



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Echahid Cheikh Laarbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Appliquée

Mémoire Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Thème :

**Etude de l'activité antibactérienne de
l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sur
quelques souches bactéries pathogène**

Présenté par :

Merzougui Naziha
Ait yahia Aziza

Devant le jury:

| | | | |
|------------------|-------|-----------------------|------------|
| Dr. Fengour . H | M.C.A | Université De Tébessa | Promotrice |
| Dr. Benhadj . M | M.C.A | Université De Tébessa | Examineur |
| Dr .Bouabida . H | M.C.A | Université De Tébessa | Président |

Date de soutenance : Le 06/06/2023 Note16/20

Année universitaire2022 /2023



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Echahid Cheikh Laarbi Tébessi –Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie



Département : Biologie Appliquée

Mémoire Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie appliquée

Thème :

**Etude de l'activité antibactérienne de
l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sur
quelques souches bactéries pathogène**

Présenté par :

Merzougui Naziha
Ait yahia Aziza

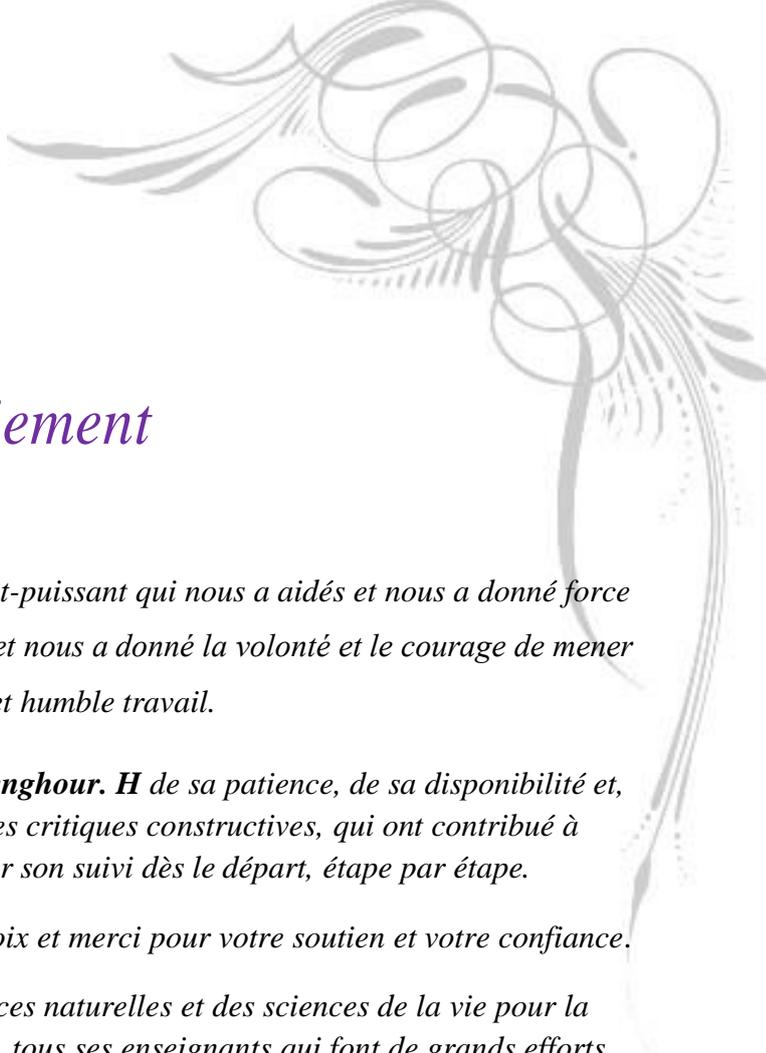
Devant le jury:

| | | | |
|------------------|-------|-----------------------|-------------|
| Dr. Fengour . H | M.C.A | Université De Tébessa | Promotrice |
| Dr. Benhadj . M | M.C.A | Université De Tébessa | Examinateur |
| Dr .Bouabida . H | M.C.A | Université De Tébessa | Président |

Date de soutenance : Le 06/06/2023 Note16/20

Année universitaire2022 /2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
خَلَقَ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ
وَالَّذِي جَعَلَ الْمَوْتَ
وَالْحَيَاةَ وَالَّذِي
يُحْيِي الْمَوْتَى
وَالَّذِي يُخْرِجُ
الْحَبَّ وَالذُّرْءَ
وَالَّذِي يُصَوِّرُ
الْبَشَرَةَ فِي أَحْسَنِ
تَقْوِيمٍ
سُبْحَانَ اللَّهِ عَمَّا يُشْرِكُونَ
اللَّهُ أَكْبَرُ
عَمَّا يُشْرِكُونَ



Remerciement

Tout d'abord, nous remercions Allah tout-puissant qui nous a aidés et nous a donné force et patience pendant ces années d'études et nous a donné la volonté et le courage de mener à bien cet humble travail.

*Nous tenons d'abord à remercier **Dr. Fenghour. H** de sa patience, de sa disponibilité et, surtout, de ses conseils précieux et ses critiques constructives, qui ont contribué à l'achèvement de ce travail et pour son suivi dès le départ, étape par étape.*

Merci de nous laisser libres dans nos choix et merci pour votre soutien et votre confiance.

Nous remercions la Faculté des sciences naturelles et des sciences de la vie pour la richesse et la qualité de leur éducation, tous ses enseignants qui font de grands efforts pour former leurs étudiants et un remerciement particulier à tous les enseignants du Département de microbiologie.

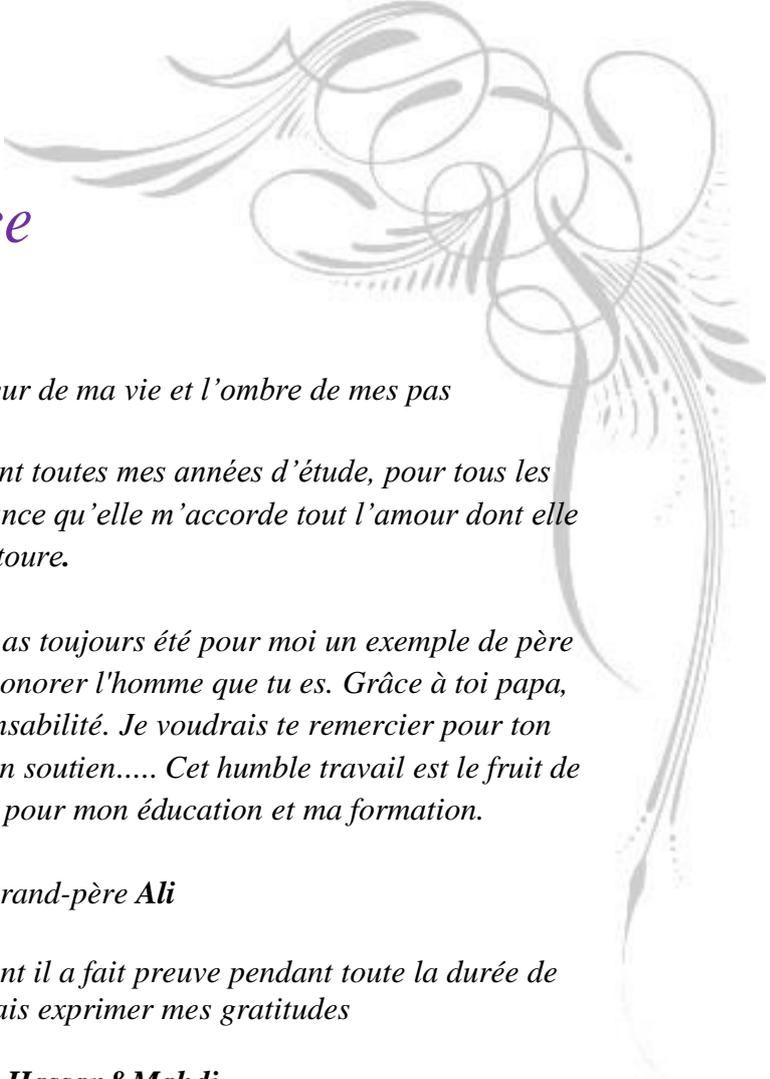
*On remercie tous les techniciens de laboratoire de microbiologie appliquée, d'une façon particulière **Iman, Karima et Rukaia**, et Mme **Hayoun**.*

*Nous exprimons également notre gratitude aux membres du jury, **Dr. Bouabida hayette** et **Dr. Benhadj mabrouka**, qui nous ont honorés en acceptant le jugement de ce travail et en participant au jury dans cet mémoire.*

Finalement, nous adressons nos chaleureux remerciements à nos familles, nos amies, et à tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail .



Dédicace



A la lumière de mes yeux, le bonheur de ma vie et l'ombre de mes pas

A ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour tous les sacrifices qu'elle mecontente, toute la confiance qu'elle m'accorde tout l'amour dont elle m'entoure.

*A mon très cher père **Merzougui Ismail** .Tu as toujours été pour moi un exemple de père respectueux, parfait et solidaire, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grâce à toi papa, j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité. Je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension et ton soutien..... Cet humble travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez faits pour mon éducation et ma formation.*

*A mon cher grand-père **Ali***

*A mon cher ami **Ahmed**, pour le soutien dont il a fait preuve pendant toute la durée de ce travail et à qui je voudrais exprimer mes gratitudees*

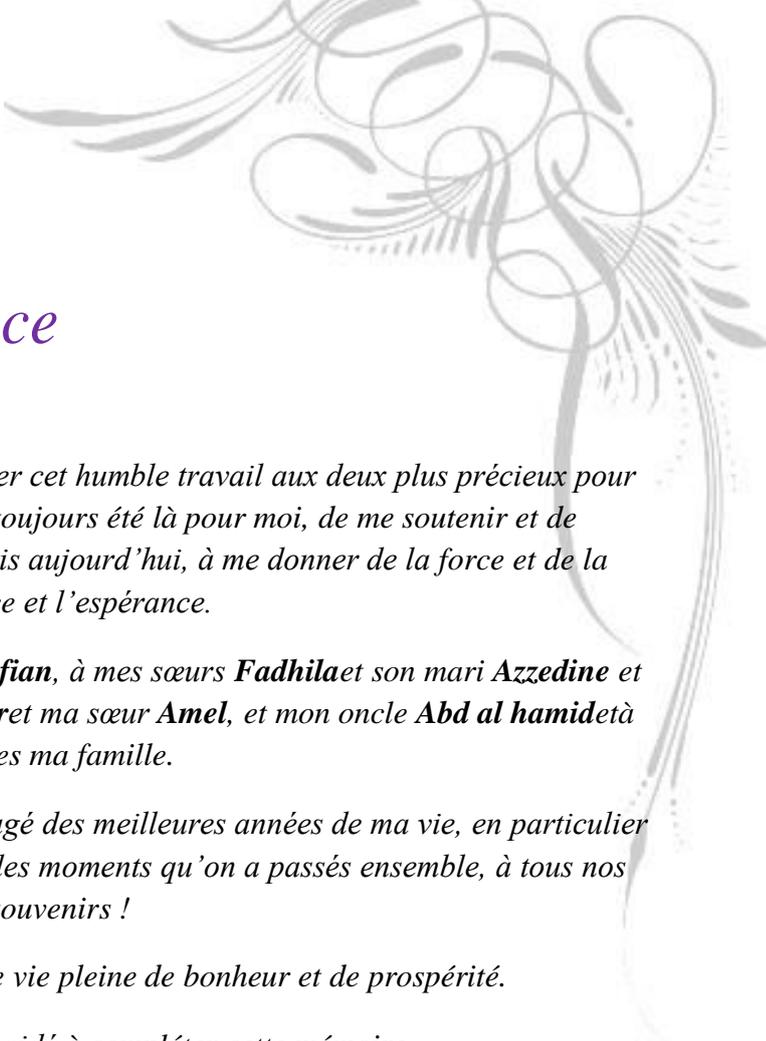
*A mes cher frère **Hassan&Mahdi***

*A mes belles sœurs **Yamama , Malak & Nour***

*j'aimerais remercier aussi mon binôme **Aziza** , qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

Naziha





Dédicace

C'est pour moi un grand plaisir de dédier cet humble travail aux deux plus précieux pour moi, ma mère et mon père, qui ont toujours été là pour moi, de me soutenir et de m'encourager à me rendre là où je suis aujourd'hui, à me donner de la force et de la patience et l'espérance.

*À mes frères **Kamel, Mohammed** et **Soufian**, à mes sœurs **Fadhila** et son mari **Azzedine** et ses enfants **Mohammed, Yannis** et **Amiret** ma sœur **Amel**, et mon oncle **Abd al hamid** et à toutes ma famille.*

*Et pour tous mes amis avec qui j'ai partagé des meilleures années de ma vie, en particulier **Fadia, djoumana** et **Oumaima**, à tous les moments qu'on a passés ensemble, à tous nos souvenirs !*

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

Et tous ceux qui m'ont aidé à compléter cette mémoire.

*Enfin, j'aimerais remercier mon binôme **Naziha**, qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

Aziza



Résumé

Depuis longtemps, la médecine traditionnelle utilise les plantes médicinales à des fins thérapeutiques. Il est actuellement reconnu comme une source importante de molécules bioactives antioxydantes et antimicrobiennes. En effet, un problème de santé publique préoccupant actuellement est l'apparition de microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, qui rendent parfois l'intervention thérapeutique inefficace. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des feuilles d'*Eucalyptus globulus*. Donc l'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydro-distillation, afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne de cette huile contre quelques bactéries pathogènes, la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme) a été utilisée. D'autre part, les concentrations minimales inhibitrice et bactéricide ont été déterminées par la méthode de micro-dilution en microplaque. Les résultats mettent en évidence que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a manifesté une activité antibactérienne contre les bactéries à gram positif et à gram négatif à des degrés variables. Des valeurs de concentrations minimales inhibitrice trouvées sont variées entre 1.25 mg/ml et 5 mg/ml et des concentrations minimales bactéricides de 2.5 mg/ml à 10 mg/ml.

La comparaison de l'effet de l'huile essentielle sur les souches bactériennes testées et celui des antibiotiques a montré une efficacité remarquable de l'huile essentielle par rapport à l'antibiotique, sur la base de ces résultats, on peut proposer l'usage de cette substance naturelle en tant qu'agent antibactérien en industrie pharmaceutique comme alternatif thérapeutique.

Mots clé : Huile essentielle, plante médicinale, Aromatogramme, CMI, CMB

ملخص

لطالما استخدم الطب التقليدي النباتات الطبية للأغراض العلاجية. يتم التعرف عليه حاليًا كمصدر مهم للجزيئات المضادة للأكسدة ومضادات الميكروبات النشطة بيولوجيًا. في الواقع، هناك مشكلة صحية عامة تثير القلق حاليًا وهي ظهور الكائنات الحية الدقيقة المقاومة للمضادات الحيوية، والتي تجعل التدخل العلاجي أحيانًا غير فعال. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لأوراق الأوكالبتوس جلوبولوس. لذلك تم استخراج الزيت الأساسي عن طريق التقطير المائي، لتسليط الضوء على النشاط المضاد للبكتيريا لهذا الزيت ضد بعض البكتيريا المسببة للأمراض، تم استخدام طريقة الانتشار على القرص (اروماتوغرام). تم تحديد الحد الأدنى من التركيزات المثبطة والبكتيرية بواسطة طريقة تخفيف الصفيحة الدقيقة. تظهر النتائج أن زيت الأوكالبتوس جلوبولوس العطري أظهر نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد البكتيريا إيجابية الجرام وسلبية الجرام بدرجات متفاوتة. وتتراوح قيم التركيزات المثبطة الدنيا الموجودة بين 1.25 ملغم/مل و 5 ملغم/مل والحد الأدنى من التركيزات البكتيرية من 2.5 ملغم/مل إلى 10 ملغم/مل.

أظهرت مقارنة تأثير الزيت العطري على السلالات البكتيرية التي تم اختبارها وتلك الخاصة بالمضادات الحيوية فعالية ملحوظة للزيت العطري مقارنة بالمضاد الحيوي، وبناءً على هذه النتائج، يمكن للمرء أن يقترح استخدام هذه المادة الطبيعية كعلاج. عامل مضاد للجراثيم في صناعة الأدوية كبديل علاجي.

الكلمات المفتاحية: زيت عطري، نبات طبي، أروماتوغرام، CMI، CMB

Abstract

Traditional medicine has long used medicinal plants for therapeutic purposes. It is currently recognized as an important source of bioactive antioxidant and antimicrobial molecules. Indeed, a public health problem of current concern is the appearance of antibiotic resistant pathogenic microorganisms, which sometimes make the therapeutic intervention ineffective. The main objective of this study is to evaluate the antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* leaves. So, the extraction of the essential oil was carried out by hydro-distillation, to highlight the antibacterial activity of this oil against some pathogenic bacteria, the method of diffusion on disk (Aromatogram) was used. the

minimum inhibitory and bactericidal concentrations were determined by the microplate micro-dilution method. The results show that *Eucalyptus globulus* essential oil showed antibacterial activity against gram-positive and gram-negative bacteria to varying degrees. Values of minimum inhibitory concentrations found are varied between 1.25 mg/mL and 5 mg/mL and minimum bactericidal concentrations of 2.5 mg/mL to 10 mg/mL.

The comparison of the effect of the essential oil on the bacterial strains tested and that of the antibiotics showed a remarkable effectiveness of the essential oil compared to the antibiotic, on the basis of these results, one can propose the use of this natural substance as an antibacterial agent in the pharmaceutical industry as a therapeutic alternative.

Keywords: Essential oil, medicinal plant, Aromatogram, CMI, CMB

Liste des tableaux

- Tableau 1: Description morphologique d'Eucalyptus 1scription morphologique d'*Eucalyptus globulus*.....3
- Tableau 2: Répartition géographique d'*Eucalyptus globulus* en Algérie3
- Tableau 3: Classification botanique d'*eucalyptus globulus*.....4
- Tableau 4: Propriétés physiques et chimiques standard pour l'HE d '*Eucalyptus globulus* . 6
- Tableau 5: tableau descriptif des milieux de culture utilisé 10
- Tableau 6: Caractéristiques des souches bactériennes utilisées. 11
- Tableau 7: Milieux utilisé pour le repiquage des souches bactériennes 14
- Tableau 8: Antibiotiques testé sur les souches bactérienne utilisées..... 17
- Tableau 9: Rendement en huile essentielle d'*E. globulus*..... 23
- Tableau 10: Rendements en l'HE d'*E. globulus* dans certains régions en Algérie 23
- Tableau 11: Caractéristiques organoleptiques de l'HE d'*E. globulus*. 24
- Tableau 12: Aspect macroscopique et microscopiques des souches bactériennes utilisées 24
- Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*E.globulus* 26
- Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibition de différentes dilutions. 27
- Tableau 16: Lecture des résultats de méthode de micro-dilution en microplaque 28
- Tableau 17: CMI d'HE d'*E. globulus* sur les souches bactérienne testée..... 28
- Tableau 18: CMB d'HE d'*E .globulus* sur les cinq souches bactérienne testées 28
- Tableau 19: CMI et CMB et le rapport CMB/CMI pour chaque souche bactérienne testés29

Liste des figures

| | |
|---|----|
| • Figure 1: Répartition géographique d' <i>Eucalyptus globulus</i> à Tébessa | 4 |
| • Figure 2: Partie aérienne d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 9 |
| • Figure 3: Localisation de région de la récolte sur la carte géographique de Tébessa | 10 |
| • Figure 4: <i>Eucalyptus globulus</i> pendant le séchage..... | 11 |
| • Figure 5: <i>Eucalyptus globulus</i> après séchage et broyage | 11 |
| • Figure 6: hydro-distillateur de type clevenger | 12 |
| • Figure 7: Extraction d'HE d' <i>E.globulus</i> | 13 |
| • Figure 8: Conservation d'HE d' <i>E. globulus</i> | 13 |
| • Figure 9: Etapes de préparation d'inoculum..... | 16 |
| • Figure 10: Etapes de préparation des disques | 16 |
| • Figure 11: Ecoulement du milieu de MH | 17 |
| • Figure 12: Etapes d'ensemencement et dépôt des disques | 18 |
| • Figure 13: Etapes de méthode des dilutions | 19 |
| • Figure 14: Microplaque utilisée dans la détermination de CMI | 20 |

Liste des abréviations

| Abréviation | Détaille |
|----------------------|--|
| % | Pourcentage |
| AFNOR | Association Française de Normalisation (Recueil des Normes Français : Huiles essentielles) |
| HE | Huile Essentielle |
| <i>E.globulus</i> | <i>Eucalyptus globulus</i> |
| MH | Mueller Hinton |
| BMH | Bouillon Mueller Hinton |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| UFC | Unité formant colonie |
| CMI | Concentration minimale inhibitrice |
| CMB | Concentration minimale bactéricide |
| PH | Potentiel Hydrogène |
| MI | Microlitre |
| L | Litre |
| G | Gramme |
| Mm | Millimètre |
| MI | Millilitre |
| H | Heure |
| Min | Minute |
| DO | Densité optique |
| G - | Gram négatif |
| G + | Gram positif |
| % | Pourcentage |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>S.aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>S.épidermidis</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| C° | Degré celsius |
| ECBU | Examen cyto bactériologique des urines |
| ± | Plus au moins |

Table de matières

Table des matières

Remerciement

Dédicace

Résumé

المخلص

Abstract

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction

| | | |
|-----|---|----|
| I- | <i>Eucalyptus globulus</i> | 3 |
| | I-1-Généralité sur la plante..... | 3 |
| | I-2- Répartition géographique d' <i>Eucalyptus globulus</i> en l'Algérie..... | 3 |
| | I-3- Classification botanique d' <i>eucalyptus globulus</i> | 4 |
| | I-4- Impact thérapeutique d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 5 |
| II- | Huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 5 |
| | II -1- Définition..... | 5 |
| | II-2-Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles..... | 6 |
| | II-3-Facteurs de variabilité des compositions..... | 6 |
| | II-4-Conservation des huiles essentielles..... | 7 |
| | II-5- Toxicité des huiles essentielles..... | 7 |
| | Matériel..... | 9 |
| | 1-Matériel végétale..... | 9 |
| 2- | Appareillage et produits (annexe 02)..... | 10 |
| 3- | Matériels biologique..... | 10 |
| | 3-1- Milieux de culture..... | 10 |
| | 3-2- Souches bactérienne utilisées..... | 10 |
| I- | Préparation de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 11 |
| | I-1- Préparation de la plante..... | 11 |
| | I-2. Extraction d'huile essentielle..... | 12 |
| | I-3-Détermination du rendement d'HE..... | 14 |
| II- | Evaluation de l'activité biologique..... | 14 |
| | II-1-Repiquage des souches bactériennes testées..... | 14 |

Table de matières

| | |
|---|----|
| II-2- Etude de l'activité antibactérienne de l'HE..... | 15 |
| II-2-1- Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne..... | 15 |
| II-2-2- Préparation des disques | 16 |
| II-2-3- Ecouler la gélose MH en boîtes Pétri..... | 16 |
| II-2-4-Ensemencement et dépôt des disques | 17 |
| II-3- Expression des résultats..... | 19 |
| II-4-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) | 20 |
| II-5- Détermination de concentration minimale bactéricide CMB | 21 |
| 1- Rendement en HE d' <i>E. globulus</i> | 23 |
| 2-Caractéristique organoleptiques | 24 |
| 3-Confirmation de la pureté des souches bactériennes utilisées | 24 |
| 4-Evaluation d'activité antibactérienne de l'HE | 25 |
| 4-1-Méthode de diffusion sur disque..... | 25 |
| 4-2-Méthode des dilutions | 26 |
| 4-3-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)..... | 27 |
| 4-4-Détermination de concentration minimale bactéricide (CMB) | 28 |
| Conclusion et perspective | 31 |
| Annexe | 30 |



INTRODUCTION



Introduction

Les plants médicinales utilisées en médecine traditionnelle sont apparues ces dernières années comme sources potentielles d'antioxydants, d'antimicrobiens et de métabolites secondaire pour les intervention thérapeutique (Muthanna et al.,2021) .Les antibiotiques existant pour traiter les infections ne sont pas toujours efficaces du fait de l'apparition des germes résistants, par conséquent la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques s'avère nécessaire (photolo et al., 2020) .

Eucalyptus globulus est une plante médicinale utilisée traditionnellement dans le traitement de plusieurs maladies notamment les infections respiratoire, la sinusite, bronchite et la toux. Pour ses raisons, nous avons réaliser cette étude sur l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* de la région de Tébessa, en déterminant le rendement et l'activité antibactérienne de l'HE (koziol ., 2015) .

Notre travail comprend deux parties, la première partie concerne l'étude bibliographique qui comporte une présentation botanique de l'espèce *Eucalyptus globulus*, sa localisation géographique et son impacte thérapeutique et présente aussi des généralités sur les huiles essentielles, leurs propriété physique et chimique et les facteurs de variabilité de ses compositions, ainsi que leurs toxicité. La deuxième partie correspondre à notre étude expérimentale : Extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et étude de l'activité antibactérienne. Cette partie est consacrée à la présentation du matériels et des procédés méthodologique suivis par les résultats obtenus et discussion .

En fin, une conclusion générale qui portera une lecture attentive sur les différents résultats obtenus.



Partie I:

Etude bibliographique



I- Eucalyptus globulus

I-1-Généralité sur la plante

Eucalyptus globulus, communément appelé eucalyptus commun, gomme bleue, eucalyptus bleu, eucalyptus officinale, arbre à fièvre. *Eucalyptus globulus* est l'une des espèces d'eucalyptus les plus célèbres au monde, originaire du sud-est de l'Australie et de la Tasmanie. Découvert par l'explorateur et botaniste français Jacques Julian Hutto en 1792, il est considéré comme l'un des arbres les plus hauts, atteignant une hauteur de 101 mètres (Potts .,2004).

Eucalyptus globulus est une plante aromatique adaptable et à croissance rapide, ce qui lui permet de survivre à une grande variété de conditions climatiques et de changements environnementaux, mais elle pousse mieux dans les climats plus chauds tels que les régions tropicales, subtropicales et Tempéré, a besoin de beaucoup d'eau, ne tolère pas les basses températures (Vaughan ., (2008).

Tableau 1: De Description morphologique d’Eucalyptus 1scription morphologique d’Eucalyptus globulus (Hayat., 2015).

| | Feuilles | Fleurs | Fruits | Tronc | graines |
|----------------|---|---|--|---------------|----------------|
| Forme | alternes, pétiolées, falciforme ou ovales, larges, sessiles | Apétales constituées d’étamines solitaire, mellifères | Grosses capsules ligneuses de 1.5 à 2.5 cm | Droit Lisse | minuscules |
| Couleur | Vert luisant Bleu-gris | Blanc-Crème à crème | marron | Blanc au gris | sombre |

I-2- Répartition géographique d’Eucalyptus globulus en l’Algérie

L'espèce *Eucalyptus globulus* a été introduite en Algérie par les Français en 1856, Mais, la plantation massive de ces arbres a eu lieu, entre 1865 et 1963. *Eucalyptus globulus* a été planté avec une base exceptionnelle pour nettoyer les zones marécageuses où les anophèles et les moustiques vecteurs d'une maladie parasite endémique : le paludisme (Aït Youssef, 2006). Pendant les années 1865 et 1963, le reboisement à base d'eucalyptus a été concentré dans l'est, le centre et l'ouest du nord de l'Algérie. (Atmani M, 2018)

Tableau 2: Répartition géographique d’Eucalyptus globulusen Algérie (taboukouyouout .,2012)

| Blida | Boumerdès | Sétif | Sidi Belabbes | Skikda | El Tarf |
|--------------|-------------------|--------------|----------------------|---------------|----------------|
| 41 Has | 93 Has 70. Has | 10Has | 342 Has | 2250 Has | 1000 Has |



Figure 1: Répartition géographique d'*Eucalyptus globulus* à Tébessa (modifier)

I-3- Classification botanique d'*eucalyptus globulus*

Tableau 3: Classification botanique d'*eucalyptus globulus* (Ghedira ., 2008).

| | |
|-------------|---------------------|
| Règne | Plantae |
| Sous-règne | Tracheobionta |
| Division | Magnoliophyta |
| Classe | Magnoliopsida |
| Sous-classe | Rosidae |
| Ordre | Myrtales |
| Famille | Myrtaceae |
| Genre | Eucalyptus |
| Espèce | Eucalyptus globulus |

I-4- Impact thérapeutique d'*Eucalyptus globulus*

Le premier et principal objectif de la replantation de *Eucalyptus globulus* était de sécher et de nettoyer les marécages dans lesquels se multiplient les insectes vecteurs du paludisme (Aït Youssef ,2006) . Mais au fil du temps, les chercheurs ont découvert que cet arbre a de nombreuses propriétés thérapeutiques, y compris :

- Soulage les infections des voies respiratoires basses telles que la toux, la bronchite (saisonnaire, chronique) la pneumonie, l'emphysème.
- traiter les troubles infectieux des voies respiratoires hautes (rhume, rhinopharyngite, sinusite, otite).
- diurétique, antirhumatismale, antioxydant, Antidiabétique
- Antifatigue : Il a une propriété analgésique, de détendre les muscles, de se sentir plus alerte, plus vigoureux
- traitement des ampoules, des brûlures, des blessures et des plaies
- propriétés répulsives et insecticides, Anticancéreux
- propriétés antibactériennes, propriétés antifongiques, activité antivirale
- Possède une activité antiseptique et anti-inflammatoire (Koziol ,2015)

II- Huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

II -1- Définition

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes de composés volatils caractérisés par une forte odeur, naturellement synthétisés au cours du métabolisme secondaire des plantes et isolés uniquement par des moyens physiques (pressage et distillation) à partir d'une plante entière ou d'une partie de plante (fleurs , feuilles , grains , bourgeons, racines) d'origine taxonomique connue. (Fanz et al ,2020) .

Un large des plantes de parcours ayant des propriétés médicinales ont été explorées et utilisées pour l'extraction des huiles essentielles dans le monde entier (Akthor et al ,2014) , qui sont employées en aromathérapie et pour le traitement de plusieurs maladies dont les maladies cardiovasculaires, le diabète, la maladie d'Alzheimer, le cancer . Les effets antimicrobiens des huiles essentielles et de leurs composants chimiques ont été reconnus par plusieurs chercheurs dans le passé . De plus, des études ont montré l'effet synergique de deux ou plusieurs ingrédients d'huiles essentielles contre divers agents pathogènes humains (Swamy et al ,2016) .

Selon la norme Afnor NT 75-006 de février 2006 « Une huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière première d'origine végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par des procédés mécaniques à partir de l'épicarpe des citrus, soit par distillation « sèche » , et qui est séparé de la phase aqueuse par des procédés physiques ». Cette définition détermine les huiles essentielles au sens strict. Mais, de ce

fait, elle écarte les produits obtenus, toujours à partir de matière première végétale, mais en employant d'autres procédés d'extraction, comme l'utilisation de solvants non aqueux ou l'enfleurage (Besombes, 2008).

II-2-Propriétés physico-chimiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont caractérisées par des propriétés physiques (densité, pouvoir rotatoire, indice de réfraction, miscibilité dans l'alcool, ...) ainsi que par des propriétés chimiques (indice d'acide, d'ester, d'iode et de carbonyle). L'étude de ces propriétés est utilisée comme une méthode pour déterminer la qualité des huiles essentielles.

Les huiles essentielles sont solubles dans l'alcool, et les huiles fixes, et la plupart des solvants organiques, mais insolubles dans l'eau. Ils sont odorants et inflammable. Leur densité est le plus souvent inférieure à 1 (densité de l'eau) et varie en fonction de leur composition chimique. Ces huiles volatiles sont généralement liquides et incolores ou jaune pâle à température ambiante (Dhifiet al, 2016). Les différentes propriétés physico-chimiques d'HE d'*eucalyptus globulus* est déterminées selon les normes AFNOR dans le tableau 01 (Boukhatem et al, 2014).

Tableau 4: Propriétés physiques et chimiques standard pour l'HE d '*Eucalyptus globulus* selon l'AFNOR (2000).

| | Paramètre | AFNOR |
|---------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Propriétés physique | Indice de réfraction à 20 °c | 1.4590 à 1.4670 |
| | Gravité spécifique à 20°C | 0.906 à 0.923 |
| | Pouvoir rotatoire à 20°C | 0° à 10° |
| | Densité à 20 °c | 0.905 à 0.925 |
| Propriétés chimique | Indice d'acide | <10 |
| | Indice d'hydroxyle | 10 à 100 |
| | Indice d'iode | 20-60 |

II-3-Facteurs de variabilité des compositions

une très grande variabilité qualitatif et quantitatif dans le rendement des huiles essentielles, ainsi que dans leurs compositions est déterminée par nombreux facteurs (Dhifi et al 2016), d'origine intrinsèque (facteurs génétiques, localisation, degré de maturité), d'origine extrinsèque (sol, climat, altitude, la date de récolte) ou technologique c'est-à-dire lié aux techniques d'exploitation de matériel végétal. en effet de profondes modification s'opèrent lors du séchage, du stockage, de l'extraction et du conditionnement (Evans, 1996).

II-4-Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles se conservent très longtemps si cela est fait dans les bonnes conditions. En effet l'instabilité relative des molécules qui composent les huiles essentielles, rend leur conservation délicate. Trois facteurs principaux interviennent dans leur altération qui sont :

La température : obligation de stockage à basse température (entre 8°C et 25°C).

La lumière: les stocker dans l'obscurité et dans un flacon en verre de préférence.

L'oxygène: les flacons doivent être entièrement remplis et fermés de façon étanche, il est possible de recourir à l'adjonction d'anti-oxydants. La durée de conservation admise est de 2 à 5 ans (**Atmani-Merabet ,2018**) .

II-5- Toxicité des huiles essentielles

Bien que les huiles essentielles sont des substances naturelles, mais cela ne signifie pas qu'il est sans danger pour la santé humaine. Il est ainsi important de connaître le produit, le choisir selon des critères qualitatifs rigoureux, de respecter avec précision les doses et de choisir le mode d'administration adéquat, et pour éviter la survenue d'effets indésirables, et les interactions avec d'autres médicaments (**Eisenhut .,2007**). L'action de l'huile essentielle est assimilée à l'action de l'un de ces composants ou quelques-uns de ses composants, ainsi qu'à certains métabolites issus des biotransformations de ces composés (**Wafaa .,2016**)



Partie II:

Matériel et méthodes



Partie II : Matériels et méthodes

La partie expérimentale a été effectuée au sein des laboratoires de microbiologie (N°2) du département de biologie appliquée de la Faculté des Sciences exacte et science de la Nature et de la Vie, Université de Echahid Cheikh Laarbi Tebessi de Tébessa, durant une période de deux mois (allant du 5 Mars jusqu'au 5 Mai) de l'année universitaire 2023.

Objectif de ce travail :

- Extraction des huiles essentielles d'*eucalyptus globulus*
- Détermination du rendement en huile essentielle d'*E. globulus*.
- Etude « In vitro » de l'effet antibactérien de l'HE d'*Eucalyptus globulus* sur quelques bactéries pathogènes provenant d'infection urinaire.
- Détermination de la CMI et CMB de l'HE pour chaque souche bactérienne testée.

Matériel

1-Matériel végétal

La plante *Eucalyptus globulus* a été récoltée dans la région de El Oglia la wilaya de Tébessa le 15 janvier 2023, et identifiée par Dr. Hayoun enseignante au département des êtres vivants. La récolte a été réalisée au hasard et concerne seulement la partie aérienne de l'arbre (feuilles).



Figure 2: Partie aérienne d'*Eucalyptus globulus* (photo personnelle , 2023)

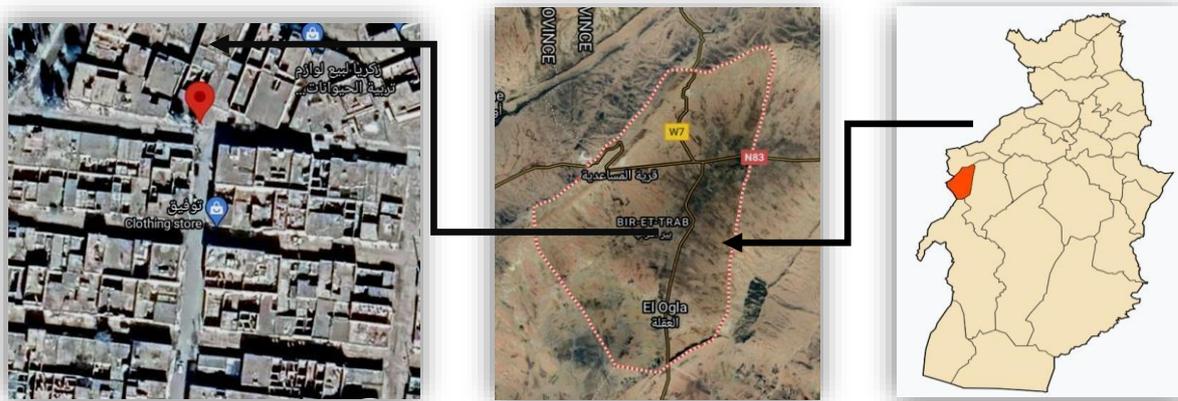


Figure 3: Localisation de région de la récolte sur la carte géographique de Tébessa
(GoogleMaps , 2023)

2-Appareillage et produits (annexe 02)

3- Matériels biologique

3-1- Milieux de culture

Tableau 5: tableau descriptif des milieux de culture utilisé

| Les milieux de culture | Utilisation |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Gélose nutritive • Chapman | Repiquage des souches bactériennes testées |
| <ul style="list-style-type: none"> • Bouillon MH • MH | Etude de la sensibilité des bactéries aux agents antibactérienne |

3-2- Souches bactérienne utilisées

L'huiles essentielles d'*E .globulus* a été testées sur cinq souches bactériennes : *Escherichia coli* , *Serratia ssp* ,*Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (**annexe 04**). Les souches sont obtenus à partir d'un infection urinaire (ECBU) , les principaux caractéristiques de ces dernière sont présentés dans Le tableau suivant :

Tableau 6: Caractéristiques des souches bactériennes utilisées.

| Souche bactérienne | Famille | Gram | Forme |
|-------------------------|---------------------------|---------|----------|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | Négatif | Bacilles |
| <i>Serratia .ssp</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | Négatif | Bacilles |
| <i>K. pneumoniae</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | Négatif | Bacilles |
| <i>S. epidermidis</i> | <i>Staphylococcaceae</i> | Positif | Coques |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcaceae</i> | Positif | Coques |

Méthode

I- Préparation de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

I-1- Préparation de la plante

Après avoir récolter l'*Eucalyptus globulus*, les feuilles ont été nettoyé et séché à l'air libre et à l'ombre pendant 10-15 jours. Puis la matière végétale est transportée au laboratoire de microbiologie où sont écrasées manuellement avec du mortier pour commencer le processus d'extraction.



Figure 4: *Eucalyptus globulus* pendant le séchage (photo personnelle, 2023)



Figure 5: *Eucalyptus globulus* après séchage et broyage (photo personnelle,2023)

I-2. Extraction d'huile essentielle

❖ Principe d'extraction des HE

Le principe consiste à immerger la matière première (la plante dont on souhaite extraire l'HE) dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition . Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient (**Tour et al , 2015**) .

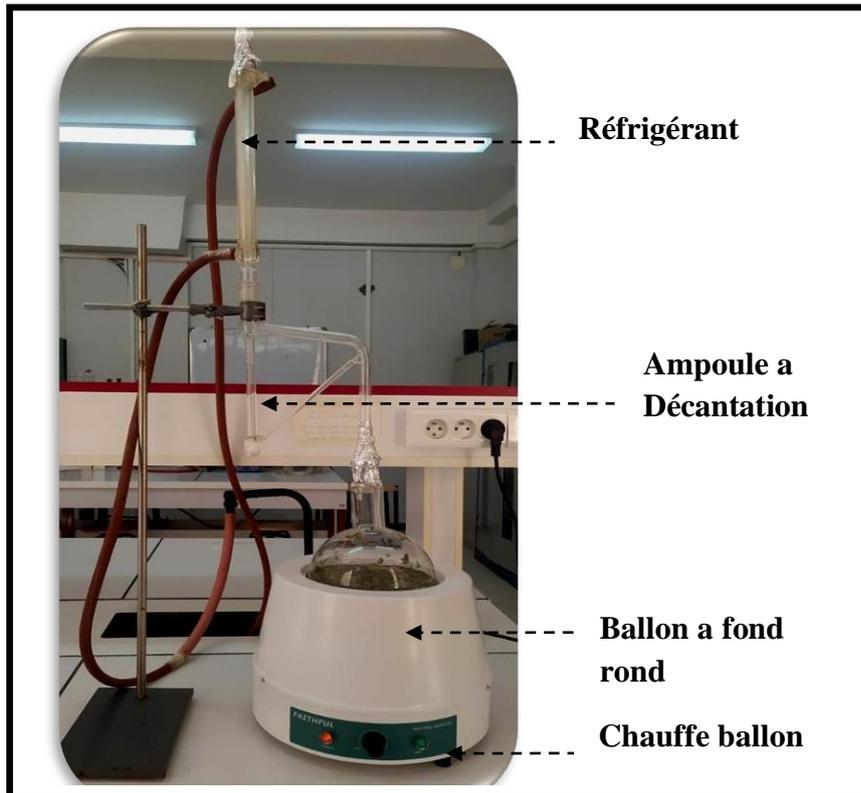


Figure 6: hydro-distillateur de type clevenger(photo personnelle ,2023)

❖ Mode opératoire

- L'extraction de l'HE de partie aérienne (feuilles) d'*E. globulus* a été réalisée par un hydro-distillation pendant 2 heures et 30 min , où l'hydro-distillation a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type Clevenger .
- L'hydro-distillateur a été rincé avec l'acétone et l'eau distillée a fin d'éviter la contamination de huile pendant l'extraction.
- Dans un ballon de 2 L , une quantité de 100 g de la matière végétale broyée est mis en contact direct avec 1 L d'eau distillée . Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon , et l'huile a commencé à s'accumuler dans l'ampoule de décantation qui était recouvert de papier aluminium .
- L'huile essentielle obtenue est séparé à la phase aqueuse (l'eau aromatique) par différence de densité

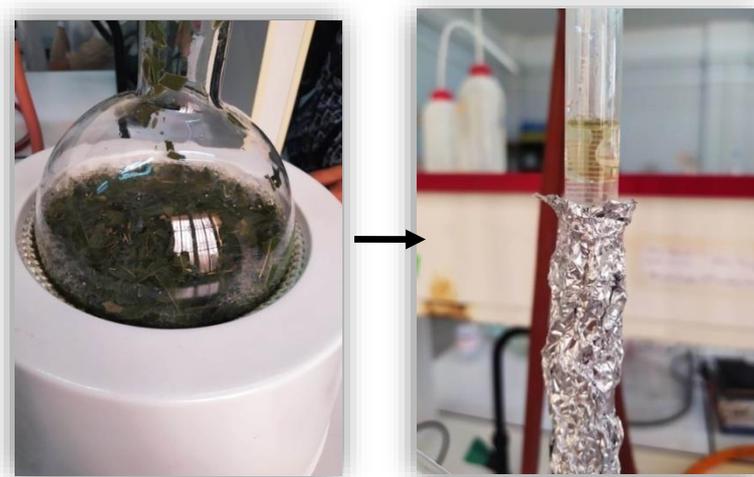


Figure 7: Extraction d'HE d'E.globulus (Photos personnelle .2023)

❖ Conservation d'HE obtenue

Le volume d'HE obtenu a été récupéré et mesuré pour calculer le rendement , puis conservé dans un flacon en verre stérile. Le flacon a été par la suite couvert d'un papier aluminium à l'arbi de la lumière puis conservé dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à son utilisation .



Figure 8: Conservation d'HE d'E. globulus (Photo personnelle ,2023)

I-3-Détermination du rendement d'HE

Le rendement en huile essentielle est variable selon différents facteurs comme le séchage de la matière végétale, le broyage et la durée d'extraction . C'est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante à traiter (sèche). Le rendement est exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = \text{Masse de l'HE} / \text{Masse}$$

R (%) : Rendement en huile essentielle

Masse (HE) : masse de l'huile essentielle

Masse (MVS) : masse du matériel végétal sec (AFNOR, 1987).

II- Evaluation de l'activité biologique

II-1-Repiquage des souches bactériennes testées

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir des cultures jeunes de 18h à 24 heures en phase de croissance exponentielle. La revivification des souches est effectuée par l'ensemencement de l'espèce bactérienne par la méthode des stries sur des milieux de culture gélosé , puis l'incuber à 37 c° pendant 24 à 48 heures , les milieux utilisé pour chaque souche est résumer dans le tableau suivant :

Tableau 7: Milieux utilisé pour le repiquage des souches bactériennes

| La souche bactérienne | Le milieu de réactivation |
|------------------------------|---------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Gélose nutritive |
| <i>Serratia ssp</i> | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | |
| <i>S. epidermidis</i> | Milieu chapman |
| <i>S. aureus</i> | |

❖ Confirmation de la pureté des souches bactériennes étudiées

Cette étape est basée sur les caractères culturaux et la coloration de Gram .

- Aspect macroscopique : C'est un examen à l'œil nu pour mettre en évidence la description des colonies sur milieu solide : la forme , le contour , la taille et la couleur des colonies (annexe 05) .
- Aspect microscopique : La détermination de l'aspect microscopique des bactéries étudiées a été réalisé par coloration de gram.

II-2- Etude de l'activité antibactérienne de l'HE

Afin d'étudier l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*E. Globulus* , une méthode de diffusion sur gélose par disque de papier whatman de 6 mm de diamètre a été réalisée (l'aromatogramme)

II-2-1- Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne

A partir des boîtes contenant les colonies pures et jeune on a préparé des suspensions pour chaque espèce, à l'aide d'une pipette pasteur on récupère trois à quatre colonies pure bien isolées et parfaitement identiques, et ont été déchargées dans un tube contenant 10 ml d'eau physiologique stérile.

La suspension bactérienne est homogénéisée de façon à obtenir un inoculum d'une opacité équivalente au standard McFarland 0.5 ce qui correspond à 10^7 UFC/ml pour les bactéries (D.O de 0.08 à 0.1 , lue à 625 nm) (**annexe 06**) .



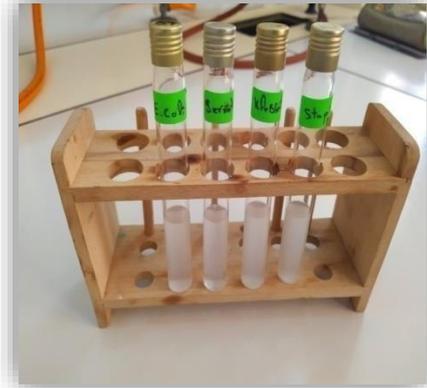
A-Prélèvement des colonies



B- Déchargement des colonies prélevées



C- Homogénéisation par vortex



D-Ajustement de la charge bactérienne selon le standard de MCFerland

Figure 9: Etapes de préparation d'inoculum (photos personnelle ,2023)

II-2-2- Préparation des disques

des disques de 6 mm de diamètre sont découpé à partir du papier whatman n°1 , en contour régulier pour donner des zones d'inhibition facile à mesurer .Puis les disques introduits dans un flacon en verre et sont placés dans un autoclave pour la stérilisation



Figure 10: Etapes de préparation des disques (photos personnelle ,2023)

II-2-3- Ecouler la gélose MH en boîtes Pétri

La gélose Mueller-Hinton a été liquéfié dans un bain marie, puis couler aseptiquement dans des boites pétri et laissé sur la pailasse jusqu'à solidifier.



Figure 11: Ecoulement du milieu de MH (photo personnelle , 2023)

II-2-4-Ensemencement et dépôt des disques

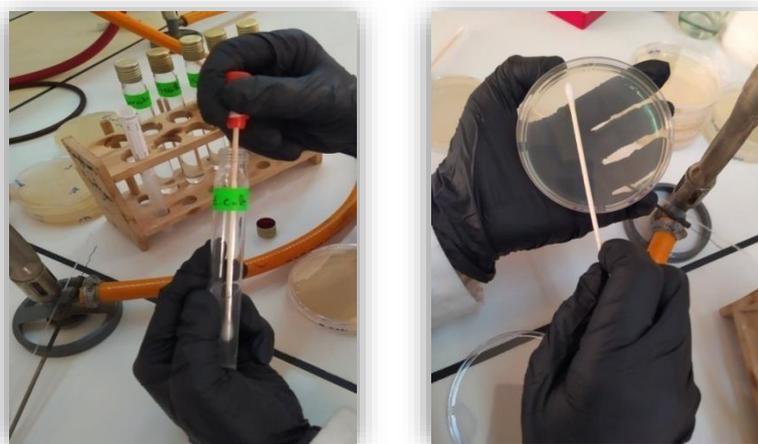
- Un écouvillon stérile est imbibé dans la suspension bactérienne de 0.5Mc Farland précédemment préparé.
- L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélose MH, de haut en bas, en stries serrées . L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon .
- Les boîtes ensemencées ont été mises à sécher pendant 20 min à température ambiante .
- A l'aide d'une pince stérile , pour chaque souche bactérienne deux disques stériles de papier Whatman n° 1 de 6 mm de diamètre ont été déposés , le premier disque est imbibé de 10 µl d'HE et le second avec 10 µl de DMSO qui représente le témoin négatif .
- En ce qui concerne les témoins positifs, des disques d'antibiotique ont été utilisés pour l'évaluation de la sensibilité des souches bactériennes testées dans ce travail..les disques utilisés pour chaque souche sont représentés dans le tableau en dessous .

Tableau 8: Antibiotiques testés sur les souches bactériennes utilisées

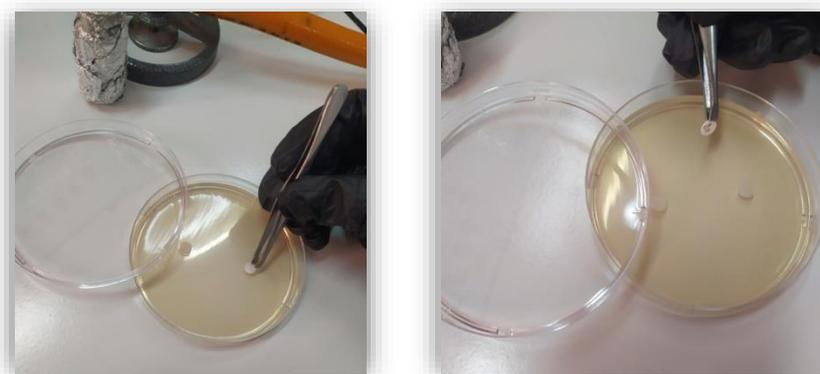
| Souche | Antibiotique | Code | Charge (mg) |
|----------------------|----------------|------|--------------|
| <i>E. coli</i> | Gentamicine | GN | 10 |
| <i>K. pneumoniae</i> | Gentamicine | GN | 10 |
| <i>Serratia ssp</i> | Gentamicine | GN | 10 |
| <i>S.epidermidis</i> | Ciprofloxacine | CIP | 10 |
| <i>S.aureus</i> | Ampicilline | Am | 10 |

Partie II : Matériels et méthodes

- les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser à la température ambiante pendant 30min et mise à l'étuve à une température de 37°C pendant 24heures.



A : Etapes d'ensemencement par écouvillonnage



B : Dépôt des disques de papier whatman et d'antibiotique

Figure 12: Etapes d'ensemencement et dépôt des disque (photos personnelle ,2023)

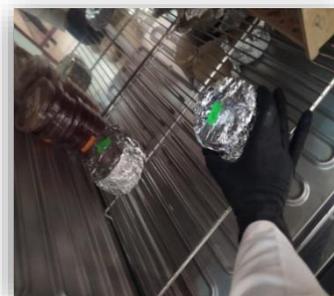
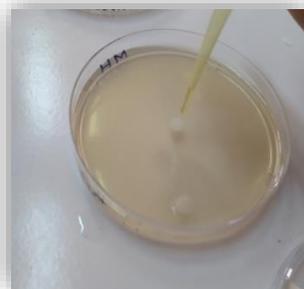
❖ Méthode des dilutions

Dans des eppendorfs stériles des différentes dilutions de deux en deux d'huile essentielle étudié ($1/2$, $1/4$, $1/8$, $1/16$, $1/32$) ont été préparées avec le DMSO. Ces dilutions d'huile essentielle ont été testées sur les cinq souches bactériennes citées précédemment. Le but est de confirmer les effets d'inhibition de croissance exercés par l'HE d'*E. globulus* à partir les diamètres d'inhibition.



A : Préparation des dilutions d'HE d'*E. globulus*

B : Ecouvillonnage



C : Dépôt des disques et des dilutions d'HE

D : Incubation

Figure 13: Etapes de méthode des dilutions (photos personnelle,2023)

II-3- Expression des résultats

La lecture se fait à l'aide d'un pied à coulisse par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque en mm.

La sensibilité des bactéries à l'huile essentielle, permet de les classés en 4 groupe selon le diamètre de la zone d'inhibition, ils sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 09 : Sensibilité des souches microbiennes en fonction des zones d'inhibition (Mouas . 2017) .

| Sensibilité | Zone d'inhibition |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| Non sensible ou résistante (-) | diamètre < 8mm |
| Sensible (+) | diamètre compris entre 9 à 14 mm |
| Très sensible (++) | diamètre compris entre 15 à 19 mm |
| Extrêmement sensible (+++) | diamètre > 20 mm |

II-4-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice par définition correspond à la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance bactérienne (Mnayer ,2014) , elle est déterminée par l'observation du trouble induit par la croissance des germes étudiés dans chaque puits .

❖ Mode opératoire

- La suspension bactérienne à été préparée à partir des colonies jeune et pur selon la méthode précédente .
- Le bouillon MH avec 0.5% de tween 80 ont été utilisées comme milieu de culture.
- L'huile essentielle est ajoutée au premier puits qui contient 170 μ l de milieu de culture, les autres puits contiennent déjà 95 μ l de bouillon MH (tween 80 : 0.5%)
- Après homogénéisation du premier puits , 95 μ l de mélange sont transférés dans la deuxième puits et ainsi de suite , les 95 μ l de dernière puits sont retirés .
- Les puits contenant les différentes dilutions à été Ensemencées la suspension bactérienne a testés.
- Les puits de la première colonne(A) à été rempliées avec une quantité de bouillon BMH (témoin négatif).
- Les puits de la deuxième colonne (B) à été rempliées avec une quantité de bouillon BMH et la suspension bactérien (témoin positif).
- Répéter Toutes les étapes à été répétées pour chacun des souches bactériennes utilisées .
- La microplaque à été par la suite recouvertes et incubées à 37°C pendant 24h (Oumaskour et al 2021) .



Figure 14:Microplaque utilisée dans la détermination de CMI

II-5- Détermination de concentration minimale bactéricide CMB

La CMB correspond à la concentration en HE nécessaire à laquelle l'action bactéricide est totale. Elle est rapportée comme étant la plus faible concentration où aucune croissance n'est observée après repiquage en milieu gélosé solide. Le test de la CMB succède directement au test de la CMI. En fait, la même gamme de concentration réalisée par la technique des micro-dilutions par la CMI est utilisée pour déterminer la CMB de l'huile essentielle à tester. La méthode consiste à faire un ensemencement des cultures n'ayant pas donné de développement bactérien sur la gélose (MH). Puis, l'incubées à la température optimale du germe pendant 24 à 48 h. Après incubation, la CMB est considérée comme étant la concentration minimale en HE pour laquelle aucun développement bactérien n'est observé (**Mnayer ,2014**).



Résultats et discussion



Résultats et discussion

1- Rendement en HE d'*E. globulus*

L'extraction des huiles essentielles d'*E. globulus* de la région d'El-Ogla a permis d'avoir un rendement moyenne de 0.80 ml pour 100 g de matière végétale correspond à un taux de 0.80 % d'huile essentielle.

Tableau 9: Rendement en huile essentielle d'*E. globulus*

| Essai | Ess 1 | Ess 2 | Ess 3 | Ess 4 |
|--------------------------|------------------|-------|-------|-------|
| Rendement | 0.82 | 0.79 | 0.85 | 0.76 |
| Rendement moyenne | 0.80±0.03 | | | |

Le rendement obtenus pour l'huile essentielle de l'espèce *E. globulus* dans certains régions en Algérie est présenté dans le tableau 11.

Tableau 10: Rendements en l'HE d'*E. globulus* dans certains régions en Algérie

| Rendements(%) | Origines | Référence |
|---------------|--------------------|------------------------------------|
| 0.93 | Constantine | Atmani-Merabet et al .,2018 |
| 0.2 | Blida | Boukhatem et al .,2014 |
| 0.65 | Ain Defla | Chiba-Djouaher,2018 |
| 0.51 | Ouargla | Kebsi,2011 |
| 0.48 | Tizi-Ouzou | Taleb-Toudert,2015 |

Les rendements rapportés dans différentes régions d'Algérie de l'HE d'*Eucalyptus globulus* varient entre 0,2 % et 0.93% , la comparaison de nos résultats avec ces travaux sur la même espèce nous a amené à dire que notre résultats (0.80%) est légèrement inférieur à celui rapporté par Armani-Merabet et al en 2018 avec une rendement de 0.93 % de la même espèce récolté dans la région de Constantine , et élevé à ceux trouvés par Chiba-Djouaher en 2018 de la région de Ain defla et Kebsi en 2011 dans la région de Ouargla dont les rendements sont estimés respectivement 0.65 % , 0.51% , mais plus élevé à ceux obtenus par Boukhatem et al en 2014 de la région de Blida et Taleb –Toudert en 2015 de la région de Tizi-Ouzou dont les rendements sont estimé respectivement 0.2% , 0.48% .

Etant donné que l'HE est un produit de métabolisme de cellules végétales et que sa compositions quantitative et qualitative peut varier en fonction de l'environnement (le type de sol , la phase de croissance de la plant, climat) , mais aussi autres facteur comme le séchage de la matière végétale , méthode d'extraction , le temps de récolte ...) , cela explique les variations des rendements d'EH de la plant d'*E. golbulus* .

2- Caractéristique organoleptiques

Les caractères organoleptiques des l'HE des feuilles d'*eucalyptus globulus* obtenu par l'Hydro-distillation sont présentés dans le **tableau 12** :

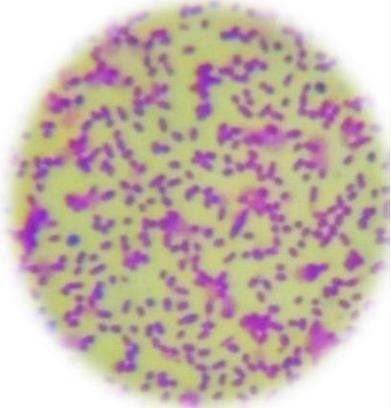
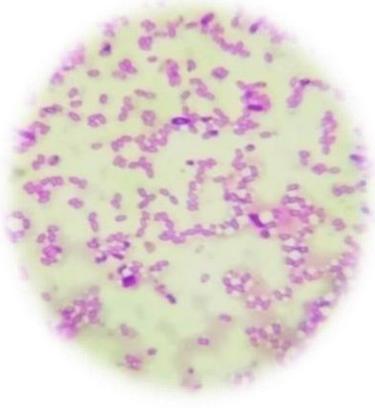
Tableau 11: Caractéristiques organoleptiques de l'HE d'E. globulus.

| | Aspect | Couleur | Odeur |
|---|-----------------|-------------|-------------|
|  | Liquide limpide | Jaune clair | Forte odeur |

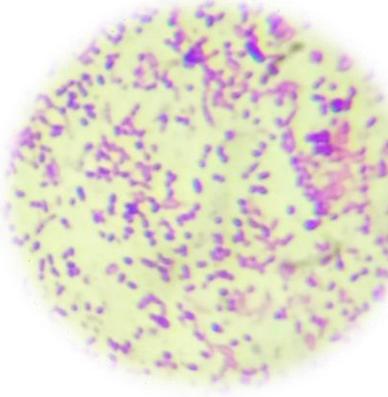
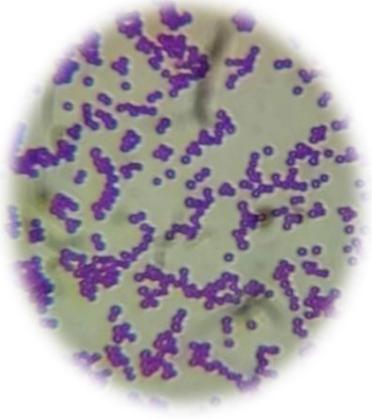
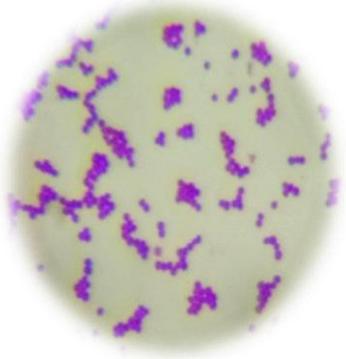
3- Confirmation de la pureté des souches bactériennes utilisées

Les résultats de la coloration de gram des souches bactériennes sont présenté dans le tableau suivant :

Tableau 12: Aspect macroscopique et microscopiques des souches bactériennes utilisées

| G | Les souches bactériennes | Aspect macroscopique | Aspect microscopique (au grossissement *100) |
|-----|--------------------------|---|---|
| G - | <i>E. coli</i> |  |  |
| G- | <i>Serratia.ssp</i> |  |  |

Résultats et discussion

| | | | |
|----|-----------------------|---|---|
| G- | <i>k. Pneumoniae</i> |  |  |
| G+ | <i>S. Epidermidis</i> |  |  |
| G+ | <i>S. aureus</i> |  |  |

G - : Gram négatif , **G +** : Gram positif

4-Evaluation d'activité antibactérienne de l'HE

4-1-Méthode de diffusion sur disque

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de la plante *Eucalyptus globulus* sur les cinq souches bactérienne sont représenté dans le tableau 12 . Les résultats ont été exprimées sou forme de moyenne \pm écart type, et la lecture des résultats ont été faite à l'aide de tableau N° : 08

Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'E.globulus

| Souches | Témoin négatif (DMSO) | Zones d'inhibition (mm) | Sensibilité Bactérienne | Témoin Positif | Sensibilité Bactérienne |
|----------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|-------------------------|
| <i>E. coli</i> | 00 | 23.8± 0.34 | (+++) | GN | 19.9 ± 00 (++) |
| <i>Serratia.ssp</i> | 00 | 40.9± 2.25 | (+++) | GN | 22.8 ± 00 (+++) |
| <i>K.Pneumonie</i> | 00 | 24.7± 0.80 | (+++) | GN | 18.2 ± 00 (++) |
| <i>S.epidermidis</i> | 00 | 41.0± 3.63 | (+++) | CIP | 22.4± 00 (+++) |
| <i>S. aureus</i> | 00 | 39.3± 2.30 | (+++) | AM | 25.6± 0.50 (+++) |

D'après ces résultats, il est clair que l'H.E pure d'*E .globulus* exerce une activité inhibitrice importante .Donc notre l'HE possède un large spectre d'activité antibactérienne sur les cinq souches testées, mais il est important de signaler que les bactéries (*S. epidermidis* , *Serratia .ssp*, *S. aureus*) sont plus sensible à l'HE que *E.coli* etk. *Pneumonie* .

La zone d'inhibition la plus importante est observées pour *S. epidermidis* avec un diamètre de 41.0±3.63 mm pour un volume de 10µL d'HE pur, et des diamètres d'inhibition légèrement inférieurs à celle vis-à-vis de *Serratia .ssp* et *S. aureus* dont les valeurs sont trouvées respectivement (40.9 ± 2.25, 39.3± 2.30 mm) , toutefois l'HE pure d'*E. globulus* a présenté des zones d'inhibition moyennes vis-à-vis de *E.coli* et *K. Pneumonie* (23.8± 0.34 , 24.7±0.80 mm) respectivement .

Les zones d'inhibition trouvé après l'application des disques de gentamicine sur les trois souches bactériennes à gram négatif *K. Pneumoniae* ,*E.coli* ,*Serratia.ssp* sont (18.2±00 ,19.9±00 ,22.8±00 mm) respectivement , et en ce qui concerne les souches bactérienne à gram positif , un zone d'inhibition de diamètre égal à 22.4±00 mm c'était le résultats de l'effet de ciprofloxacine sur *S .epidermidis* , et d'autre zone de diamètre de 25.6±00 mm obtenus par l'Ampicilline sur *S. aureus* . D'après ces résultats en peut dire que l'effet antibactérien obtenu par l'HE pure d'*E .globulus* est important que celle obtenus par les Antibiotiques testées.(**Annexe 07**)

4-2-Méthode des dilutions

Pour confirmer l'effet inhibiteur d'EH d'*E .globulus* vis-à-vis les souches bactérienne testées la méthode des dilutions a été réalisé, et les résultats sont présenté dans le tableau suivant :

Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibition de différentes dilutions.

| dilutions souches | 1/2 | 1/4 | 1/8 | 1/16 | 1/32 | Témoins Négatif |
|----------------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|--------------------|
| <i>E.coli</i> | 11.4±0.3 | 10.9±0.1 | 10.6±0.1 | 9.9±0.4 | 9.9±0.4 | 0 |
| <i>Serratia.ssp</i> | 12.6±0.07 | 11.6±0.4 | 10.5±0.4 | 8.8±0.1 | 6.0±0.7 | 0 |
| <i>k.Pneumonie</i> | 11.6±0.1 | 9.9±0.1 | 8.3±0.1 | 8.1±0.1 | 8.1±0.1 | 0 |
| <i>S.epidermidis</i> | 12.8±0.3 | 11.9±0.1 | 11.00±00 | 10.5±0.4 | 9.6±0.1 | 0 |
| <i>S. aureus</i> | 11.9±0.3 | 10.6 ±0.4 | 9.6 ±0.4 | 8.5±00 | 8.4±0.05 | 0 |

Les résultats trouvés, confirme l'activité antibactérienne exercé par l'HE d'*E.globulus* sur les souches bactérienne testées .Il est nécessaire de signaler que l'HE pure exerce une activité inhibitrice plus élevée par rapport au dilutions . En effet les diamètres des zones d'inhibition diminuent avec la diminution de concentration d'HE .(annexe 08)

4-3-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI à été déterminé par la méthode de micro-dilution en microplaques , pour chacune des souches bactérienne ayant démontré des différent degrés de sensibilité vis-à-vis l'huile essentielle d'*E. globulus*. La lecture des résultats se fait à l'œil nue par observation du changement de turbidité dans les puits , mais aussi la présence ou l'absence d'une croissance bactérienne autour de chaque puits après incubation et comparaison avec le témoins .

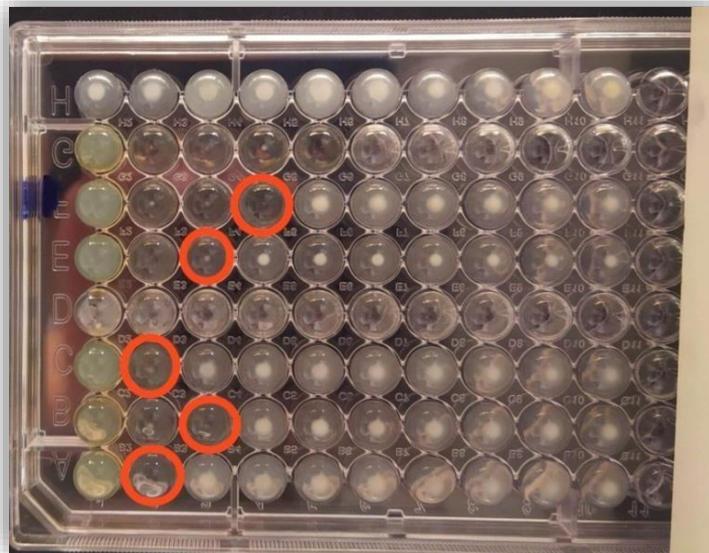


Figure 15 : Observation des résultats d'inhibition à l'œil nue sur la microplaque (photo personnelle ,2023)

Résultats et discussion

Les résultats de lecture sont représentés dans le tableau 16 :

Tableau 15: Lecture des résultats de méthode de micro-dilution en microplaque

| Rangés Souches | 1 ^{er} | 2 ^{ème} | 3 ^{ème} | 4 ^{ème} | 5 ^{ème} | 6 ^{ème} | 7 ^{ème} | 8 ^{ème} | 9 ^{ème} | 10 ^{ème} | TP | TN |
|----------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|----|----|
| <i>E.coli</i> | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>Serratia.ssp</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>K.Pneumonie</i> | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>S.épidermidus</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| <i>S. eaureus</i> | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | - |

(-) : correspond à une absence de croissance visible à l'œil .

TP : Témoin positif

(+) : correspond à une présence de croissance visible à l'œil.

TN : Témoin négatif

Les valeurs de CMI déterminées pour chaque souche bactérienne testées sont représentées dans le tableau 17 :

Tableau 16: CMI d'HE d'E. globulus sur les souches bactérienne testée

| Souches | <i>E.coli</i> | <i>Serratia .ssp</i> | <i>K. Pneumonie</i> | <i>S. Epidermidus</i> | <i>S. eaureus</i> |
|------------|---------------|----------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| CMI | 05 mg/ml | 2.5 mg/ml | 05 mg/ml | 1.25 mg/ml | 2.5 mg /ml |

Les valeurs de CMI obtenues varient entre 1.25- 05 mg/ml , donc la variation des valeurs de CMI d'une souche à l'autre est expliquée par le degré de sensibilité de chaque souche vis-à-vis l'HE étudié . D'après les résultats du tableau la plus importante CMI a été obtenue avec *S. epidermidus* (1.25 mg/ml) , cela explique que l'HE étudié a un très bon effet inhibiteur sur la souche bactérienne , mais il est important de signaler que l'HE d'*E .globulus* est active aussi envers les autres souches bactériennes testées , avec des valeurs de CMI qui sont : 2.5mg /ml pour *Serratia.ssp* et *S. aureus* , 5 mg/ml pour *E.coli* et *K.Pneumoniae*.

4-4-Détermination de concentration minimale bactéricide (CMB)

Les valeurs de CMB sont déterminées à partir des résultats obtenus après ensemencement des cultures n'ayant pas donné de développement bactérien sur les puits de CMI (annexe) . Les résultats des CMB des cinq souches bactériennes testées sont représentés dans le tableau :

Tableau 17: CMB d'HE d'E .globulus sur les cinq souches bactériennes testées

| Souches | <i>E .coli</i> | <i>Serratia .ssp</i> | <i>K. pneumonie</i> | <i>S. epidermidus</i> | <i>S. aureus</i> |
|------------|----------------|----------------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| CMB | 10 mg/ml | 5 mg/ml | 5 mg/ml | 2.5 mg/ml | 5mg/ml |

Résultats et discussion

Les résultats des CMB présentés dans le tableau 17, montrent que la valeur de la CMB la plus importante est marquée avec *S.epidermidus* (2.5mg/ml), suivi par *Serratia .ssp*, *K.pneumoniae*, *S. aureus* qui présentent la même valeur de CMB (5 mg/ml), alors que *E.coli* présente la plus faible CMB avec une valeur égale à 10 mg/ml (**Annexe 09**).

Les résultats totaux des CMI et CMB des cinq souches bactériennes sont présentés dans le **tableau 19**

Le rapport CMB/CMI a été calculé pour toutes les souches bactériennes testées et les résultats sont inférieurs à 4, donc l'HE d'*E. globulus* a exercé une activité bactéricide sur toutes les souches bactériennes testées.

Tableau 18: CMI et CMB et le rapport CMB/CMI pour chaque souche bactérienne testés

| | <i>E.coli</i> | <i>Serratia .ssp</i> | <i>K. pneumoniae</i> | <i>S. epidermidus</i> | <i>S. aureus</i> |
|------------------|---------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------------|
| CMI | 5 mg/ml | 2.5 mg/ml | 5 mg/ml | 1.25 mg/ml | 2.5 mg/ml |
| CMB | 10 mg/ml | 05 mg/ml | 5 mg/ml | 2.5 mg/ml | 5 mg/ml |
| Rapport CMB /CMI | 02 | 02 | 01 | 02 | 02 |



Conclusion et perspective



Conclusion et perspective

Le présent travail a pour objectif d'étudier l'activité antibactérienne des feuilles de la plante médicinale *Eucalyptus globulus* de la famille Myrtaceae, cette plante est choisie sur la base de ses usages traditionnels.

L'étude nous a permis d'évaluer le rendement des HE d'*eucalyptus globulus* récolté dans la région de El-Ogla de la wilaya de Tébessa en janvier 2023 ainsi que l'activité antibactérienne sur cinq souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Serratia ssp*, *staphylococcus epidermidis*) par la méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme) et la comparaison de l'effet antibactérien d'HE pure avec celle d'antibiotiques, et la détermination de CMI et CMB par la méthode de micro dilution sur microplaque.

L'extraction de l'HE d'*Eucalyptus globulus* par hydro-distillation a montré un rendement de 0,80 %, Les rendements en HE d'*E. globulus* rapportés dans différentes régions d'Algérie ont varié entre 0,2% et 0,93% (Atmani-Merabet et al., 2018).

Les caractéristiques organoleptiques de l'HE d'*Eucalyptus globulus* ont montré que l'HE a un aspect liquide limpide et une couleur jaune clair et une forte odeur.

L'activité antibactérienne de l'HE d'*E. Globulus* étudiée par la méthode de diffusion vis-à-vis de cinq souches bactériennes à Gram+ et à Gram- : *E. coli*, *serratia ssp*, *S. epidermidis*, *S. aureus* et *Klebsiella pneumoniae* a montré un effet antibactérien remarquable plus ou moins important. La comparaison de l'effet antibactérien de l'HE avec l'effet des antibiotiques sur les cinq souches bactériennes a montré que l'HE a une activité antibactérienne plus importante que les antibiotiques. En effet, Les résultats des zones d'inhibition trouvées ont montré des valeurs variables de 23.8 mg/ml à 41 mg/ml avec l'HE pure et de 18.2 mg/ml à 25.6 mg/ml avec les antibiotiques.

Les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'une souche bactérienne à une autre d'une huile essentielle à une autre. La variation de l'activité antibactérienne s'explique par la variation de la composition chimique des HE.

Les valeurs de CMI obtenues varient entre 1,25 et 5 mg/ml, la CMI la plus importante a été obtenue avec *S. epidermidis* (1,25 mg/ml), donc *S. epidermidis* est la souche la plus sensible à l'effet de l'HE.

Les résultats de CMB ont montré que la CMB la plus importante est observée avec *S. epidermidis* (2,5 mg/ml), suivie par *Serratia. Ssp*, *K. Pneumoniae*, *S. aureus* avec des valeurs CMB égales et enfin *E. coli* avec une CMB égale 10 mg/ml.

Le rapport CMB/CMI est inférieur à 4, donc *E. globulus* a exercé une activité bactéricide pour toutes les souches bactériennes testées.

Conclusion et perspective

L'*Eucalyptus globulus* constitué une source importante pour les recherches futures, une attention particulière doit être portée à la recherche scientifique sur cette plante ; du point de vue médical, l'*Eucalyptus* présent de nombreuses vertus et plus riche des molécules bioactives surtout avec l'émergence de maladies incurables à l'heure actuelle. Ce qui ouvre la porte à des perspectives pour développer des préparations d'antibiotiques à base de fraction et des l'huiles essentielle d'*eucalyptus globulus*.il serait intéressant d'éloigner le champ d'application de l'HE d'*E. globulus* sur d'autres souches bactériennes ou fongiques provenant d'autres types d'infection, également, il est indispensable d'effectuer un screening phytochimique pour déterminer les métabolites secondaire actif de cette plant .



*Références
bibliographique*



A

AFNOR (2000). Association Française de Normalisation, Détermination des caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles

AFNOR(1986). Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57

Aït Youssef M. (2006). *Eucalyptus globulus*L. In « Plante Médicinale de Kabylie » Ed. Paris[en ligne],126p-130p

Akthor ,M.S ., Degaga , B ., Azam , T .(2014).Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms :A review .J. issues ISSN ,2(1) , 001-007 .

Atmani-Merabet, G., (2018). Huiles essentielles de trois espèces d'Eucalyptus d'Algérie :

composition et activité acaricide (Varroa destructor). Thèse de Doctorat.

Phytochimie :Université des FrèresMentouri Constantine 1 Algérie , 164 P ,

disponible sur : <https://bu.umc.edu.dz/theses/chimie/ATM7372.pdf>

Atmani-Merabet, G. ;Belkhiri, A. ; Dems, A.M.; Khalfaoui, Z.; Lalaouna, A.; Mosbah, B.(2018). Chemical composition, toxicity, and acaricidal activity of *Eucalyptus globulus* essential oil from Algeria. Current issues in pharmacy and medical sciences, 31(2), 89-93.

Atmani M – Merabet G. (2018).Huiles essentielles de trois espèces d'Eucalyptus d'Algérie : composition et activité acaricide (Varroa destructor)[en ligne],thèse de doctorat :Phytochimie :Université des frères Mentouri Constantine 1,30p

B

Besombes , C ., (2008) . Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydrothermo-mécanique d'herbes aromatiques : applications généralisées (en ligne) .Thèse de doctorat : génie chimique .université de la Rochelle .289 p , disponible sur : <https://theses.hal.science>

Boukhatem, M.N ., Ferhat, M.A ., Kameli, A .,Kerkedi, W ., Sadok Bouziane , M ., Saidi, F (2014) .Quality assessment of the essential oil from *Eucalyptus globulus* Labill of Blida(Algeria) origin. Int Lett of Chem, Phys and Astron (enligne) , 17(3) : 303-15, 315 P . disponible sur :[file:///C:/Users/samir/Downloads/Quality assessment of the essential.pdf](file:///C:/Users/samir/Downloads/Quality%20assessment%20of%20the%20essential.pdf)

C

Références bibliographique

Chiba, S.;Djouaher, F.(2018).Activité antibactérienne, anti oxydante et anti-insectes des huiles essentielles d'Eucalyptus, laurier de la région d'Ain Defla. Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana

D

Dhifi, W ., Bellili , S., Jazi , S .,Bahloul ,N ., Mnif , W (2016) . Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review (enligne) , 3 (4) , 25 p . disponible sur :<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5456241>

E

Eisenhut, M(2007).The toxicity of essential oils. *Int J Infect Dis*,11(4): 365-6.

Evans, W.C.; Trease, G. E.(1996).Trease and Evan's Pharmacognosy.14thedition. London: W.B.Saunders

F

Fanz , C ., Novak , J .,(2020) . Sources of essential oils .In : Handbook of essential oils (enligne) . 3^{ème} édition : Hausun can baser P 39-81 disponible sur : <https://naturalingredient.org>

G

Ghedira, K., Goetz, P., Le Jeune, R. (2008). *Eucalyptus globulus* Labill. Phytothérapie[en ligne], 6(3), 197-200.

H

Haddaf, Y., Kaloustian ,J., Giordan ,R ., Regli, P., Chefrou, A., Abou L ., Mikail C.et Portugal,H.(2004). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* L. et de *Thymus numidicus* Poiret d'Algerie- 6e symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales ; Grasse, France .

Hayat, U., Jilani, M. I., Rehman, R., & Nadeem, F. (2015). A review on *Eucalyptus globulus*: a new perspective in therapeutics. *International Journal of Chemical and Biochemical Sciences*, 85-91<https://www.iscientific.org/wp-content/uploads/2019/09/12-IJCBS-15-08-12.pdf>

K

Kesbi, A. (2011). Etude des propriétés physico chimiques et évaluation de l'activité biologique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* dans la région de Ouargla. Mémoire de fin d'études. Université KasdiMerbah, Ouargla, Algérie.

Koziol N., (2015) . Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbiacitriodora* : qualité, efficacité et toxicité [**en ligne**]. thèse de doctorat : Sciences pharmaceutiques : Université de Lorraine, 53-62p. disponible sur : <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733789/document>

M

Mnayer, D.,(2014). Eco-Extraction des huiles essentielles et des arômes alimentaires en vue d'une application comme agents antioxydants et antimicrobiens : thèse de doctorat , chimie .l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, 142 P .

Mouas, y., benrebiha, f z., chaouia, c (2017) . évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle et de l'extrait méthanolique du romarin *rosmarinus officinalis* . *Revue Agrobiologia* 7(1), 363-370

Muthanna ,J M., Utpal, A., Ammar, B A., Vijay ,T., Yigong ,G., Anubhav ,P .,(2021). Phenolic Composition, Antioxidant Capacity and Antibacterial Activity of White Wormwood *Artemisia herba-alba*, 16;10(1):164.

O

Oumaskour ,K., Benaziz ,M., Ainane ,T .,(2021). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. *pharmacology online*, 2 :518-526

P

Photolo ,M M., Mavumengwana , V., Sitole , L., Matsobane ,G T.,(2020). Antimicrobial and Antioxidant Properties of a Bacterial Endophyte, *Methylobacterium radiotolerans* MAMP 4754, Isolated from *Combretum erythrophyllum* Seeds (en ligne) . disponible sur : <https://doi.org/10.1155/2020/9483670>

Potts, B M ., Vaillancourt, R ., Jordan, G.J.(2004). Exploration of the *Eucalyptus globulus* gene pool. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S037811279090061F>

Références bibliographique

S

Swamy , M.K . , Akthar , M.S ., Sinniah ,U .R .(2016) .antimicrobial propriétés of plant essential oils against human pathogens and thier mode of action :An updatated review .Evidence-Based complementary and alternative medicine , 2016

T

TaboukouyouthH.,(2012). Valorisation d'huile essentielle d'*Eucalyptus Globulus* extraite par deux méthodes différentes[**en ligne**]. Thèse de doctorat :Spécialité : Chimie Organique Appliquée des substances naturelles : Université de Djelfa -ZianeAchour. Algérie, 23 -52 p.

Taleb-Toudert, K. (2015),Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche de niébé *Callosobruchus maculatus* (Coleotear : Bruchidae). Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algérie

Tour , D ., (2015). Etude chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plants aromatique médicinales de cote d'ivoire (en ligne) .thèse de doctorat :biochimie .université Felix HOUPHOUËT-BOIGNY, 616 P . disponible sur : <https://theses.hal.science/tel-01222964/document>

V

Vaughan, G., (2008).*Eucalyptus globulus* Labill. In: Louppe, D., Oteng-Amoako, A.A. & Brink, M. (Editors). PROTA (Plant Resources of Tropical Arica / Ressources végétales de l'Afrique tropicale), Wageningen, Netherlands. Consulté le 6 mai 2023.

W

Wafaa , Z .,(2016). Composition chimique et activité biologique des huiles essentielles de *Daucus aureus* (Desf) et de *Reuterlutea* (Desf.) Maire, et leur application comme agents antimicrobiens dans le polyéthylène basse densité (PEBD).thèse de doctorat : UNIVERSITE FERHAT ABBAS-SETIF-1 , 126 p



Annexe



Annexe

1-L'âge approximatif de l'arbre d'*Eucalyptusglobulus*

- Il faut faire des mesures a une hauteur de 1.50 m du sol.
- On mesure la circonférence de l'arbre et on divise celle-ci par 2 la première fois puis par 2.5 qui donnera approximativement l'âge (selon Dr hioun. S de département de biologie végétale Université LarbiTebessi Tébéssa.).

Notre arbre est de 111 cm de tour de tronc à 1.50 du sol :

$$111 \div 2 = 55.5 \text{ ans} \quad 111 \div 2.5 = 44.4 \text{ ans}$$

Donc l'arbre à environ 44 à 55 ans

2-Appareillage et produits

| Matériels | Produits |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none">○ Appareil d'hydrodistillation de type « cleverger »○ Chauffe ballon○ Balance électronique○ Réfrigérateur○ Spectrophotomètre○ Autoclave○ Etuve 37 c°○ Agitateur (vortex)○ Microscope optique○ Bain marie○ Agitateur magnétique○ Stérilisateur○ Bain marie○ Boites de pétri○ Ecouvillons stérile○ Anse de platine○ Bec bunsen○ Pince○ Pipette pasteur○ Micropipette○ Embouts (jaune et blanc)○ Papier wattman de 6 mm de diamètre○ Pied à coulisse○ Tubes d'Eppendorf○ Portoir d'Eppendorf○ Fonde noire○ Mortier avec pilon○ Barreau magnétique○ Portoir des tubes à essais○ Spatule○ Pissette○ Papier aluminium | <ul style="list-style-type: none">○ L'eau distillée○ Acétone○ Antibiotiques○ L'eau physiologie○ DMSO○ Colorants de gram |

Annexe

- Lames
- Lamelles
- Tubes à essai stériles
- Pipettes Pasteur
- Pipette graduée
- Bécher
- Flaçon en verre
- Erlenmeyer
- Ballon de clevenger
- Microplaque
- Une lame
- Violet de Gentiane
- Lugol
- Alcool (éthanol à 95°) très peu dilué
- Fuschine fraîchement préparée
- Papier filtre



Microscope optique



Stérilisateur



Etuve (37c°)



Clevenger Bain marin



spectrophotométrie



3-Composition et préparation des milieux

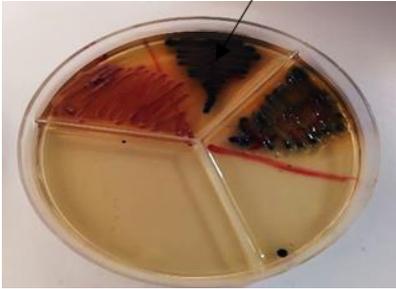
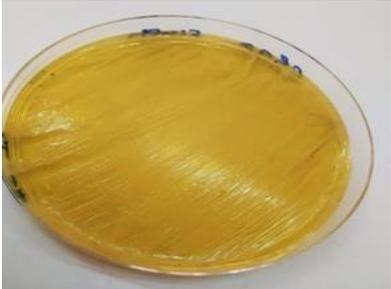
| Les milieux de culture solides | | |
|--------------------------------|---|---|
| Milieu | Composition | Préparation |
| Gélose nutritive | <ul style="list-style-type: none"> -Extrait de viande...1,0 g/L -Extrait de levure ...2,5 g/L -Peptone 5,0 g/L -Chlorure de sodium. . 5,0 g/L -Agar-agar.....15,0 g/L - PH= 7,0 | <ul style="list-style-type: none"> -1L de l'eau distillée -21 g de bouder de GN  |
| Muller-Hinton (MH) | <ul style="list-style-type: none"> -Infusion de viande de bœuf déshydraté. 300g - Hydrolysate de caséine. 17.5g - Amidon de maïs5g - Agar-agar..... 13g - Eau distillée 1L | <ul style="list-style-type: none"> -Prêt à l'emploi.  |
| Gélose de Chapman | <ul style="list-style-type: none"> -Extrait de viande (bovin ou porcin)...01g -Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).10 g -Chlorure de sodium.... 75g -D-Mannitol...10g -Agar-agar....15g Rouge de phénol..... 0,025. PH 7,4 | <ul style="list-style-type: none"> -prêt à l'emploi  |

Annexe

Milieux liquides

| Milieu | Composants | Preparation |
|------------------------------|--|--|
| Bouillon nutritive MH | Macération de viande...1l. (Ou can disalle + extrait de viandeqa) Peptone trypsique 15g NaClou K CL... 5g | -1L de l'eau distillée -21g de bouillon nutritif MH.  |
| Eauphysiologie | Eaudistillée NaCl | -1 L d'eauidistillé -9 g NaCl  |
| Twin 80 | Monooléate de polyoxyéthylènesorbitan | -Prêt à l'emploi |

4- Souches bactériennes utilisées dans l'étude

| Gram +/- | Nom | Photo |
|----------|------------------------------|--|
| Gram - | <i>E. coli</i> |  |
| Gram - | <i>Klebsiella pneumoniae</i> |  |
| Gram - | <i>Serratia ssp</i> |  |
| Gram + | <i>Staphylococcus aureus</i> |  |

Annexe

| | | |
|---------------|-----------------------------------|--|
| Gram + | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |  |
|---------------|-----------------------------------|--|

5-Examen microscopique par coloration de Gram

But

La coloration de Gram permet de différencier des bactéries dites Gram + de bactéries dites Gram –.

Cette méthode permet d'observer :

- La morphologie des bactéries
- Le mode de groupement
- La couleur : gram + ou –
- La densité ou proportion de chaque microorganisme en cas de mélange

Préparation des colorants

| Colorant | Composants | Préparation |
|---------------------------|--|---|
| Violet de gentiane | Violet de gentiane...10g Éthanol..... 100g Phénol cristallisé... ..20g Eau distillée 1000ml | - Dissolvant le colorant dans l'alcool. -Ajouter au fur et mesure le phénol jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. -Compléter avec l'eau. -Passer une ½ heure a l'agitateur. -Laisser reposer 24 heures puis filtrer. |
| Fuschine | Fuschinebasique....10g Alcool à 90° 100ml Acide phénique cristallisé...50g Eau distillée 1000ml | - La même préparation de violet de gentiane |



Annexe

| | | |
|--------------|---|---|
| | | |
| Lugol | Iodure de potassium (KI)...20g Iode..... 10g Eau distillée 1000ml | -Dissoudre 20 g de KI dans un peu d'eau distillée. -ajouter 10g d'iode. -compléter à 1000ml d'eau distillée. -agiter bien puis conserver.  |

Etapes de la coloration de Gram

Préparation d'un frottis

- - Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique.
-
- À partir d'une culture jeune, prélevée une colonie bactérienne à l'aide d'une anse de platine.



Annexe

- Étaler dans le centre de la lame par des mouvements circulaires.



- Fixation par la chaleur : Passer la lame quelques fois au-dessous du bec de Bunsen pour tuer les bactéries et fixer la structure cytotogique des bactéries.



Coloration

Coloration primaire

- Déposer des gouttes de violet de gentiane pendant 1 minute, puis rincer à l'eau et l'égoutter



Mordantage

- Recouvrir avec de lugol pendant 1 minute et rincer et l'égoutter.



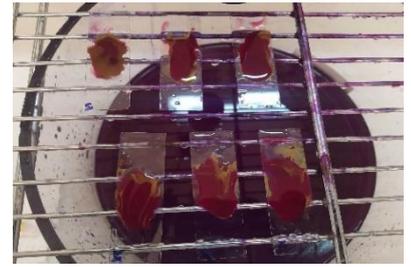
Décoloration

- l'alcool pendant 15 secondes et rinçage



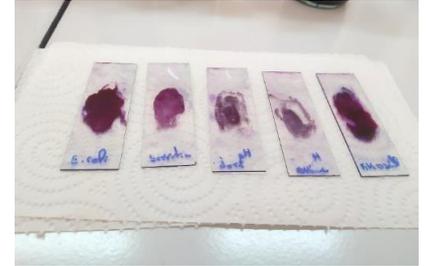
Coloration secondaire

- ParFuschine pendant 1 minute et rincer pour la dernière fois.



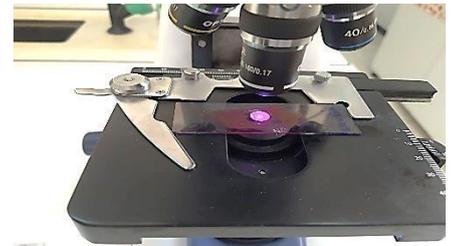
séchage de la lame

- Utiliser de papier filtre pour sécher les frottis.



Observation microscopique

- Déposer une goutte d'huile d'immersion sur le frottis.
- Observer sur microscope optique à l'objectif $\times 100$.



6-Standard Macfarland

Préparation

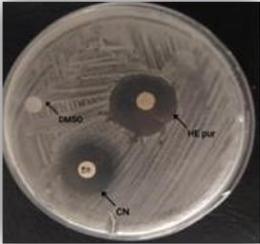
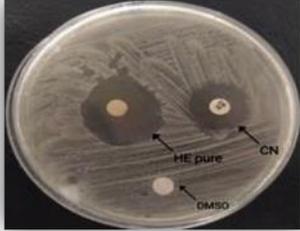
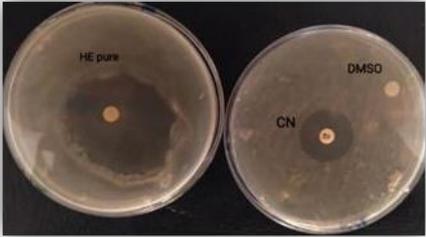
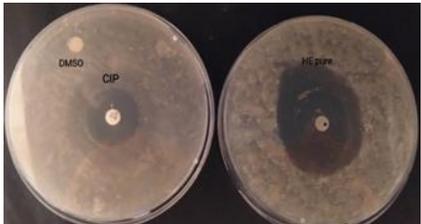
1. Mélanger la solution de McFarland Standard (0.5) sur un mélange vortex avant l'examen. Assurez-vous que McFarland Standard est aliquote dans un tube c'est la même taille et le même diamètre que le tube utilisé pour préparer la suspension d'essai.
2. Préparez une suspension d'essai en obtenant une culture pure de l'organisme d'essai et inoculer un bouillon approprié
3. En présence d'un bon éclairage, visuellement comparer la turbidité de la suspension d'essai avec celle de la norme McFarland en comparant la clarté des lignes sur le Wickerham carte
4. Si la suspension d'essai est trop légère, inoculer avec des organismes supplémentaires ou incuber le tube jusqu'à ce que la turbidité corresponde à celle de la norme. Si une dilution est nécessaire, utiliser une pipette stérile et ajouter suffisamment de bouillon ou de solution saline pour obtenir une turbidité qui correspond à celle de la norme.

Annexe



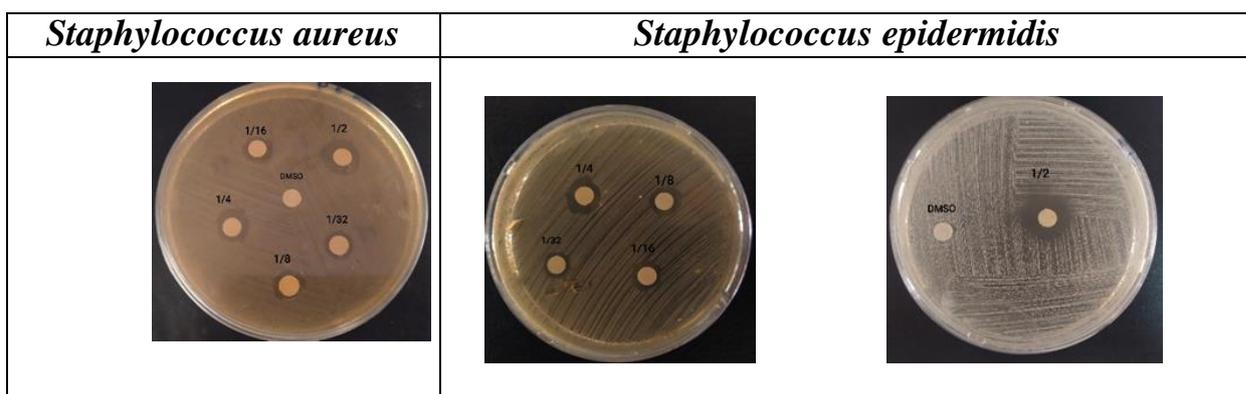
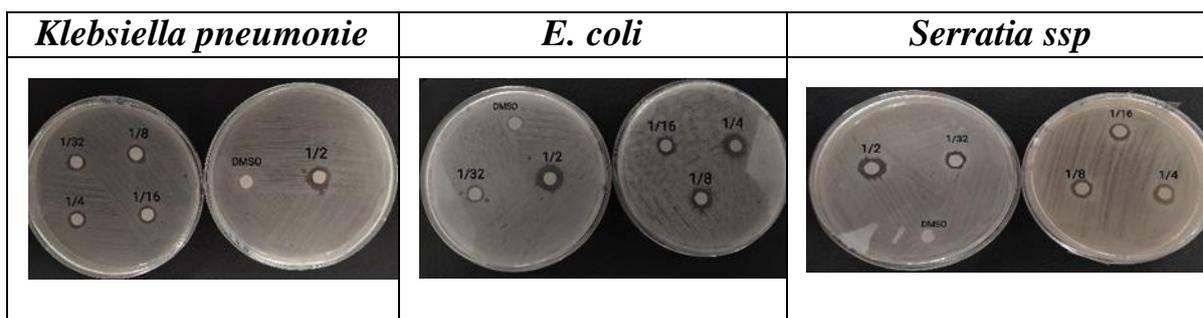
Figure :Hôte pour la préparation du standard de McFarland

7-Zones d'inhibition d'HE pure

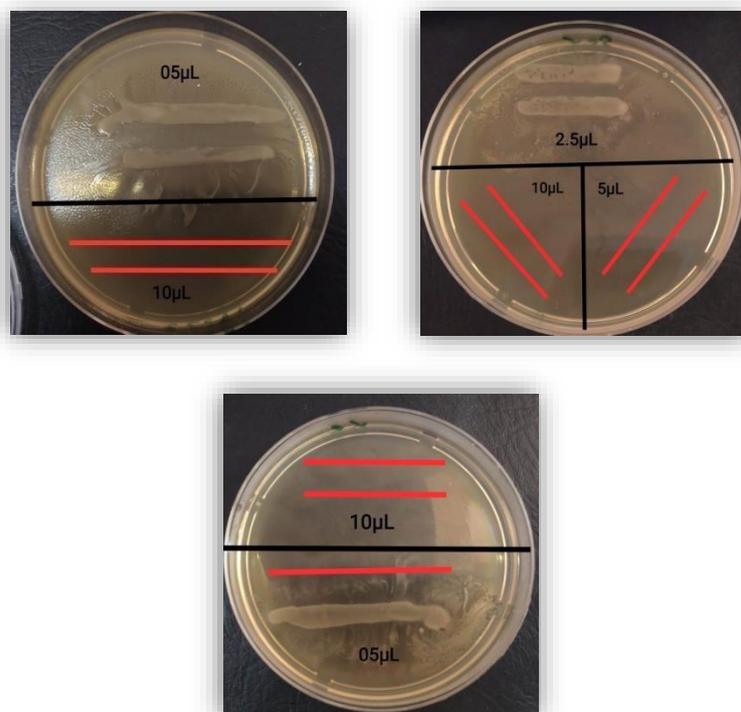
| <i>E. Coli</i> | <i>Klebsiella Pneumonie</i> | <i>Serratia</i> |
|---|--|---|
|  |  |  |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | |
|  |  | |

Annexe

8-Zones d'inhibition de différentes dilutions



9-Résultats de la CMB des cinq souches bactérienne testées



*E.coli**Serratia.ssp*

K .pneumonie

