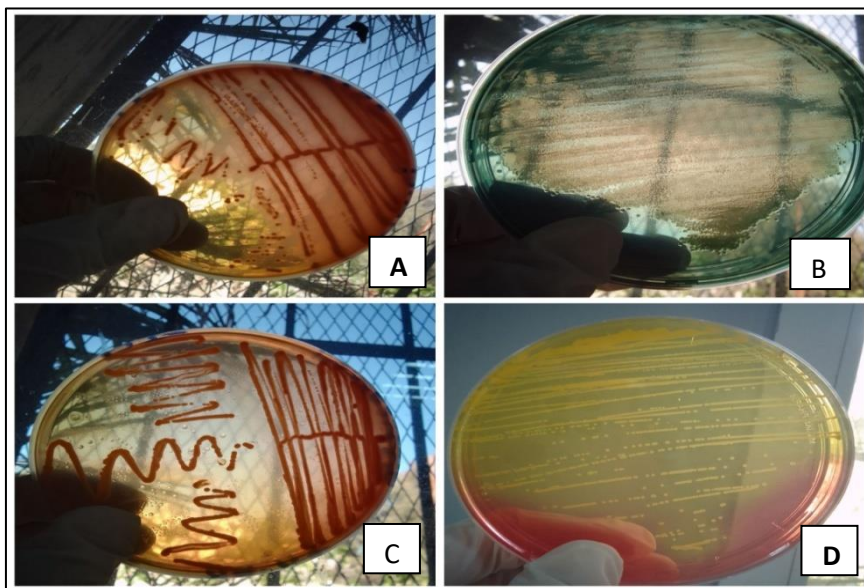


Figure 18 : Observation macroscopique des souches testées sur leurs milieux sélectifs :

A : *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Klebsiella pneumoniae*, **D :** *Staphylococcus aureus*.

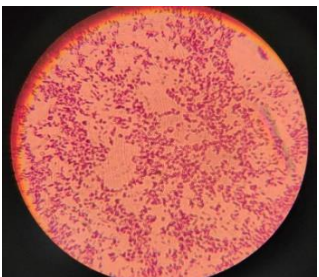
Tableau 08 : Etude macroscopique des bactéries testées.

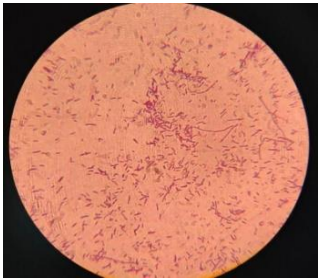
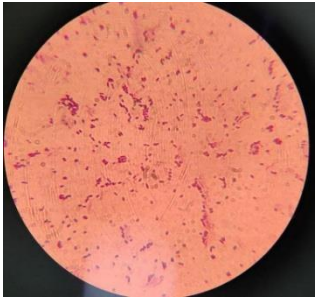
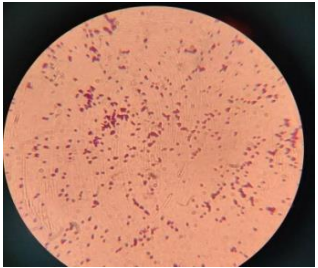
Isolats	Milieu de culture	Température et duré d'incubation	Aspect de colonies macroscopique
<i>Escherichia coli</i>	Gélose Hektoen	37°C pendant 24h	Couleur jaune saumon avec précipités biliaires autour de colonies
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			Colonies plates surélevées, opaques et verdissement de milieu
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			Couleur jaune saumon avec précipités biliaires autour de colonies
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gélose Chapman		Colonies jaunes avec zones jaunes, arrondies smoths, bombées

1.2 Observation microscopique des colonies

Après la réalisation de coloration de Gram pour les souches isolées, nous avons obtenu les résultats indiqués dans le tableau 09.

Tableau 09 : Observation microscopique des souches étudiées (avec grossissement X100).

Les souches	Gram	Forme
 <i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	Coco bacille

 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	Bacille
 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	Bacille
 <i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	Cocci

- D'après ces résultats, nous remarquons qu'il y a des cellules colorées en rose, ce qui confirme qu'il s'agit de bactérie Gram négatif, alors qu'une coloration violette confirme qu'il s'agit de bactérie a Gram positif.

2. Evaluation de l'activité antibactérienne

2.1. Teste de sensibilité aux antibiotiques : antibiogramme

L'antibiogramme vise à déterminer la sensibilité des souches : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, aux les quatre antibiotiques suivants : Ampicilline AM, Tétracycline TE, Chloramphénicol C, Gentamicin CN.

Les résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disques sur les quatre souches testées sont présentés dans la figure 19 et le tableau 10.

Selon le diamètre des zones d'inhibition, on classer les bactéries dans les catégories suivantes :

- <8 : Non sensible (-)
- 9-14 : sensible (+)
- 15-19 : plus sensible (++)
- >20 : Extrêmement sensible (+++)

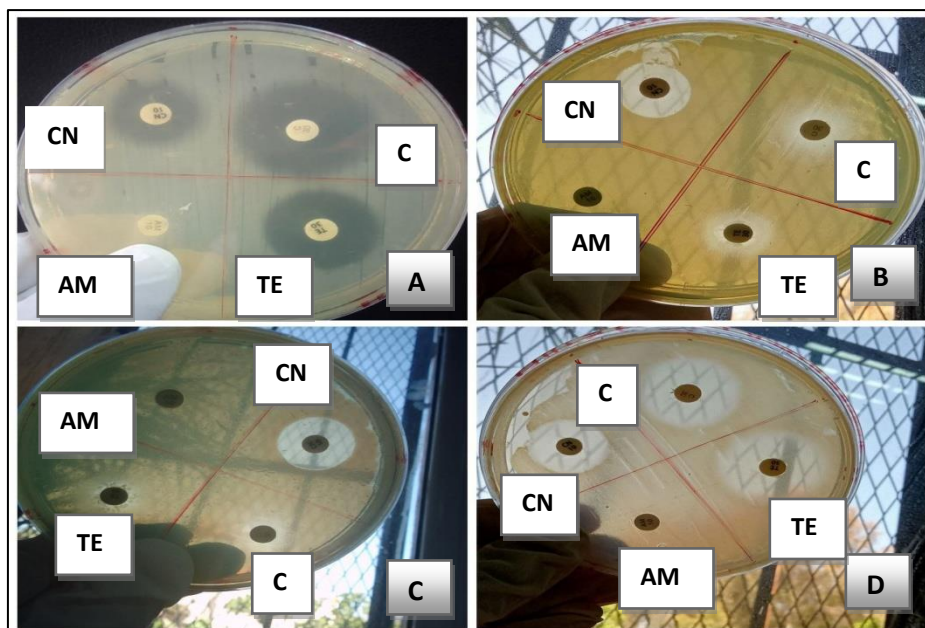


Figure 19 : Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disques

A : *Escherichia coli*, **B** : *Pseudomonas aeruginosa*, **C** : *Klebsiella pneumoniae*, **D** : *Staphylococcus aureus*. Ampicilline AM, Tétracycline TE, Chloramphénicol C, Gentamicin CN.

Tableau 10: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) des antibiotiques testés.

Antibiotiques	Souches bactériennes	Diamètres d'inhibition en (mm)	Sensibilités bactériennes
	<i>Escherichia coli</i>	0	- R
Ampicilline	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	-R
(AM)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	-R
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	-R
	<i>Escherichia coli</i>	20	+++S
Tétracycline	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	++S
(TE)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09	+S
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25	+++S
	<i>Escherichia coli</i>	27	+++S
Chloramphéni col	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	08	-R
(c)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	+S
	<i>Staphylococcus aureus</i>	23	+++S
	<i>Escherichia coli</i>	15	++S
Gentamicine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17	++S
(CN)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18	+++S
	<i>Staphylococcus aureus</i>	20	+++S

Selon les résultats de l'antibiogramme la figure 19 et le tableau 10, nous pouvons remarquer que :

-*Escherichia coli* sur quatre antibiotiques (AM, TE, C, CN), la bactérie a été sensible à 3 (TE, C, CN). Le plus grand diamètre d'inhibition a été observé pour le Chloramphenicol (diamètre de 27mm), suivi de la Tétracycline (diamètre de 20mm), et enfin par la Gentamicin avec un diamètre d'inhibition de 15mm.

Escherichia coli est résistance à l'Ampicilline.

-*Pseudomonas aeruginosa* sur quatre antibiotiques (AM, TE, C, CN), elle a été sensible à 3 (TE, C, CN). Le plus grand diamètre d'inhibition a été enregistré pour le Gentamicin (diamètre de 17mm), suivi de la Tétracycline avec un diamètre de 15mm, et enfin par le Chloramphenicol diamètre d'inhibition 08mm.

Pseudomonas aeruginosa est résistance à l'Ampicilline.

-*Klebsiella pneumoniae* sur quatre antibiotiques (AM, TE, C, CN), elle a été sensible à 3 (TE, C, CN). Le plus grand diamètre d'inhibition a été observé pour le Gentamicin (diamètre de 18mm), suivi de le Chloramphenicol avec un diamètre de 10mm, et enfin par la Tétracycline avec un diamètre d'inhibition de 09mm.

Klebsiella pneumoniae est résistance à l'Ampicilline.

-*Staphylococcus aureus* sur quatre antibiotiques (AM, TE, C, CN), elle a été sensible à 3 (TE, C, CN). Le plus grand diamètre d'inhibition a été enregistré pour la Tétracycline (diamètre de 25mm), suivi par le Chloramphenicol avec un diamètre de 23mm, et enfin par la Gentamicin avec un diamètre d'inhibition de 20mm.

Staphylococcus aureus est résistance à l'Ampicilline.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Bouchaale et *al.* (2015).

Donc, d'après les résultats obtenus, nous constatons les quatre souches testées sont sensibles aux trois antibiotiques (Tétracycline, Chloramphenicol, Gentamicin) avec des zones d'inhibition variables.

Ces résultats montrent aussi que les quatre souches sont résistantes à l'Ampicilline, antibiotique de la famille des bêta lactamines. Selon Elhani (2012), concernant les phénotypes de résistance aux bêtas lactamines, le mécanisme essentiel est de nature enzymatiques par la production de bêta lactamases, ce qui confirmé par Bouras (2019) et

Hadjaj et *al.* (2022), qui montrent respectivement qu'*Escherichia coli* devient résistant aux bêta lactamines surtout à l'ampicilline par la production de bêta lactamases, et que 80% à 95% des souches bactériennes de *Staphylococcus aureus* montrent une résistance à l'ampicilline par la production de pénicillinases. De plus, les bactéries peuvent utiliser leurs lipopolysaccharides chargés négativement (LPS) pour fournir une barrière de répulsion à la diffusion des bêtas lactamines hydrophiles dans la cellule (Pages et Winterhalter, 2008).

3.2. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

3.2.1. Méthode de diffusion en disques

Nous avons étudiées *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon* par deux méthodes : méthode de diffusion en disques et méthode de diffusion en puits sur un milieu solide.

- Les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* par la méthode de diffusion en disques sur les quatre souches testées sont représentés dans la figure 20 et le tableau 11.

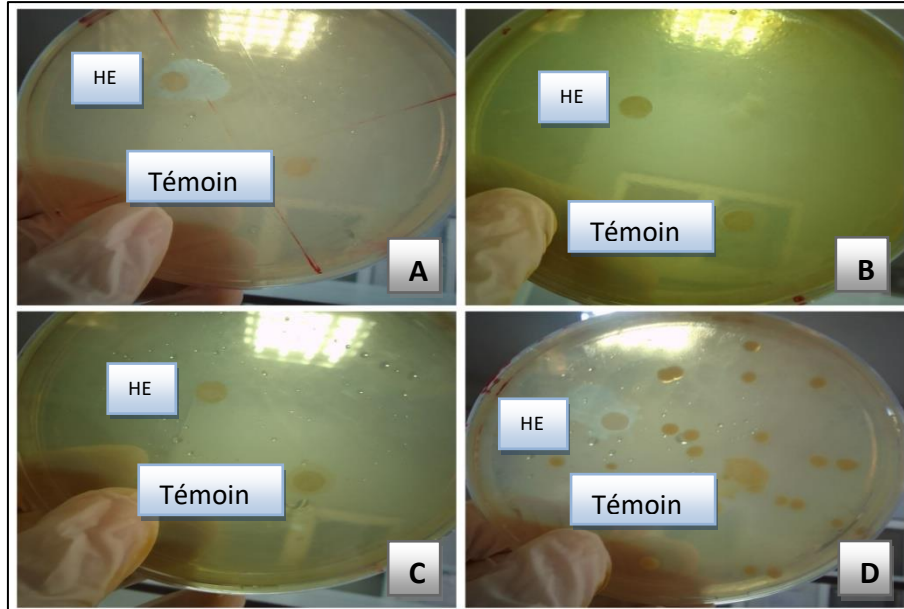


Figure 20 : Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en disques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. **A :** *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Klebsiella pneumoniae*, **D :** *Staphylococcus aureus*.

Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* par la méthode de diffusion en disques.

Souches bactériennes	Diamètres en (mm)	Sensibilité bactériennes	Témoin
<i>Escherichia coli</i>	12	+S	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	-R	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	-R	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	+S	-

- Les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus limon* par la méthode de diffusion en disques sur les quatre souches testées sont représentés dans la figure 21 et le tableau 12.

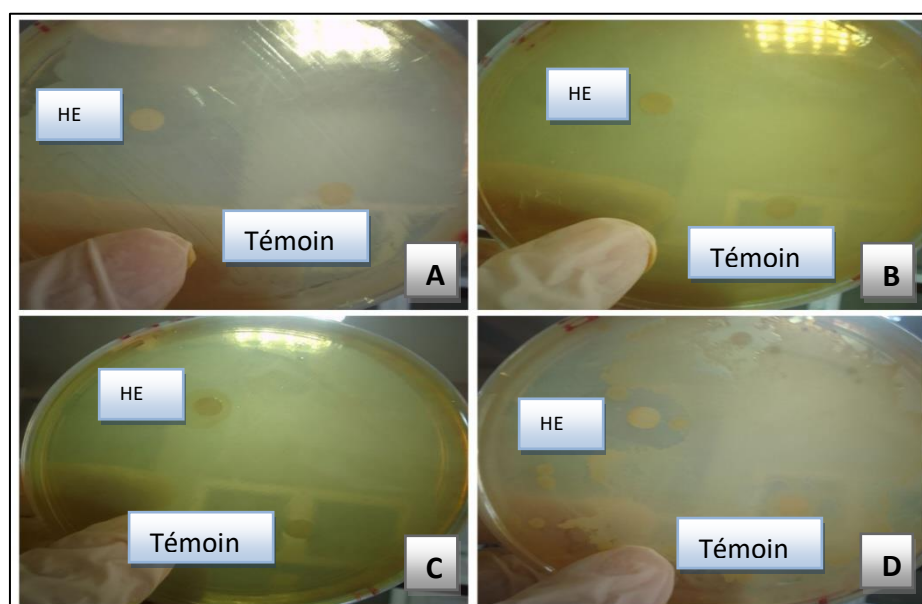


Figure 21 : Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en disques de l'huile essentielle de *Citrus limon*. **A** : *Escherichia coli*, **B** : *Pseudomonas aeruginosa*, **C** : *Klebsiella pneumoniae*, **D** : *Staphylococcus aureus*.

Tableau 12: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle de *Citrus limon* par la méthode de diffusion en disques.

Souches bactériennes	Diamètres en (mm)	Sensibilité bactériennes	Témoin
<i>Escherichia coli</i>	0	-R	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	-R	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	06	-R	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	++S	-

- On constate, d'après les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (figure 20 et tableau 11), que deux souches ont été sensibles *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*, avec un diamètre d'inhibition égal à 12mm. *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* ont été résistantes.
- Pour les résultats d'aromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus limon* (figure 21 et tableau 12), on remarque que trois souches ont été résistantes *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*. *Staphylococcus aureus* est sensible avec un diamètre d'inhibition 15mm.

3.2.2. Méthode de diffusion en puits

- Les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* par la méthode de diffusion en puits sur les quatre souches testées sont représentés dans la figure 22 et le tableau 13.

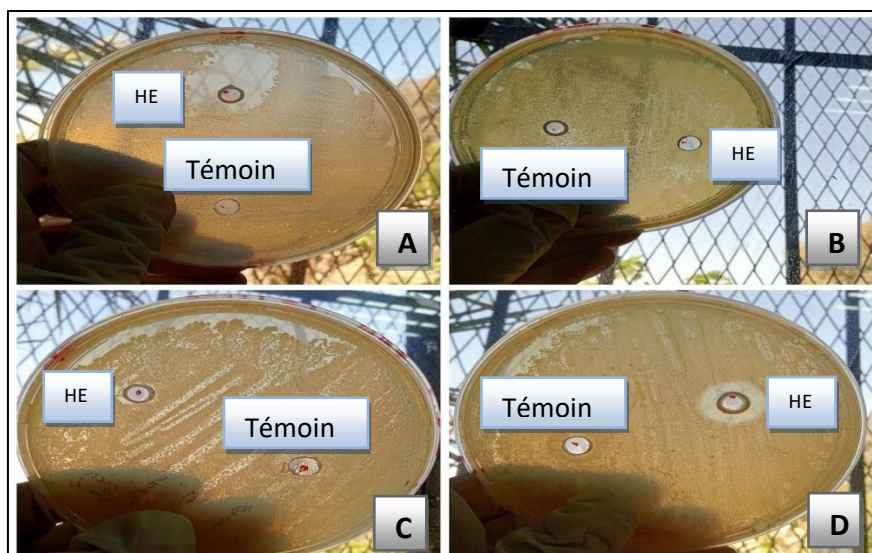


Figure 22 : Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en puits de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. **A :** *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Klebsiella pneumoniae*, **D :** *Staphylococcus aureus*.

Tableau 13 : Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* par la méthode de diffusion en puits.

Souches bactériennes	Diamètres en (mm)	Sensibilité bactériennes	Témoin
<i>Escherichia coli</i>	27	+++ S	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	- R	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	+ S	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	+ S	-

- Les résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle de *Citrus limon* par la méthode de diffusion en puits pour les quatre souches testées sont présentés dans la figure 23 et le tableau 14.

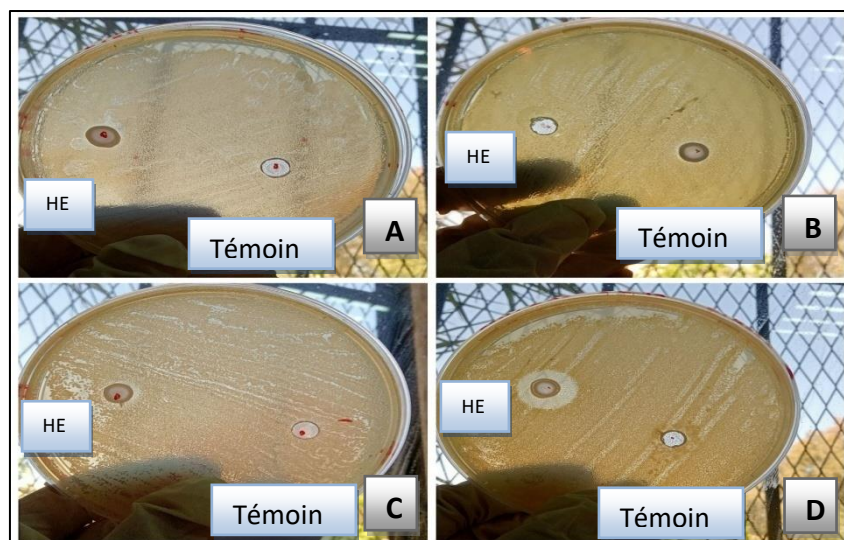


Figure 23 : Résultats de l'aromatogramme par la méthode de diffusion en puits de l'huile essentielle de *Citrus limon*. **A :** *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Klebsiella pneumoniae*, **D :** *Staphylococcus aureus*.

Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibition en (mm) de l'huile essentielle de *Citrus limon* par la méthode de diffusion en puits

Souches bactériennes	Diamètres en (mm)	Sensibilité bactériennes	Témoin
<i>Escherichia coli</i>	10	+S	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	06	-R	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	09	+S	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	++S	-

- On constate, d'après les résultats de l'aromatogramme de diffusion en puits de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (figure 22 et tableau 13), que trois souches ont été sensibles *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, avec un diamètre d'inhibition respectivement de 27mm, 10mm, 14mm. *Pseudomonas aeruginosa* est résistante.
- Pour les résultats de l'aromatogramme de diffusion en puits de l'huile essentielle de *Citrus limon* (figure 23 et tableau 14), on remarque que trois souches ont été sensibles

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, avec des diamètres d'inhibition respectifs de 10mm, 09mm et 15mm.

Pseudomonas aeruginosa est résistante.

D'après les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon*, par les deux méthodes (diffusion en disques, diffusion en puits),

Nous constatons que les bactéries Gram- testées *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* sont généralement résistantes alors que la bactérie Gram+ *Staphylococcus aureus* est toujours sensible. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Ariba et al. (2020), qui ont observés que les huiles essentielles avaient différents degrés d'efficacité selon les souches testées et que les bactéries Gram+, notamment *Staphylococcus aureus*, étaient les plus sensibles.

De plus Haddouchi et al. (2009), montrent que la plupart des huiles essentielles sont très actives contre *Staphylococcus aureus*. Nos, résultats sont également proches de ceux enregistrés par Bey Ould (2014), qui ont remarqué une bonne activité antimicrobienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* et une résistance marquée par *Pseudomonas aeruginosa*. Boukabache et Boudjefdjouf, (2016), expliquent ces résultats par le fait que les bactéries Gram+ sont dépourvues de paroi, ce qui facilite l'entrée des composants des huiles essentielles à l'intérieur de la cellule, ce qui aura pour conséquence l'inhibition de la croissance bactérienne.

Par contre, les bactéries Gram- sont pourvues d'une couche lipopolysacharides (paroi) qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre l'entrée des huiles essentielles. Monieina et al. (2005), ont également montré que les bactéries Gram- peuvent être sensibles à l'effet des huiles essentielles, ce qui concorde avec nos résultats concernant la sensibilité d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* (méthode de puits).

D'après Balentine et al. (2006), *Staphylococcus aureus* dépourvu de membrane externe, semble être sensible aux changements environnementaux externe, tel que la température, pH, et les extrais naturels. La résistance élevée de *Pseudomonas aeruginosa*, selon Tasson et Nychas, (1995) ; Chao et al. (2000) ; Mann et al. (2000) ; Innouye et al. (2001) ; ainsi que Ferhat et al. (2010), serait due à sa membrane externe et sa capacité de métaboliser un éventail composés organiques. Les bactéries du genre *Pseudomonas* utilisent les terpènes

comme source de carbone et d'énergie, elles transforment le limonène (comme molécule modèle des terpènes) en alcool perillyl, en acide, en terpinéol, ou limonène-6,8_diuol (Malekey, 2007).

De plus, la sensibilité des microorganismes aux huiles essentielles dépend des propriétés de l'huile essentielle et du microorganisme lui-même. Il est bien connu que les bactéries Gram+ sont plus sensibles aux huiles essentielles que les bactéries Gram-. Plusieurs études testant l'activité inhibitrice des huiles essentielles confirment ce phénomène (Guesnu, 2016). En comparaison avec d'autres études, Nous pouvons déduire que l'activité biologique d'un huile essentielle est liée à sa composition chimique est ses composés majoritaires donc, plus l'huile essentielle est riche en composés chimiques plus elle contient des substances actives et donc plus l'activité devient importante (Saadoun et Meguenni, 2016).

3.2.3. Etude comparative des résultats entre la méthode de diffusion en disques et la méthode de diffusion en puits

Les résultats obtenus par l'aromatogramme des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon* par les deux méthodes (méthode des disques et méthode des puits), confirme que les deux huiles possèdent une bonne activité antibactérienne, Bien que les résultats obtenus par les deux méthodes soient différents.

En effet, nous avons marqué une activité antibactérienne élevée pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis *Escherichia coli* avec un diamètre d'inhibition de 27mm, alors que pour la méthode des disques, il n'a pas dépassé 12mm.

On remarque aussi qu'*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ont été résistantes à l'effet de L'huile essentielle de *Citrus limon* par la méthode des disques, alors qu'elles sont sensibles par la méthode des puits. *Staphylococcus aureus* est sensible avec les deux méthodes et aux deux huiles.

D'après cette comparaison, il semble résulter que la méthode des puits est plus efficace que la méthode des disques. Fontenay et *al.* (2015), ont démontré que la méthode des disques à certains inconvénients qui peuvent rendre cette méthode moins efficace. Tout d'abord, il est primordial de connaître la quantité de l'huile essentielle ajoutée, les disques ayant une capacité d'absorption limitée, il ne faut donc pas dépasser cette capacité ; ensuite, la diffusion de l'huile essentielle sur la gélose est difficile à cause de complexité des constituants qui

peuvent migrer différemment. De plus, la méthode de diffusion en disque est limitée, puisque la nature hydrophobe des huiles essentielles, empêche leur diffusion uniforme à travers le milieu gélosé (Alexander, 2020).

D'autre part, dans la méthode des puits, les paramètres ; tels que le volume de l'huile essentielle placé dans les puits, l'épaisseur de la couche de gélose, la présence éventuelle d'un dissolvant ; varient considérablement entre les études, ce qui confirme que cette méthode est utile pour le choix des huiles essentielles actives et pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne (Chemloul, 2014).

3.2.4. Etude comparative des résultats de l'antibiogramme et de l'aromatogramme

Selon les résultats de l'antibiogramme et de l'aromatogramme, nous pouvons remarquer que :

-*Escherichia coli* à une forte sensibilité vis-à-vis de trois antibiotiques (TE, C, CN), l'effet de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* est équivalent à celui du Chloramphenicol et l'effet de l'huile essentielle de *Citrus limon* est proche de celui de la Gentamicin.

-*Pseudomonas aeruginosa* est sensible à trois antibiotiques (TE, C, CN), elle est cependant résistante aux effets des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et de *Citrus limon*.

-*Klebsiella pneumoniae* est sensible à trois antibiotiques (TE, C, CN), l'effet de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* équivaut à celui du Chloramphenicol et l'effet de l'huile essentielle de *Citrus limon* est semblable à celui de la Tétracycline.

-*Staphylococcus aureus* à une forte sensibilité pour trois antibiotiques (TE, C, CN), l'effet de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est proche de celui la Gentamicin et l'effet de l'huile essentielle de *Citrus limon* est proche à celui de la Gentamicin.

En résumé, pour les trois souches bactériennes ; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*, l'activité antibactérienne des huiles essentielles *Eucalyptus globulus* et *Citrus limon* semblent être équivalentes, proches, voire même supérieure à celle des antibiotiques testés. Par contre *Pseudomonas aeruginosa* a été résistante à l'effet des huiles essentielles testées.

Selon Rather et al. (2012), la variation de l'activité antimicrobienne des agents antibactériens pourrait s'expliquer par la différence structurale entre les bactéries.

3.2.5. Détermination de concentration minimale inhibitrice (CMI)

- Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* pour les quatre souches testées sont représentés dans la figure 24 et le tableau 15.



Figure 24 : Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. **A :** *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Klebsiella pneumoniae*, **D :** *Staphylococcus aureus*.

Tableau 15: Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Souches bactériennes	Concentration en (mg/ml-1)
<i>Escherichia coli</i>	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	10

- Les résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile de *Citrus limon* pour les quatre souches testées sont représentés dans la figure 25 et le tableau 16.

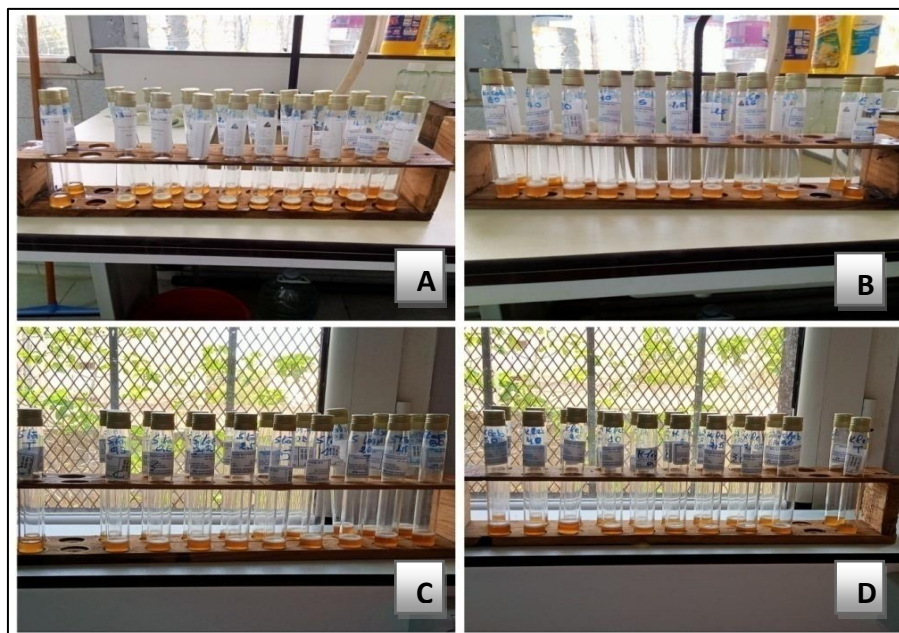


Figure 25 : Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle de *Citrus limon*. **A :** *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Klebsiella pneumoniae*, **D :** *Staphylococcus aureus*.

Tableau 16: Résultats de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'huile essentielle de *Citrus limon*

Souches bactériennes	Concentration en (mg/ml-1)
<i>Escherichia coli</i>	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	80
<i>Staphylococcus aureus</i>	20

➤ Les résultats de la CMI montrent que :

-Pour l'HE d'*Eucalyptus globulus*, la plus faible concentration inhibitrice (10 mg/ml-1) est enregistrée pour *Staphylococcus aureus* ; ce qui signifie que qu'elle est la plus sensible à l'effet de l'huile essentielle par rapport aux autres bactéries *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* qui présentent des concentrations plus élevées (40 mg/ml-1) et qui semblent donc plus résistantes.

-Pour l'huile essentielle de *Citrus limon*, la plus faible concentration inhibitrice (20 mg/ml-1) est enregistrée pour *Staphylococcus aureus* ; ce qui signifie que qu'elle est la plus sensible à l'effet de l'huile essentielle par rapport aux autres bactéries *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* qui présentent des concentrations plus élevées (80mg/ml-1) et qui semblent donc plus résistantes.

3.2.6. Détermination de la concentration minimale bactéricide(CMB)

➤ Les résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) l'huile d'*Eucalyptus globulus* pour les quatre souches testées sont représentés dans la figure26 et le tableau 17.

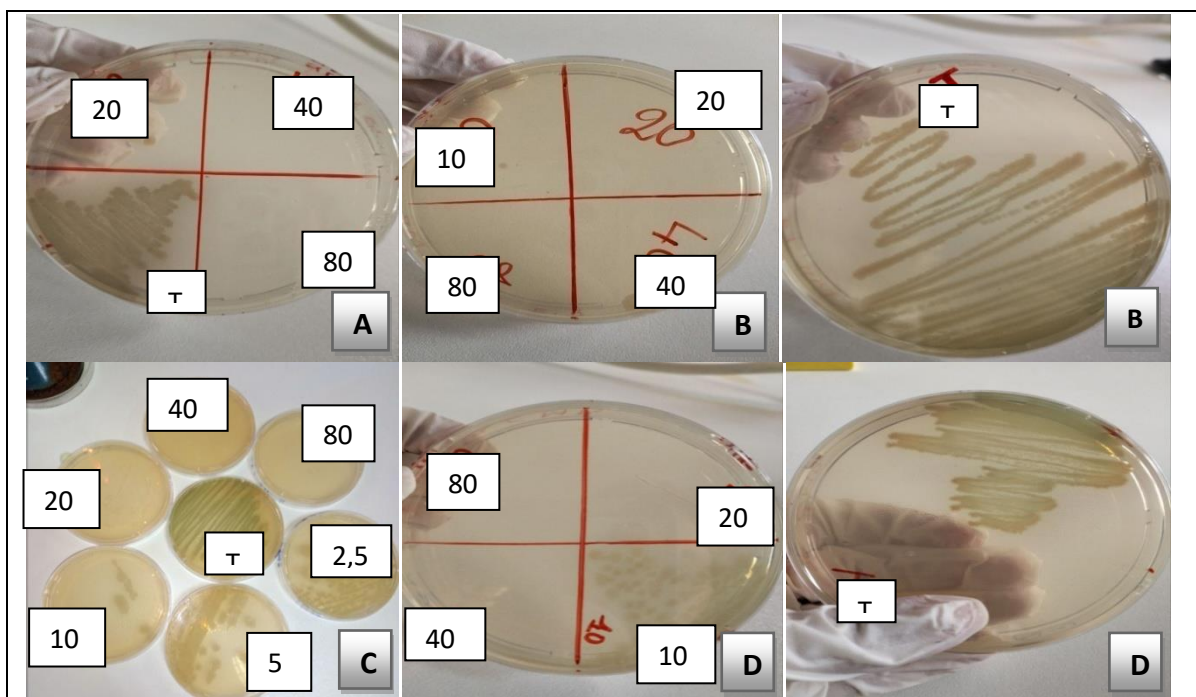


Figure 26 : Résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) (mg/ml-1) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. **A** : *Escherichia coli*, **B** : *Pseudomonas aeruginosa*, **C** : *Klebsiella pneumoniae*, **D** : *Staphylococcus aureus*.

Tableau 17 : Résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Souches bactériennes	Concentration en (mg/ml-1)
<i>Escherichia coli</i>	80
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	20

➤ Les résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle *Citrus limon* pour les quatre souches testées, sont représentés dans la figure27 et le tableau 18.

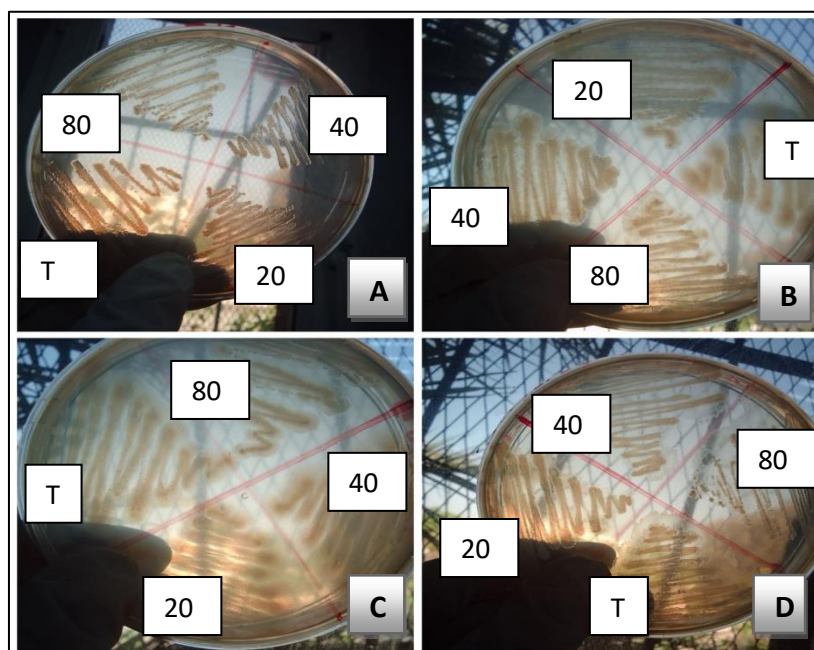


Figure 27: Résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) (mg/ml-1) de l'huile essentielle de *Citrus limon*. **A :** *Escherichia coli*, **B :** *Pseudomonas aeruginosa*, **C :** *Klebsiella pneumoniae*, **D :** *Staphylococcus aureus*.

Tableau 18: Résultats de la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) de l'huile essentielle de *Citrus limon*

Souches bactériennes	Concentration en (mg/ml-1)
<i>Escherichia coli</i>	Aucune concentration notable capable de tuer les quatre bactéries testées
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

➤ Les résultats de la CMB montrent que :

-Pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, les plus faibles concentrations bactéricides (20 mg/ml-1) ont enregistré pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ; ce qui signifie que qu'elle est la plus sensible à l'effet de l'huile essentielle par rapport aux autres bactéries *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* qui présentent des concentrations plus élevées respectivement (80mg/ml-1) (40mg/ml-1) et qui semblent donc plus résistantes.

-Pour l'huile essentielle de *Citrus limon*, aucune activité bactéricide n'est remarquée pour les quatre souches.

La CMI ou concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus petite concentration d'une huile essentielle pour laquelle aucune colonie bactérienne n'est visible à l'œil nu ; alors que la CMB ou concentration minimal bactéricide est la plus faible concentration en huile essentielle capable de tuer plus de 99,9 de l'inoculum bactérienne initial.

Le rapport CMB/CMI permet de définir le caractère bactériostatique ou bactéricide d'une huile essentielle. Lorsque ce rapport est inférieur à 4, l'huile est considérée comme bactéricide.

Les rapports des CMB/CMI pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* des quatre souches testées *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* sont égaux respectivement à (02), (0,5), (01), (02), donc l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* exerce un bon effet bactéricide. Ce résultat est cohérent avec les

résultats de Bouras (2019), ce qui confère à l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* un effet d'antibiotique naturel. Pour *Pseudomonas aeruginosa*, le résultat de l'aromatogramme est différente entre la CMI et la CMB, ce qui pourrait s'expliquer par la dilution c'est-à-dire que l'huile essentielle doit être diluée pour exercer son effet bactéricide.

Le rapport des CMB/CMI de l'huile essentielle de *Citrus limon* des quatre souches testées *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* montre que l'huile essentielle de *Citrus limon* exerce un effet bactériostatique, ce qui est différent des résultats de l'aromatogramme qui montre que l'huile essentielle de *Citrus limon* possède un pouvoir inhibiteur. C'est ce qui nous permet de déduire que l'huile essentielle de *Citrus limon* a un effet bactéricide uniquement lorsqu'elle est pure mais lorsqu'elle est diluée à des concentrations différentes elle perd son efficacité ; ce qui concorde avec les résultats de Messoud et al. (2019), qui montrent, que les germes testés sont plus sensibles à l'huile essentielle pure qu'aux différentes dilutions.



Conclusion et

Perspectives

Conclusion

Géographiquement, l'Algérie possède une grande richesse végétale, de nombreuses plantes médicinales et aromatiques poussent à l'état spontané. Les plantes médicinales restent une source importante de principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques, d'ailleurs les huiles essentielles occupent une grande place dans les recherches récentes du fait de leurs activités biologiques diverses et importantes.

Dans le présent travail nous avons essayé d'évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles de deux plantes aromatiques et médicinales de la flore Algérienne, récoltées dans la région de Skikda, l'*Eucalyptus globulus* et *Citrus limon*.

Cette étude a porté sur :

-L'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* à partir des feuilles, et l'extraction de l'huile essentielle de *Citrus limon* à partir de l'écorce, par la techniques de l'hydrodistillation. Cette méthode a donné un rendement acceptable de 0,158% pour l'*Eucalyptus globulus* et 0,169% pour *Citrus limon*.

-Le test de sensibilité aux antibiotiques de quatre souches bactériennes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*. Celui-ci montre une résistance bactérienne considérablement élevé de les quatre bactéries testées vis-à-vis des betas lactamine, la famille de l'ampicilline.

-L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Citrus limon*, qui montre que les deux plantes ont exercée un bon pouvoir inhibiteurs sur les souches bactériennes testées.

-Il est important de noter que les huiles essentielles semblent présenter une activité antibactérienne similaire, proche voire meilleure que celle des antibiotiques. En effet, cette sensibilité importante des bactéries testées à ces huiles, suggère leur possible exploitation en thérapie comme alternative aux antibiotiques ; le développement de nouveaux traitements thérapeutiques s'appuyant fortement sur la découverte de ressources naturelles présentes dans le monde végétal.

Perspectives :

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées :

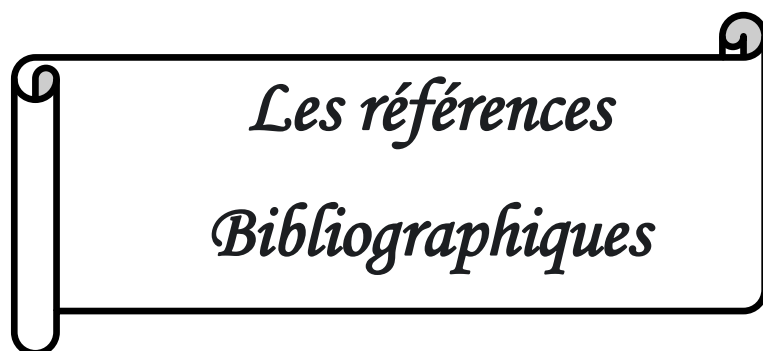
-Les résultats d'activité antibactérienne obtenus permettent une réflexion future sur l'application des huiles essentielles dans l'industrie pharmaceutique.

-On pourrait tester l'effet de la combinaison des huiles essentielles avec les antibiotiques.

-Evaluer l'utilisation des huiles essentielles dans les produits agroalimentaires pour allonger la durée de conservations des produits alimentaires.

-A lumière des résultats de notre étude, nous conseillons la création d'une réglementation algérienne relative aux huiles essentielles ainsi qu'une enquête approfondie sur les huiles essentielles des plantes algériennes.

-Il serait intéressant de mener des campagnes de sensibilisation du public pour éduquer les populations sur les meilleures façons d'utiliser les plantes et leurs huiles essentielles.



Les références

Bibliographiques

- ABOYA.Mj.l., (2013), Resistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de *Morinda morindoides*. Agricultural sciences. Thés de Doctorat. Université de Bretagne occidentale- Brest ; université Félix Houphouët - Biogny. France, pp 214.
- ADOUANI. L., MERGHADI I., (2021), Étude des activités biologiques des extraits et l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, Mémoire de Master, Université Larbi ben Mhidi D'OUM El Bouaghi, pp 06.
- ANDREWS J.M., (2001), The development of the BSAC standardized method of disc diffusion testing. *J. Antimic. Chemo*, 48(1):29-42.
- ARIBA. FZ., BENCHIHEB. H., DENECHÉ. S., (2020), synthèse des propriétés physicochimiques et biologiques d'*Eucalyptus globulus*. Mémoire de master. Université des Frères Mentouri, Constantine, pp31.
- AYAD A., (2017), Etude des mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* au niveau des hôpitaux de l'ouest algérien. Thèse Doctorat Université Abobekr Belkaid Tlemcen, pp174.
- AZMOUN S., (2016), Epidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au chu de Marrakech. Thèse de doctorat en médecine. Université Cadi Ayyad de Marrakech, pp177.
- BABA AISSA.F., (2000), *Encyclopédie des plantes utiles. Flor d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident*. Edition : librairie moderne-Rouïba, pp 101.
- BADAOUI. CH., CHEROUAT. H., DEIF. A., (2020), Activité antimicrobienne des huiles essentielles de deux variétés d'agrumes, Mémoire de Master, Université des Frères Mentouri Constantine 1, pp23.
- BENAYAD N., (2008), Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrées alimentaires stockées. Mémoire Master, Université Kasdi Merbah, Ouargla.
- BENCHEIKH.S., (2017), Etude de l'activité des huiles essentielles de la plante *Teucrium poliumssp Aurasianum Labiatae*. Thèse de Doctorat, Université Kasdi Merbah – Ouargla, pp16.
- BENGOCHEA JA., Sa PESSOA J., (2019), *Klebsiella pneumoniae* infection biology: livening to counteract host defenses. *FEMS Microbial*,1;43(2): p123-144. <https://doi.org/10.1093/femsre/guy43>.

- BERKANI. R., (2022), Etude de l'Activité Biologique de l'Huile Essentielle Extraite de *Citrus limon*, En Vue de son Utilisation Comme Conservateur Alimentaire. Mémoire du Master, Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bougi, pp 5.
- BEY OULD SI SAID.Z., (2014), Activité biologique des huiles essentielles des feuilles et du fruit d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Mémoire de Magister. Université d'Abderrahmane Mir- Bejaia, pp : 01, 46.
- BOONTAWAN. A., D.C.STUCKEY., (2006), A membrane bioreactor for the biotransformation of alpha- pinene oxide to isonovalal by *Pseudomona fluorescens* NCIMB 11671. Applied Microbiology and Biotechnology, 69, p: 643-649.
- BOUACHERINE.S., BOUDRAA. F., (2018), Pouvoir antigerminatif des huiles essentielles et d'extrait méthanolique de la plante aromatique *Citrus limon L.* sur quelques plantes. Mémoire de Master, Université Mohamed Boudiaf - M'sila, pp 09.
- BOUCHAALE. I., KHAHLERRAS. A., ZOUAOUI. S., (2015), Etude comparative de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Laurus nobilis* de deux régions (Algérie et Tunisie). Mémoire de Master. Université 8 mai 1945 de Guelma, pp 41,42.
- BOUGHACHICHE. R et SEBAIS. S., (2016), Caractérisation morphologique, biochimique et mutagénèse des *Klebsiella pneumoniae* au CHU de Constantine, Mémoire de Master en biologie, Université des Frères Mentouri Constantine, pp4-5.
- BOUKABACHE. M., BOUDJEFDJOUF.F., (2016), Extraction identification de l'huile essentielle par CPG-SM de l'espèce *Citrus limon* et mis en évidence son activité antibactérienne. Université de frères Mentouri Constantine, pp : 59,61.
- BOURAS. M., (2019), Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits de certaines plantes de l'est algérien sur des souches résistantes aux antibiotiques. Thèse de Doctorat. Université de Badji Mokhtar-Annaba, pp : 97, 107.
- BOURGOU. S., RAHALI, F., OURGHEMMI, I., SAIDANI TOUNSI, M., (2012), Modification de la composition en huile essentielles de zeste de quatre agrumes tunisiens au cours de la maturation des fruits. *Scientific World Journal*.
- BOUSBIA.N., (2011), Extraction des huiles essentielles riches en antioxydants à partir de produits naturels et de coproduits agroalimentaire. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des pays de Vaucluse et école nationale supérieure agronomique, pp40.
- BOUYAHYA. A, A., BAKRI, Y., ET-TOUYS, A., TALBOUI, A., KHOUHLAA, A., CHARFI, S., DAKKA, N., (2017), Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries, phytothérapie, pp :1-11.

- BRAHMAN. K., DJEBRIT. R., (2022), Etude des activités biologiques d'une plante aromatiques médicinales. Mémoire de Master. Université de Ghardaïa, pp : 18-19.
- BRUNETON J., (1993), *Pharmacognosie : photochimie, plantes médicinales*. 2 ième éd. Tec. Et doc. Lavoisier, paris, France.
- BRUNETON J. (1999). *Pharmacognosie : photochimie, plantes médicinales*. 3 ième édition. Paris (FR): technique et documentation. P 1120.
- CHAO S.C., YOUNG D.G., OBERG G.J., (2000), Screening for inhibitory activity of essential oils on selected Bacteria, Fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research*. 12, pp: 639-649.
- CHEMLOUL. F., (2014), Etude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Lavandulaofficinalis* de la région de Tlemcen, Mémoire de Master, Université Abou Bekr Blekaid Tlemcen, pp 09 - 33.
- CUSSON C., (2007), *L'aromathérapie et les huiles essentielles*. Livre en ligne. (consulté en mars 2018). Disponible sur : [http : //www.doc-developpement-durable.org](http://www.doc-developpement-durable.org)
- DESCHEPPER. R., (2017), Variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. Thèse de Doctorat, pp : 24- 38.
- DIGGLE ST., WHITELEY M., (2020), Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*; opportunistic pathogen and lab. *Rat. Microbiology (reading)*, 166(1): p30-33. Doi: 10; 1099/mic.0.000860 PMID: PMC 7273324pmid:31597590.
- DJENANE. D., (2015), Chemical profile, antibacterial and antioxidant activity of Algerian Citrus essential oils and their application in *Sardina pilchardus*. *Foods*, 4(2), p 208-228: doi10.3390/foods4020208.
- DJENDLI. S., BOUALI. L., (2022), Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la plante médicinale « *Eucalyptus globulus* ». Mémoire de Master en biologie. Université Frères Mentouri Constantine, pp 06.
- DURAFFOURD, C., LAPRAZ, J. C., (2002), *Traité de phytothérapie clinique: endobiogénie et médecine*. Elsevier Masson.
- EDRIS, A. E., (2007), *Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents. A review-Phytother. Res.*, 21, pp 308-323. <https://doi.org/10.1002/ptr.2072>.

- EL AMRI. J., ELBADAOUI K., ZAIR.T., BOUHARB. H., CHAKIR. S., ALAOUI. T., (2014), Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielle de *Teucrium capitatum* l et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testes. *Journal of applied biosciences* 82 :7481-7492.p 7487.
- EL BRAHIMI. R., (2013), Profil épidémiologique et de résistance des bactéries multi résistances au CHU Hassan ii de Fès. Thèse de doctorat en médecine. Université sidi Mohamed Ben, Abdellah, pp112.
- ELHANI D., (2012), Extended-spectrum beta-lactamases: the growing challenge. *Ann Boil. Clin.* 2012; 70(02):117-40. (Pub Med) (Google scholar).
- FERHAT M.A., MEKLATI B.Y., CHEMAT F. (2010), Citrus d'Algérie : les huiles essentielles et leurs procédés d'extractions. Ed. Office des publications universitaires, Alger, pp157.
- FEYAERTS. AF., LUYTEN. W., VAN DIJCK. P., (2020), Striking essential oils: tapping into a largely source for drug discovery. *Sci rep.* 18 ; 10(1) : 2867.
- FONTANAY. S, MOUGENOT. M, DUVAL RAPHAËL E., (2015), Évaluation des activités antibactériennes des Huiles Essentielles et/ou de leurs composants majoritaires, Article de Hegel, Vol. 5 N 2, pp : 109 - 118.
- GHEDIRA, K., GOETZ, P., LE JEUNE R., (2008), *Eucalyptus globulus* Labill. *Phytothérapie*, 6(3), 197-200.
- GOETZ, P., GHEDIRA, K., (2012), *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer-Verlag. Paris, France. Doi: https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0058-5_1
- GOORE. S., (2017), Caractérisation chimique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques de Côte d'Ivoire : *Artabotrys insignis*, *Artabotrys jollyanus*, *Beilschmiedia mannii* et *Dacryodes klaineana*, Thèse de doctorat, pp 04.
- GUINOISEAU, E., (2010), Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles : séparation, identification, et mode. Thèse de Doctorat. Université de CORSE-PASQUALE PAOL. pp : 66- 68.
- GREGORY. LW., (2013), *Essential oils and aromatherapy : How to use essential oil for beauty, health, and spirituality*. White willow books, p100.
- HADDOUCHI F., BENMANSOUR AH., (2008), Huiles essentielles, utilisation et activités biologiques. Application a deux plantes aromatiques. Les techniques de laboratoire. 8 :20-27.

- HADJAJ. Y., OULD DIF ALLAH. S., MERSELLAB. F., (2022), Résistance aux antibiotiques des isolats des Entérobactéries issues d'infection urinaire. Mémoire de Master, Université Djillali Bounaama khaemis Meliana, pp69.
- HAMA. F., ASLOUNE. H., (2017), Effet d'association d'extrait de pulpe d'orange et Citrus sur l'activité antioxydante. Mémoire de Master. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, pp6.
- HAMDANI FZ., ALLEM R., (2017), Propriétés antifongiques des huiles essentielles des feuilles de Citrus vis-à-vis d'Alternaria et Penicillium sp in vitro. Phytothérapie, 15(5), pp263-266.
- HELLAL. Z., (2011), Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et Antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*), Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, pp 32.
- HIMED. L., MERNIZ. S., BARKAT. M., (2006), Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne de l'huile essentielles de *Citrus limon* (variété Lisbon) extrait par hydrodistillation, algérien. J. Nat. Product, V4 :1 252-260.
- HINOUE J.B. HARVALA C.E., HINOUE E.B., (1989), Antimicrobial activity screening of 32 common constituents of essential oils. Pharmacies, pp: 4-44.
- INNOUYE S., TAKIZAWA T. ET YAMAGUCHI H., (2001), Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, p: 565-573.
- KAIM. N., KOUACHE. H., (2020). Le profil clinique et bactériologique de l'infection urinaire. Mémoire de Master en microbiologie. Université des Frères Mentouri Constantine, pp19.
- KARMICHE, N., CHAOUGUI, MA., (2013), Les activités antifongiques et antioxydants des huiles essentielles d'*Artimisia herba alba* et *Eucalyptus globulus*. Mémoire de Master. Constantine, pp46.
- KOZIOL N., (2015), Huiles essentielles d'eucalyptus globulus, d'eucalyptus radia et de corymbia citriodora: qualité, efficacité et toxicité. Science pharmaceutiques, pp49.
- LAWLESS. J., (2002), *The encyclopedia of essential oils the complete guide to the use of aromatic oils in aromatherapy*. Harper Thorsons, London W6 8 JB, p498.

- LEYSOURDE ROHELOLO. F., (2020), L'antibiogramme par diffusion : de sa découverte à son automatisation – Mis en place d'une méthode automatisée au chu de Rouen. Thèse de Doctorat. Université de Rouen Normandie UFR Sante, pp26.
- LOBSTEIN. A., COUIC-MARINIER. F., et KOZIOL. N., (2018), Huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, Actualités pharmaceutiques n° 573, pp : 59-61.
- LUCCHESI. ME., (2005), Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de doctorat en sciences. Université de la Réunion, pp18.
- MALECKEY M., (2007), Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de Doctorat de L'institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'environnement (Agro. Paris, Tech).
- MAINIL J., (2013), *Escherichia coli* virulence factors. Veterinary immunology and immunopathology 152:2-12.
- MESSOUS. N., CHOURAR. R., (2019), Activité antimicrobienne des huiles essentielles de « *Eucalyptus globulus* ». Etude phytochimique, Mémoire de Master, Université De Blida -1, pp : 46-68.
- MOKRANI. S., HAMDANI. S., (2017), Évaluation de la consommation des antibiotiques au service de Réanimation Médicale du CHU de Tizi-Ouzou. Doctorat en pharmacie. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, pp13.
- MANN C.M., COX S.D., MARHAM J.L., (2000), The outer membrane of *Pseudomonasaeruginosa* NCTC6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett. Appl. Micorbiol.*, 30, pp: 294-297.
- MOREIRA M.R., PONCE A.G., DEL VALLE C.E ET ROURA S.I., (2005), Inhibition parameters of essential oils reduces a food borne pathogen. *Food science and technology*, 38:565-570.
- MULLER M., TAINTER CR., (2023), *Escherichia coli* infection, treasure island (FL): stat pearls (internet).
- NASRY. A., MOUICI. S., (2022), Extraction de l'huile essentielle d'une plante Médicinale locale, Mémoire de Master, Université A. M. Oulhadj - Bouira, p 19.
- OBAME. E., LOUIS. C., (2009), Etude Phytochimique, Activités Antimicrobiennes et Antioxydantes de Quelques Plantes Aromatiques et Médicinales Africaines, Thèse de Doctorat, Université de Ouagadougou unité de Formation et de Recherche Sciences de la Vie et de la Terre (UFR-SVT), pp : 16-19.

- OKWN D.E., EM E NIKE, LN., (2006), Evaluation of pH ytonutrie nstand vitam insconte nts of Citrus fruits. *Inte National Journal of Mole Cularme de Cine and Advance Science* 1:1-6.
- OUIS N., (2015), Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. Thèse de doctorat. Université d'Oran.
- OURVALIN P., (2008), *La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques*, bull. Acad. Vêt., 161(1), France.
- OUSAAD H., RABET N., (2017), Caractérisation phénotypique de l'antibiorésistance et de quelques facteurs de virulence de souches d'*E. Coli* photogènes aviaires (APEC). Mémoire de Master. Université Mouloud Memmeri de Tizi Ouzou, pp96.
- PADRINI F., LUCHERONI MT., (1996), *Le grand livre des huiles essentielles guide pratique pour retrouve vitalité bien-être et beauté avec les essences et l'aromassage énergétique avec plus de 100 photographie*. Ed. De vecchi, paris, pp11, 15,61, et 111.
- PAGES JM., WINTERHALTER. (2008), The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in gram negative bacteria. *Nat rev microbial* 6(12); 893-903. (Pub Med) (Google Scholar).
- PONCE AG., FRITZ R., DEL VALLE CE ET ROURA SL., (2003), Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss Chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und- technologie*, 36: 679-684.
- PRESCOTT LM., KLEIN DA ET HARLAY JP., (2010), *Microbiologie, les infections urinaires et l'antibiorésistance des espèces Escherichia coli et Klebsiella*. 3edme édition. Éditions de Boeck, Belgique, p1088.
- QUINCAMPOIX J.C, MAINARD J.L., (2001), *Mécanismes de résistance des Cocci à Gram positif*. Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, de Réanimation, vol 10 : 267-75.
- RATHER, MA., DAR, BA., DAR, MY., WANI, BA., SHAH, WS., BHAT, BA., GANAI, BA., BHAT, KA., ANAND, R., QURISHI, MA., (2012), Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of *Juglans regia L.* and it constituents. *Phytomedicine* 19//1185-1190.
- REGHAISSIA. I., (2020), Extraction et caractérisation de l'huile essentielle de l'eucalyptus globulus : application comme insecticide. Mémoire de Master. Université 8 mai 1945. Guelma, pp07.

- ROMDHANE. M., (2011), Immobilisation des bactéries isolées à partir des zones minières sur des supports polymériques pour la bioremédiation. Mémoire de Master. Université de la Manouba Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thebet, pp16.
- SAADOUNE. Z., MEGUENNI. F., (2016), Impact de la composition des huiles essentielles de *Citrus sinensis* (Orange) et *Citrus limonum* (Citron) sur L'activité microbiologique, Mémoire de Master en génie des procédés, Université de Blida 1, pp58.
- SACCHETTI, G., MAIETTI, S., MUZZOLI, M., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S., RADICE, M., SOTO MENDIVIL, EA., MONRENORODRIGUEZ, JF., ESTARRON- ESPINOSA M., GARCIA- FAJARDO, JA ET OBLEDO- VAZQUEZ EN., (2006), Chemical composition and fungical activity of the essential oil of *Thymus vulgarus* against *alternaria*. *Citri-E-Gnosis*. 4(16).
- SARDA, N., (2012), *Quelques pathologies hivernales*. Préparatrice en pharmacie, p04.
- SOPHIE. Z., (2014), La résistance bactérienne aux antibiotiques : apparition et stratégies de lutte. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de limoges, pp36.
- SOUZA, EL., GUERR, NB., STAMFORD, TLM., ET DE OLIVEIRA LIMA E., (2006), Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to uses in food conservation. *rev. bras.farm*, 26.87(1):22-25.
- SLIMANI. S., (2009), Activité antioxydante et antibactérienne des extraits phénoliques d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*, Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira - Bejaïa, pp 34.
- TASSOU C., DROSINOSE. H., NYCHAS G.-J. E., (1995), Effects of essential oil from mint (*Menthapiperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 jC and 10 jC. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, pp : 593–600.
- TEUSCHER E., ANTON R., ET LOBSTEIN A., (2005), *plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et Huiles Essentielles*. Editions médicales internationales et Lavoisier.
- TIRADO. B, C., STASHENKO, EE., COMBARIZA, MY., (1995), Comparative study of Colombia oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography'-mass spectrometry.501-513.
- TOUHAMI. A., (2017), Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles de différents genres *Thymus* récoltées dans les régions de l'Est Algérien

pendant les deux périodes de développement. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar Annaba, pp14.

- TONG, SY., DAVIS, JS., EICHENBERGER, E., HOLLAND, TL., FOWLER, VG., (2015), *Staphylococcus aureus* infections : epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin microbial revu.* Jul ; 28(3) :603-61. (PMC free article).
- VEYSSIERE, AJ., (2019), La résistance antibiotique des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires, Thèse de Doctorat, Université Bordeaux, pp 23.
- WYRES K., HOLT KE., (2018), *Klebsiella pneumoniae* as a key trafcker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol* 45:131-139.<http://doi.org/10.1016/j.mib>.
- ZAIBET. W., (2016), Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de *daucus aureus* (Desf) et de *Reutera lutea* (Desf). Maire et leur application comme agents antimicrobiens dans le polyéthylène basse densité (PEBD). Thèse de Doctorat en génie des procédés pharmaceutiques. Université Ferhat Abbas-Sétif, pp119.

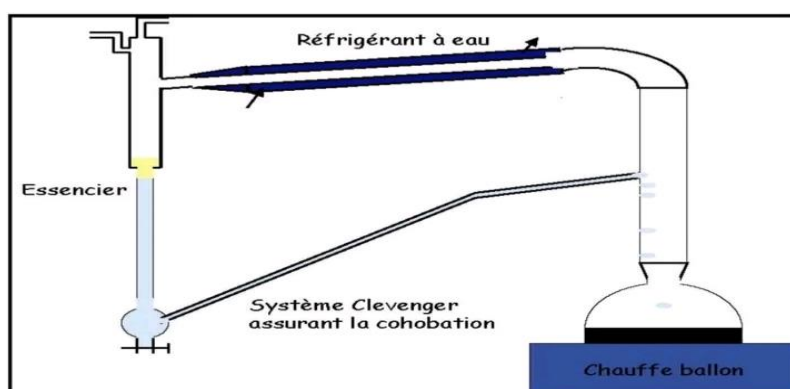


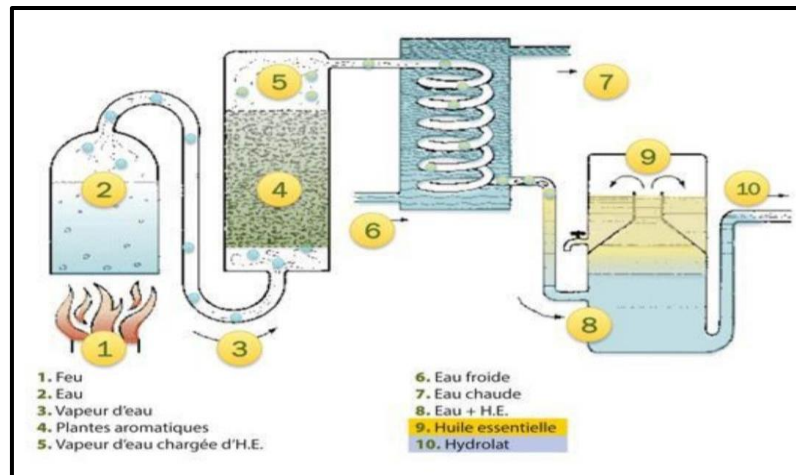
LES ANNEXES

Annexe I : Tableau 01 Les différents organes des plantes qui contiennent les huiles essentielles

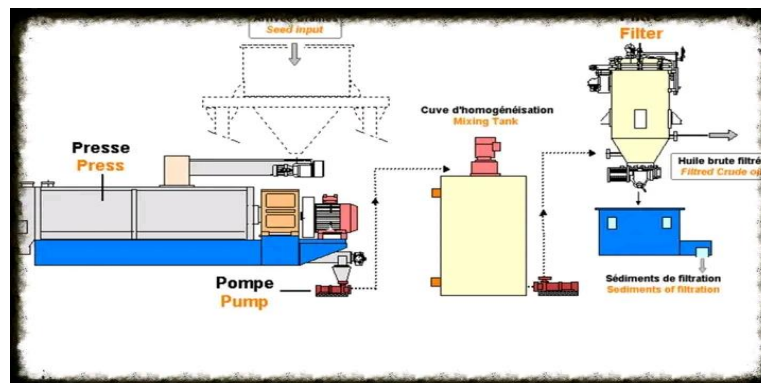
(Bruneton, 1999).

Les organes	Exemples des plantes
Sève	Encens et Myrte
Feuilles	Citronnelles et Eucalyptus
Bois	Bois de rose et Bois de santal
Rhizomes	Acore et Gingembre
Racines	Vétiver
Fleurs	Origan
Grain	Carvi
Fruits	Anis étoilé
Ecorce	Cannelle
Bourgeons	Pin

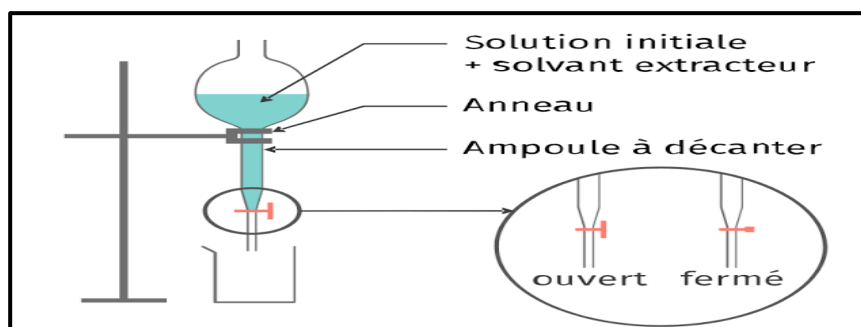
**Annexe II :** Figure 01 Schéma du montage d'hydrodistillation (clevenger) (Lucchesi, 2006).



Annexe III : Figure 02 schéma explicative de la méthode distillation à la vapeur (Djendli et Bouali, 2022)



Annexe IV : Figure 03 montage d'extraction par l'expression à froide (Bencheikh, 2017).



Annexe V : Figure 04 extraction par solvant (Nasry et Mouici, 2022).

Annexe VI : Tableau 02 taxonomie de l'espèce *Eucalyptus globulus* selon la nomenclature classique (Goetz et Ghedira, 2012).

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



Annexe VII : Figure 05 dessin représentant les fleurs et les fruits d'*Eucalyptus globulus* (Koziol, 2015).

Annexe VIII : Tableau 03 composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (Annelise, 2018).

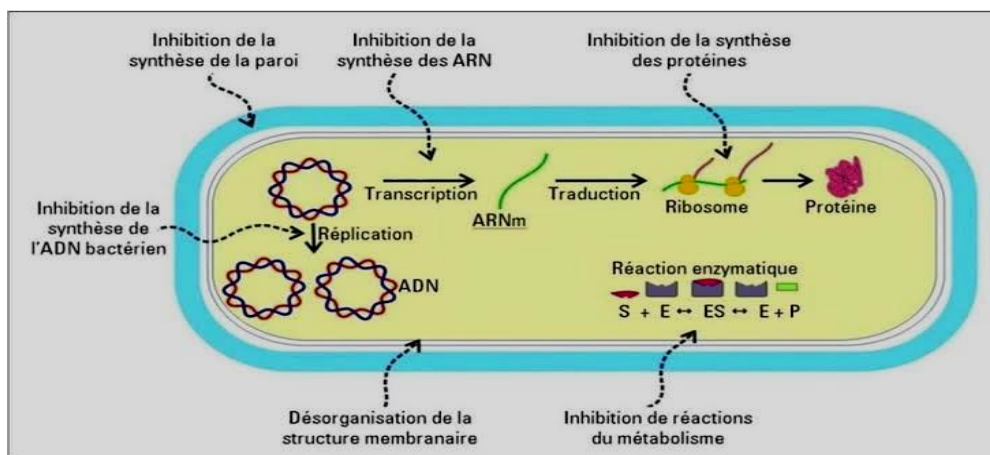
Composé d'huile essentielle	Pourcentage%
α-pinène	0,05 à 10 %.
β-pinène	0,05 à 1,5 %.
Sabinène	au maximum 0,3 %.
α-phellandrène	0,05 à 1,5 %.
Limonène	0,05 à 1,5 %.
Camphre	au maximum 0,1 %
1,8-cinéole	au minimum 70 %

Annexe IX : Tableau 04 classification du *Citron limon* (Padrini et Lucheroni, 1996).

Règne	Plantae
Embranchement	Spermaphytes
Classe	Eu dicotylédones
Ordre	Sapindales
Famille	Rutacées
Genre	Citrus
Espèce	<i>Citrus limon</i>

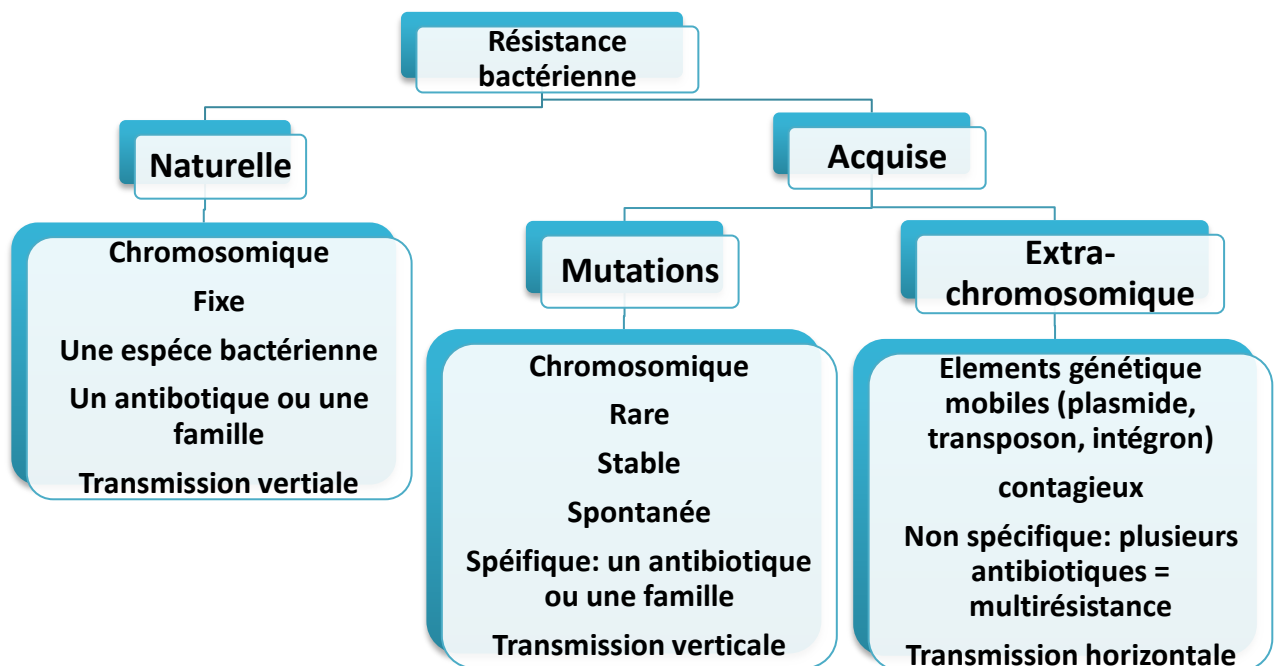
Annexe X : Tableau 05 la composition chimique de l'huile essentielle de *Citrus limon* (Djenane, 2015).

N°	Composition	%
1	51,40	Limonène
2	17,04	β -Pinen
3	13,46	γ -Terpinèn
4	03,07	α -Pinène
5	02,43	Géraniale
6	02,37	β -Mycènes
7	01,50	Nerol
8	01,23	Isocaryophyllene
9	01,05	Neryl acétate



Annexes XI : Figure 06 modes d'action des antibiotiques (Mokrani et Hamdani, 2017).

Annexe XII : Figure 08 types de l'antibiorésistance (Ourvalin, 2008).



Annexe XIII : Figure 12 disques de papier Whatman (Photo original).