



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi -Tébessa-



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée
MEMOIRE DE MASTER
Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie
Filière: Sciences Biologiques
Option: Microbiologie appliquée

Thème:

**Étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle
d'une plante médicinale (*Eucalyptus camaldulensis*).**

Présenté par:

Halfaya Amira
Bourahla Nour Elhouda
Khelif Ouarda

Devant le jury:

Dr. Mechai Abdelbasset	MCA	Université de Larbi Tébessi	Président
Dr. Fenghour Hind	MCB	Université de Larbi Tébessi	Rapporteuse
Dr. Benhadj Mabrouka	MCB	Université de Larbi Tébessi	Examinatrice

Date de soutenance: 22-06-2020

Année Universitaire : 2019-2020

Note : /20

Mention :



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi - Tébessa-



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie
Département : Biologie Appliquée
MEMOIRE DE MASTER
Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie
Filière: Sciences Biologiques
Option: Microbiologie appliquée

Thème:

**Étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle
d'une plante médicinale (*Eucalyptus camaldulensis*).**

Présenté par:

Halfaya Amira
Bourahla Nour Elhouda
Khelif Ouarda

Devant le jury:

Dr. Mechai Abdelbasset	MCA	Université de Larbi Tébessi	Président
Dr. Fenghour Hind	MCB	Université de Larbi Tébessi	Rapporteuse
Dr. Benhadj Mabrouka	MCB	Université de Larbi Tébessi	Examinatrice

Date de soutenance: 22-06-2020

Année Universitaire : 2019-2020

Note : /20

Mention :



Remerciement

Au Nom de Dieu le Très Miséricordieux, le Tout Miséricordieux.

Avant toutes choses, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience.

*Nous exprimons d'abord notre profonds remerciements et notre vive connaissance à **Dr Fenghour Hind**, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa disponibilité, ses conseil et la confiance qui nous avons été accordée nous ont permis de réaliser ce travail.*

*Nous adressons notre sincère remerciement à **Dr Mechai Abdelbasset** et **Dr Benhadj Mabrouka** qui ont fait l'honneur d'être dans les jurys de notre soutenance.*

*Nous remercions tout le personnel de laboratoires pédagogiques spécialement les techniciennes **Melle Dhyébe Chahrazéde**, **Melle Geblli Ouarda** et **Melle Amel**.*

*Un grand merci également tous les enseignants de département "Biologie appliquée " spécialement **Mr Menasria**, **Mr Yahyaoui***

Nous remercions en fin tous ceux qui n'ont pas été cités dans ces quelques lignes et qui ont contribués de près ou de loin par leur aide au bon déroulement de ce travail.

Et toutes les promotions de microbiologie appliquée.

Dédicace

*En tout premier lieu, je remercie **ALLAH**, le tout puissant de m'avoir donné la patience et la volonté pour dépasser toutes les difficultés.*

Je dédie ce modeste travail :

- *Aux êtres les plus chers, Mes parents :*

À mon père,

Mon plus haut exemple et mon modèle de persévérance pour aller toujours de l'avant et ne jamais baisser les bras, pour son enseignement continu à m'inculquer les vraies valeurs de la vie et pour ses précieux conseils.

J'espère que ce travail sera à la hauteur de tes attentes et qu'elle soit l'accomplissement de tous tes efforts.

À ma mère,

Pour son affection, sa patience, son écoute permanente et son soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.

*Là où je suis arrivée aujourd'hui c'est à vous **Mes chers parents, qu'ALLAH** vous garde.*

- *À mon fiancé : Abderrahim pour son aide et ses encouragements.*
- *À mon frère et mes sœurs pour leur soutien moral: Djallel, Roufaïda et Hana*
- *À ma rapporteuse : Dr Fenghour Hind pour m'avoir dirigé dans ce travail et pour ses précieux conseils.*
- *À mes enseignants surtout : Mr Gharbi Abdelhakim, Mr Menasria Taha et melle Khelifi Chikha.*
- *À mes binômes Nour.B et Ouarda.K, pour tous les sentiments et les moments qu'on a partagés.*
- *À mes amis et sœurs : Sara.B, Ikram.O, Aïcha.Z et Khouloud.H , symboles de tendresse, Que Dieu vous préserve.*
- *Et bien sûr à tous mes collègues de la 2^{ème} année Master LMD, Microbiologie appliquée*
- *Enfin à toutes les personnes qui comptent pour moi, intervenues dans ma vie à un moment ou à un autre et qui m'ont accompagné et soutenu. Et m'ont donné la force de continuer, Je vous dis merci.*



AMIRA

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quelque soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

*À l'homme, qu'il m'a transmis son charme, sa forte personnalité et sa sagesse, ce qui dit « je t'aime » sans même parler. C'est mon idole, avec lui rien est impossible mon cher père **Hakim**.*

*À la femme, qu'elle sera toujours ma merveille, quand je ne suis pas à la hauteur elle m'élève plus haut que le ciel, elle est la splendeur des splendeurs. Elle est la sève et le miel ma chère mère **Badiaa**.*

*À mes très chers frères **Med Amine** et **Salah Eddine** qui ont toujours été à mes côtés.*

*À mes sœurs **Rifka** et **Amani** pour leurs soutiens moraux et leurs aides merci d'être là pour moi.*

*À ma chère cousine, ma jumelle de cœur **Oumaima**, avec qui j'ai grandi.*

À toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand, sans exception.

*À mes précieuses amis d'enfance qu'ont toujours avec moi et derrière mon dos : **Arig, Douha, Maroua, Sara, Amira, Baraa, Ouarda, Ali, Laarbi, Med Hocine, Nouefl, Amjed**.*

*À mes amis de parcours : **Sara Kh, Chaima, Souhiela, Rayen, Fatma, Bouthaina, Roumaissa, Islem.Y, Islem.d, Khaled, Salah**, et spécialement **Hassen Merzougui**.*

*La mémoire de mes chères amis : **Mohamed Mechri, Marawa Juini** et **Imen Hamza** qui m'a toujours tenu la main et qui ne m'a jamais lâché de son existence.*

À toute personne que je connais de près ou de loin, a toute la promotion Master II Microbiologie appliquée 2020.



NOUR

Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour :

*À mes **chères parents Seddik et Nassira**. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me comble, Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.*

*À celui qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon fiancé **Mouataz**.*

*À ma **chère sœur Dorsaf** et mes **chères frères Djasser et Zaid**, sans oublié **ma grand-mère**, mes **beaux-parents** et mes **belles sœurs**.*

*À tout ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, grand et petit, et bien sûr sans oublié ma belle cousine **Rania** et mes chères copines **Oulfa, Amina...***

*À mes chères binômes **Nour et Amira** et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible.*

« Je vous dis merci »



Ouarda

Résumé

Le premier objectif de notre étude est de mieux connaître l'*Eucalyptus camaldulensis* à travers l'étude de sa fraction aromatique (HE).

Nous avons montré les caractères organoleptiques de l'huile essentielle de cette essence qui est de couleur jaune foncé, avec une odeur agréable et un goût caractéristique. Le rendement en huile essentielle obtenu par l'hydrodistillation de type Clevenger de la plante *Eucalyptus camaldulensis* est de 0,96%.

Le deuxième objectif est l'étude qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* sur différentes souches bactériennes provenant d'infection urinaire humaine (ECBU).

Les huiles essentielles pures et leurs dilutions (1/2, 1/4, 1/6, 1/8 et 1/16) ont été testées sur les souches bactériennes étudiées (3 souches à gram+ et 4 souches à Gram-). Les résultats des activités antibactériennes ont montré que l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* présentent une bonne activité inhibitrice qui diffère d'une souche à l'autre ; *Staphylococcus aureus* (17 mm), *Escherichia coli* (15,66mm), *Klebsiella pneumoniae* (13,66 mm), *Staphylococcus saprophyticus* (12mm) et *Proteus mirabilis* (8 mm).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles (0,06% à 0,16%) (v/v) a été suffisante pour arrêter la croissance de *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* ; Tandis que *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Proteus mirabilis* ont résisté jusqu'à la concentration en huile essentielle de 1% (v/v) .

Par ailleurs, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa* n'ont montré aucune sensibilité vis-à-vis d'huile essentielle d' *Eucalyptus camaldulensis*.

Mots clés : *Eucalyptus camaldulensis*, Huile essentielle, Souches bactériennes, Activité antibactérienne, CMI.

ملخص

هدفنا الاول هو الفهم الافضل لشجرة الكاليتوس وذلك من خلال دراسة الجزء العطري لها.

حيث قمنا باستخلاص الزيت العطري لجزء الهوائي لشجرة الكاليتوس عن طريق عملية التقطير المائي و كان بمردود 0,96% و بخصائص مختلفة من لون اصفر داكن و رائحة زكية و طعم مميز.

أما عن هدفنا الآخر فهو عبارة عن دراسة كمية و نوعية لنشاط الزيت العطري المستخلص كمضاد للبكتيريا و اختبرناه مخبريا على سبع سلالات بكتيريا مسؤولة على أمراض المسالك البولية (ECBU).

تم اختبار الزيت العطري النقي و المخفف (1/2, 1/4, 1/6, 1/8, 1/16) على سبعة سلالات بكتيرية (3Gram + ,4Gram-).

أظهرت النتائج أن الزيت الاساسي للكاليتوس لديه قدرة تثبيط مختلفة من سلالة إلى أخرى بحيث قطر تثبيطها متوزع كالتالي :

Staphylococcus aureus (17 مم), *Esherichia coli* (15,66 مم), *klebsiella pneumoniae* (8 مم), *Proteus mirabilis* (12 مم), *Staphylococcus saprophyticus* (13,66 مم).

بينما *Entrococcus faecalis* و *Pseudomonas aeruginosa* نتائجها كانت (0مم)

و في ما يخص نتائج التركيز الأدنى المثبط لهاته البكتيريا اعتبرت القيم ما بين (0,06% إلى 0,16%) (حجم/حجم) كافية لوقف نمو بكتيريا *klebsiella pneumoniae* و *Esherichia coli*. بينما *Staphylococcus*

aureus,

Staphylococcus saprophyticus و *Proteus mirabilis* قاومت لغاية وصول تركيز الزيت العطري ل 1% (حجم/حجم) .

كما أن لم يكن لمستخلص الزيت اي تأثير على *Entrococcus faecalis* و *Pseudomonas aeruginosa* و أثبتت أنها شديدة المقاومة.

الكلمات المفتاحية: الكاليتوس، الزيت الأساسي، النشاط المضاد للبكتيريا، التركيز الأدنى المثبط.

Abstract

The first objective of our study is to better understand *Eucalyptus camaldulensis* through the study of its aromatic fraction (HE).

We have shown the organoleptic characteristics of the essential oil of this essence which is dark yellow in color, with a pleasant odor and a characteristic taste. The yield of essential oil obtained by the Clevenger type hydrodistillation of the *Eucalyptus camaldulensis* plant is 0,96%.

The second objective is the qualitative and quantitative study of the antibacterial activity of the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* on different bacterial strains originating from human urinary tract infection (ECBU).

Pure essential oils and their dilutions (1/2, 1 / 4, 1 / 6, 1/8 and 1/16) were tested on the bacterial strains studied (3 strains at gram + and 4 strains at Gram-). The results of the antibacterial activities have shown that the essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* has a good inhibitory activity different from one strain to another so that their average diameter of inhibition is as follows:

Staphylococcus aureus (17 mm), *Escherichia coli* (15.66 mm), *Klebsiella pneumoniae* (13.66 mm), *Staphylococcus saprophyticus* (12 mm), *Proteus mirabilis* (8 mm) and *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (0 mm).

The minimum inhibitory concentration (MIC) of (0.06% to 0.16%) (V / v) was sufficient to stop the growth of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. While *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Proteus mirabilis* resisted up to an essential oil concentration of 1% (v / v).

Elsewhere, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* showed no sensitivity to with essential oils of *Eucalyptus camaldulensis*.

Keywords: *Eucalyptus camaldulensis*, essential oil, antibacterial activity, MIC.

Liste des figures

Numéro de figure	Titre	Page
Figure 1	Répartition mondial d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> et autres espèce.	05
Figure 2	Les feuilles d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	08
Figure 3	Une écorce d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	08
Figure 4	Fruit d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	09
Figure 5	Arbre d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	09
Figure 6	Extraction par hydrodistillation.	16
Figure 7	Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne.	17
Figure 8	Partie aériennes d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	19
Figure 9	Région de récolte.	20
Figure 10	La plante d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> pendant le séchage.	21
Figure 11	Partie aérienne d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> après séchage et broyage.	21
Figure 12	Dispositif d'extraction des huiles essentielles de type Clevenger + flacon d'huile d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	22
Figure 13	Principe de la méthode de diffusion par disque.	26
Figure 14	Préparation de l'inoculum.	27
Figure 15	Etapas de préparations des disques.	28
Figure 16	Ensemencement bactérienne.	29
Figure 17	Dépôt des disques sur milieu solide.	29
Figure 18	Préparation d'inoculum.	32
Figure 19	Ecoulement du milieu de culture MH.	32
Figure 20	Ensemencement des bactéries sur MH.	32

Liste des figures

Figure 21	Préparation des dilutions, HE et DMSO.	33
Figure 22	Imprégnation des disques.	33
Figure 23	Dépôt des disques et incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24h.	33
Figure 24	Huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	36

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre	Page
Tableau 1	Classification d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	10
Tableau 2	La composition chimique des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	14
Tableau 3	Liste des caractéristiques des souches bactériennes testées.	24
Tableau 4	Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés.	30
Tableau 5	Préparation des dilutions de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	31
Tableau 6	Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	36
Tableau 7	Aspect microscopique et macroscopique sur milieu chromagar des souches bactériennes testées.	37
Tableau 8	Valeurs des diamètres moyennes de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle pure d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	40
Tableau 9	Valeurs des diamètres moyennes de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition de différentes dilutions de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	42
Tableau 10	Aromatogramme et concentration minimal inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> .	43

Liste des abréviations

Abréviation	Détaille
%	Pourcentage.
AFNOR	Association Française de Normalisation (Recueil des Normes Français : Huiles essentielles).
G	Gram
G-	Gram négatif.
G+	Gram positif.
HE	Huile essentielle.
MH	Mueller Hinton.
T	Température.
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
<i>K.pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .
<i>S.saprophyticus</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> .
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> .
<i>E.faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> .
<i>P.mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i> .
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
Fr	Français.
En	English.
Po	Portugal.
Sw	Switzer land.
° C	Degré Celsius.
ECBU	Examen cyto bactériologique des urines.
DO	Densité optique.
D	Diamètre.
H	Heur.
Min	Minute.
UFC	Unité formant colonie.
CMI	Concentration minimale inhibitrice.
g	Gramme

Liste des abréviations

mm	Millimètre
m	Mètre
cm	Centimètre
µl	Micro litre.
v/v	Volume sur volume.
ml	Millilitre.
±	plus ou moins.
≈	est approximativement égal à.
n°	Numéro.
Dr	Docteur.
RHE	Rendement en huile essentielle.
MHE	Masse d'huiles essentielles récupérées.
HEs	Les huiles essentielles.
Apg	Angiosperm phylogenetic group.
E	<i>Eucalyptus</i> .

Table des matières

Remerciement	I
Dédicace.....	II
Résumé	V
ملخص.....	VI
Abstract.....	VII
Liste des figures.....	IX
Liste des tableaux.....	XI
Liste des abréviations	XII
Introduction	01

Partie I : Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Présentation de la plante étudiée

1. La plante d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	05
1.1. Origine et répartition mondial d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	05
1.2. Répartition géographique d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> en Algérie.....	05
1.3. La famille d' <i>Eucalyptus</i>	06
1.4. L'espèce d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	06
1.4.1. Définition.....	06
1.4.2. Noms vernaculaires.....	07
1.4.3. Description.....	07
1.5. Aspect botaniques d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	07
1.5.1. Feuille.....	07
1.5.2. L'écorce.....	08
1.5.3. Fruit.....	08

Table des matières

1.6. Classification d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	09
1.7. Propriété thérapeutique.....	10

Chapitre 02 : Huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*

2.1. Définition	13
2.2. Etude chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus</i>	13
2.3. Répartition des huiles essentielles dans la plante.....	14
2.4. Conservation des huiles essentielles.....	14
2.5. Technique d'extraction de l'huile essentielle	15
2.6. Activité antibactérienne de l'huile essentielle	16
2.7. Toxicité des huiles essentielles.....	17

Partie II: Matériels et Méthodes

II.1. Objectifs de travail.....	19
II.2. Préparation de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	19
II.2.1. Matériel	19
II.2.1.1. Matériel végétale.....	19
II.2.1.2. Produit chimique	20
II.2.1.3. Appareillage.....	20
II.2.2. Méthode	20
II.2.2.1. Séchage de plante	20
II.2.2.2. Extraction des huiles essentielles	21
II.2.2.3. Détermination de rendement en huile essentielle.....	23
II.2.3. Etude de l'activité antibactérienne.....	23
II.2.3.1. Matériels	23
II.2.3.1.1. Matériels biologiques	23
II.2.3.1.2. Les milieux de culture.....	24
II.2.3.1.3. Les réactifs chimiques.....	24
II.2.3.1.4. Appareillage	24
II.2.3.2. Méthodes	25
II.2.3.2.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes étudiées	25

Table des matières

II.2.3.2.2. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne.....	25
II.2.3.2. 3. L'aromatogramme sur milieu solide	26
II.2.3.2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et le pourcentage d'inhibition (I%)	30

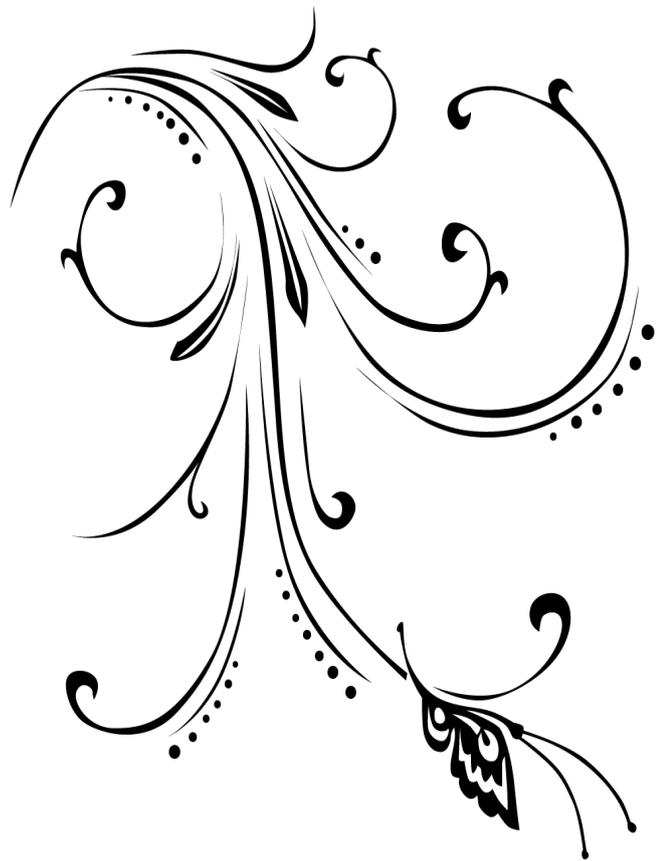
Partie III. Résultats et discussion

III.1.Extraction de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	35
III.1.1. Rendement de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> :.....	35
III.1.2 Caractéristiques organoleptiques	36
III.2. Etude de l'activité antibactérienne	37
III.2.1 Vérification de la pureté des souches bactériennes étudiées	37
III.2.2 Méthode de diffusion sur disque (Aromatogramme)	39
III.2.3.Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne	39
III.2.3.1.Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	41
III.2.3.2. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle..... d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> :	43
Conclusion et perspective	45
Référence Bibliographique	48

Annexes



Introduction



Introduction

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et de soigner toutes sortes de maladies, ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structures chimiques et ils possèdent un très large éventail d'activité biologique. Cependant, l'évaluation de ces activités demeure une tâche très intéressante qui peut faire l'intérêt de nombreuses études (Mazari *et al.*, 2010).

Les plantes médicinales constituent un groupe numériquement vaste de plantes économique importantes. Elles offrent une solution d'alternatif aux médicaments et contiennent des composants actifs résultants de métabolite secondaire produits à partir de métabolisme des nutriments qui sont utilisés par l'homme dans son arsenal thérapeutique. Ces composants actifs se distinguent par plusieurs catégories telles que les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les huiles essentielles et d'autres composées (Mehani, 2015).

Les huiles essentielles représentent des molécules de fortes valeurs, utilisées dans la pharmacologie car elles ont un effet spécifique sur d'autres organismes. En cosmétologie, comme base de fabrication de parfum et de produits dermatologiques. En agroalimentaire pour rehausser le goût, parfumer et colorer les aliments et leur conservation. Les huiles essentielles ont un spectre d'activité très large due principalement à leur grande affinité grâce à leurs natures, pour cela, les activités antibactériennes de ces produits ont été rapportées dans de très nombreux travaux (Nedjai, 2017).

L'usage des huiles essentielles en médecine ne fut jamais abandonné malgré la découverte de processus de synthèse organique et la naissance de l'industrie pharmaceutique. Elles sont considérées comme un véritable réservoir de molécules de base qui sont irremplaçables (Ouraini, Agoumi *et al.*, 2007).

Un intérêt considérable a été suscité aux huiles essentielles extraites à partir de plantes aromatiques et dotées d'activités antimicrobiennes vis-à-vis des microorganismes pathogènes (Alzoreky et Nakahava, 2003).

L'Algérie, par sa situation géographique offre une végétation riche et diverse. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales y pousse spontanément. L'intérêt porté à ces plantes n'a pas cessé de croître au cours de ces dernières années. Leurs

Introduction

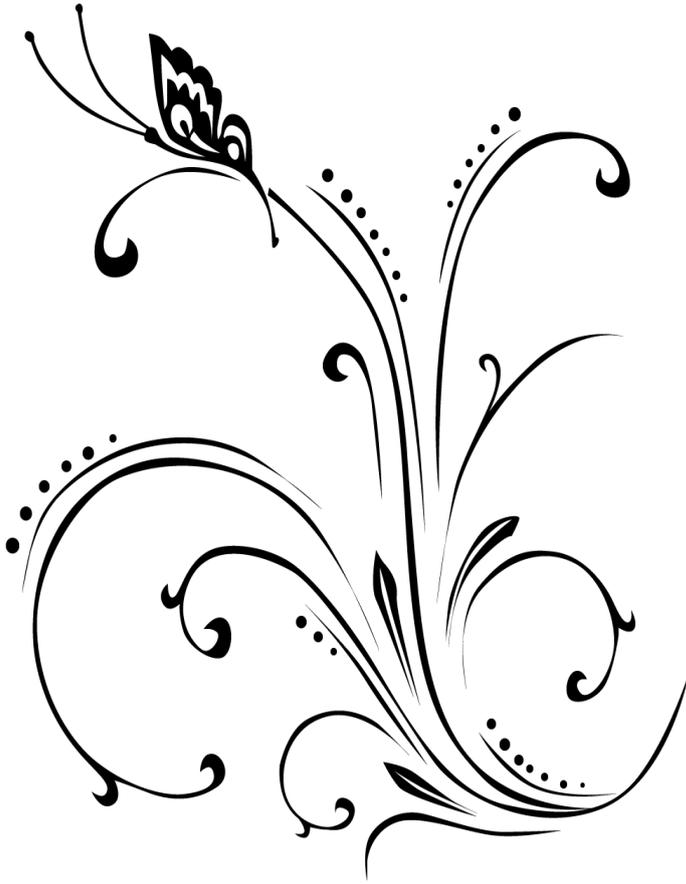
propriétés, dues notamment à la fraction huile essentielle, peuvent être mises à profit pour traiter des différents types des infections (Mehani,2015).

A cet effet, et dans le cadre de la valorisation de la flore algérienne, on s'est intéressé aux espèces de la famille des *Myrtaceae*. La plante sur laquelle a porté notre choix est une espèce d'Eucalyptus (*Eucalyptus Camaldulensis*) provenant de la région de Tnoukla (Tébessa); bien que relativement abondante et largement utilisée, cette espèce a été peu étudiée. En effet, l'objectif de notre travail est de réaliser une étude qualitative et quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus Camaldulensis* sur des bactéries pathogènes, responsables d'infections urinaires humaines.

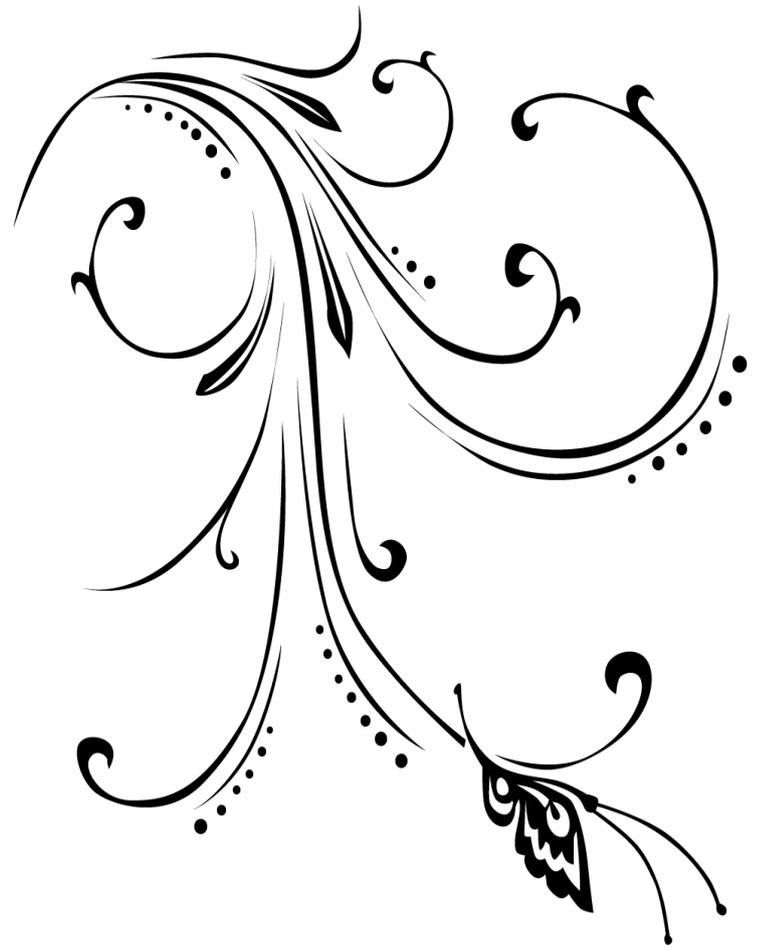
Notre étude comporte trois parties :

- ✓ La première partie englobe une recherche bibliographique sur l'origine de la plante et sa répartition mondiale ainsi qu'en Algérie, sa description, sa classification, son extraction et ses propriétés thérapeutiques
- ✓ La deuxième partie présente le matériel et méthodes utilisés pour la réalisation de l'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus Camaldulensis* et son activité antibactérienne.
- ✓ La troisième partie abordera les différents résultats obtenus et leurs discussions.

Enfin, nous avons terminé par une conclusion générale avec quelques perspectives.



Partie I : Synthèse bibliographique



Chapitre 01 :

Présentation de la plante étudiée

01. La plante d'*Eucalyptus camaldulensis* :

1.1. Origine et répartition mondiale d'*Eucalyptus camaldulensis* :

La répartition naturelle d'*Eucalyptus camaldulensis* couvre la plus grande partie du continent australien, allant du territoire du Nord tropical à la région fraîche et tempérée du Victoria. On le plante dans beaucoup de pays tropicaux et subtropicaux, c'est probablement l'arbre le plus planté dans les zones arides et semi-arides du monde (Oyen et Lemmens, 2002).

C'est un *Eucalyptus* très tolérant au stress salin et à la sécheresse, mais sa tolérance au froid dépend des provenances. Les provenances du Sud de l'Australie peuvent tolérer des gels jusqu'à -8 °C et sont plus tolérantes que les provenances du Nord du pays. Les arbres ont le plus souvent une taille moyenne, mais il existe des grands arbres chez cette espèce. Les capsules florales sont insérées à l'aisselle des feuilles, au nombre de 7 à 11 ou plus (Brooker et Kleinig, 1996).

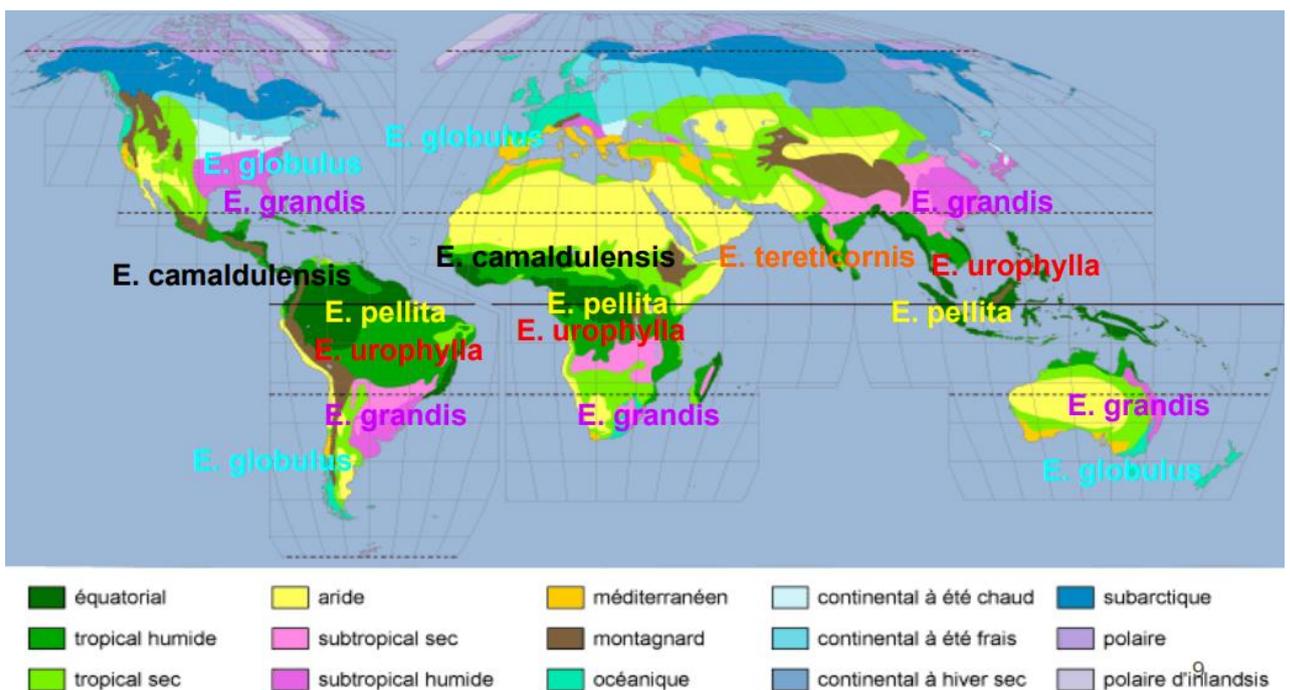


Figure 01 : Répartition mondiale d'*Eucalyptus camaldulensis* et autres espèces (Bouvet, 2013).

1.2. Répartition géographique d'*Eucalyptus camaldulensis* en Algérie :

Son introduction en Algérie fut par les français en 1860. L'espèce pionnière semble être l'*Eucalyptus camaldulensis*, mais d'autres espèces furent introduites dans des placettes

d'essais notamment à Reghaia, Bouchaoui et El-Alia dans la région d'Alger. Cette zone d'introduction a été tellement favorable qu'on a assisté à des croisements naturels qui ont donnés des hybrides dont l'*Eucalyptus algériensis*. Dans les années 40 et 50 les *Eucalyptus* furent introduits dans 18 arboretums couvrant les étapes bioclimatiques humides et semi-arides. Dans ce cadre pas moins de 130 espèces ont été plantés sur le territoire national. Pendant les années 60 à 70, les reboisements à base d'*Eucalyptus* ont concernés notamment l'Est (El-Kala, Annaba, Skikda, Tébessa), le centre (Tizi-Ouzou, Bâinem) et l'Ouest (Mostaganem) et ceci afin de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et papetiers (INRF, 1996).

1.3. La famille d'*Eucalyptus* :

Les *Myrtaceae* constituent une importante famille, avec 140 genres et plus de 3 100 espèces, dispersées surtout dans les régions tropicaux, avec des centres de dispersion particuliers comme l'Australie et l'Amérique du Sud où se trouvent beaucoup d'endémiques.

Les principaux genres sont *Eucalyptus*, avec plus de 600 espèces originaires de Malaisie , d'Australie et *Eugenia* (dédié à Eugène de Savoie, 1663-1736 ; protecteur et promoteur de la Botanique), avec 550 espèces surtout d'Amérique tropicale , *Syzygium*, avec plus de 300 espèces d'Asie et d'Australie *Mircia*, avec 250 espèces d'Amérique tropicale, *Melaleuca*, avec 220 espèces d'Indo-Malaisie et d'Australie, *Cabperanhes*, avec 130 espèces d'Amérique tropicale, *Psidium*, avec 100 espèces d'Amérique tropicale.

La famille doit son nom au genre *Myrtus*, avec 2 espèces des régions méditerranéennes et d'Afrique du Nord (Mychel, 2010).

1.4. L'espèce d'*Eucalyptus camaldulensis* :

1.4.1. Définition :

Eucalyptus camaldulensis (gommier rouge - variétés diverses) :

L'*Eucalyptus camaldulensis* est l'arbre exotique le plus répandu en Algérie. Il convient à tous les sols profonds de plaine, les lits d'oueds les terres non salées et sans calcaire. Il craint les argiles compactes, les grands froids (moins de 9°) ; autrement il est très plastique, résistant à l'inondation et à la dessiccation du sol, au vent, à la chaleur. Il donne un bois rouge : perches, poteaux de mine, chauffage (Jacques, 1966).

Eucalyptus est l'une des principaux genres forestiers plantés dans le monde. Ils comptent environ 600 à 700 espèces et variétés (Warot, 2006).

Ils ont été introduit dans nombreux pays, ils ont une croissance très rapides, l'*Eucalyptus* est st une espèce très cultivée prit rapidement une grande extension en Algérie entre 1860 et 1870 (Daroui ,2012).

1.4.2. Noms vernaculaires :

Eucalyptus rouge, gommier rouge (Fr). River red gum, Murray red gum, red gum (En). Eucalipto vermelho (Po). Mkaratusi (Sw). La dénomination "gommier rouge" est parfois utilisée pour *Eucalyptus camaldulensis*, mais elle se rapporte également à d'autres espèces de *Myrtaceae* (Oyen et Lemmens, 2002).

1.4.3. Description :

Le genre *Eucalyptus* est originaire de Tasmanie en Australie. Il fait partie de la famille des *Myrtacées*, son nom a pour origine les mots grecs: eu «bien» et kaluptos «Couvert». Il fut décrit et baptisé en 1788 par le botaniste français L'HERITIER (Bigendako, 2004).

1.5. Aspect botaniques d'*Eucalyptus camaldulensis* :

1.5.1. Feuille :

L'*Eucalyptus* est un très bel arbre de 30 à 35 m, jusqu'à 100 m dans son milieu naturel (Traor, 1991), les *Eucalyptus* portent des feuilles 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.

Rameaux plus âgés : possèdent des feuilles aromatiques, falciformes, longues de 12 à 30cm, étroites, pointues, épaisses, vert foncé, courtement pétiolées, alternes et pendantes Verticalement (Goetz et Ghedira, 2012).



Figure 02: les feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* (photo personnelle, 2020)

1.5.2. L'écorce :

L'écorce est de couleur et de texture variable selon les espèces. Souvent elle présente plusieurs couleurs, et se détache en lambeaux qui tombent au sol, mais l'écorce peut être aussi dure, fibreuse, floconneuse, lisse (Mekelech, 2015).



Figure 03 : Une écorce d'*Eucalyptus camaldulensis* (photo personnelle ,2020).

1.5.3. Fruit :

Le fruit ligneux est une grosse capsule glauque prenant une teinte marron à maturité, dure, anguleuse, verruqueuse, et s'ouvrant légèrement par trois, quatre ou cinq fentes (qui dessinent une étoile à son sommet) pour libérer de nombreuses graines sombres et minuscules (Goetz et Ghedira, 2012) .



Figure 04 : Fruit d'*Eucalyptus camaldulensis* (photo personnelle ,2020).



Figure05 : Arbre d'*Eucalyptus camaldulensis* (photo personnelle ,2020)

1.6. Classification d'*Eucalyptus camaldulensis* :

La classification d'*Eucalyptus camaldulensis* est représentée dans le tableau d'après la classification scientifique APG (Angiosperm phylogenetic group).

Tableau 01 : Classification d'*Eucalyptus camaldulensis* (Guignard, 2001).

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophyte
Sous embranchement	Angiosperme
Classe	Eudicote
Sous-classe	rosides
Ordre	myrtales
Famille	Myrtaceae
Genre	Eucalyptus
Espèce	camaldulensis
Noms communs	Gommier, Gommier bleu, Arbre au Koala, Arbre à la fièvre
Nom vernaculaire	Arabe : الكينا شجرة . كالتوس Français : Eucalyptus

1.7. Propriété thérapeutique:

Il est utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise pour une variété de maladies, Ses principales utilisations sont la production des huiles essentielles, qui sont utilisées à des fins médicinales et pharmaceutiques (Belyagoubi, 2012).

Les propriétés médicinales de l'*Eucalyptus* sont surtout attribuables à l'eucalyptol (Aussi appelé 1,8-cinéole) que renferment ses feuilles. Le 1,8-cinéole que contient l'*Eucalyptus* s'est révélé être efficace pour réduire la dose de corticostéroïdes utilisée par des sujets souffrant d'asthme et pour combattre le rhume (Tesche ,Kehrl et al, 2008).

Les Aborigènes (Australiens autochtones) utilisent traditionnellement les feuilles d'*Eucalyptus* pour guérir les plaies et les infections fongiques. Les extraits des feuilles d'*Eucalyptus* ont été approuvés en tant qu'additifs alimentaires et sont également utilisés dans les formulations cosmétiques (Takahashi, 2004).

Chapitre 02 :

Huile essentielle
d'Eucalyptus camaldulensis

Les plantes ont toujours fait partie de la vie quotidienne de l'homme, puisqu'elles s'en servent pour se nourrir et se soigner etc. (Menef et Mehrez, 2006), en particulier les plantes dites aromatiques qui contiennent comme des huiles essentielles en grande quantité dans les différentes parties de leur structure (Perillaud, 2018).

2.1. Définition :

Une huile essentielle se définit, selon la pharmacopée, comme un produit de composition complexe renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux.

Une huile essentielle contient en moyenne soixante-quinze molécules actives (Laurain, 2012), leur densité inférieure à celle de l'eau, les HEs peuvent être synthétisés par tout organe végétal (fleurs, bourgeons, graines, feuilles, brindilles, écorces, herbes, bois, fruits et racines) et stockés dans des cellules sécrétoires, des cavités, des canaux, des cellules épidermiques ou des trichomes glandulaires (Labioud, 2016).

2.2. Etude chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* :

Il existe plusieurs centaines d'espèces d'*Eucalyptus* portant toutes le nom "*Eucalyptus*" mais dont les différentes huiles essentielles présentent des compositions extrêmement diverses et dont les propriétés sont donc plus ou moins éloignées, voire parfois opposées les unes aux autres (Franchomme et al, 2001).

La teneur des composés de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* est représenté dans le tableau suivant :

Tableau 02 : La composition chimique des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* (Kara et Saidii ,2016).

Composé (%)	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>
Alpha pinène	0.35
β -pinène	0.15
a.phelladrene	0.66
1.8 Cinéole	2.23
Gamma Terpinène	0.29
Linalol	0.81
Terpène-4-ol	5.18
Alpha Terpinéol	2.68

2.3. Répartition des huiles essentielles dans la plante :

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées et peuvent être stockées dans tous les organes végétaux :

- les feuilles : Eucalyptus, Citronnelle, Laurier noble...
- les fleurs : Camomille, Lavande...
- les zestes : Citron, Orange, Bergamote...
- le bois : Bois de rose, Santal...
- l'écorce : Cannelle...
- la racine : Vétiver...
- les fruits : Anis, Badiane...
- les rhizomes : Curcuma, Gingembre...
- les graines : Muscade

La synthèse et l'accumulation des HEs sont généralement associées à la présence de structures histologiquement spécialisées, souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante.

On retrouve par exemple:

- les cellules à huiles essentielles : chez les *Lauracées* et les *Zingibéracées*
- les poils sécréteurs : chez les *Lamiacées*
- les poches sécrétrices : chez les *Myrtacées* et les *Rutacées*
- les canaux sécréteurs : chez les *Apiécées* et les *Astéracées*. (Kara et Saidii ,2016).

2.4. Conservation des huiles essentielles :

Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des HEs (norme NF 75-002, 1996).

La conservation des huiles essentielles nécessite un respect obligatoire de certaines règles (Echchaou, 2018) à savoir :

- Les huiles essentielles se conservent bien à condition de ne pas les exposer à la lumière, c'est pourquoi il est recommandé de les stocker dans des flacons en aluminium ou en verre teinté (brun, vert, ou bleu) et de les garder à l'abri de la lumière à une température ambiante jusqu'à vingt degrés.
- IL faut les tenir loin des sources de chaleur.
- L'espace d'air dans un bocal favorise leur oxydation, c'est pour cela qu'on préfère plusieurs petits contenants lors de l'embouteillage et l'achat.
- IL faut bien refermer les flacons après usage, car les huiles essentielles sont volatiles, par conséquent elles s'évaporent dans l'atmosphère et perdent progressivement leurs propriétés et leur arôme.
- Les flacons doivent être stockés en position verticale, car en position horizontale il y a un risque que le bouchon soit attaqué par l'huile (les huiles essentielles ont une action corrosive sur le plastique).

2.5. Technique d'extraction de l'huile essentielle :

Divers procédés sont actuellement utilisés pour l'extraction des produits aromatiques des végétaux. Selon la technique utilisée, l'extraction des produits permet d'obtenir des huiles essentielles, des pommades, des concrètes, des absolues, des rétinoides ou des infusions (Mehani, 2015)

2.5.1. Extraction par Hydrodistillateur :

Elle est le procédé le plus répandu, car il convient à la majorité des plantes c'est la méthode normée pour l'extraction d'une huile essentielle, ainsi que pour le contrôle de qualité.

Le procédé consiste à immerger la matière première végétale dans un bain d'eau. L'ensemble est ensuite porté à ébullition généralement à pression atmosphérique, et comme les HEs sont insolubles dans l'eau mais soluble dans la vapeur, lorsqu'on envoie de la vapeur d'eau sur la plante, elle se charge au passage des huiles. La chaleur permet l'éclatement et la libération des molécules odorantes contenues dans les cellules végétales.

Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange azéotropique. Sachant que la température d'ébullition d'un mélange est atteinte lorsque la somme des

tensions de vapeur de chacun des constituants est égale à la pression d'évaporation, elle est donc inférieure à chacun des points d'ébullition des substances pures.

Ainsi le mélange azéotropique « eau + huile essentielle » distille à une température égale 100°C à pression atmosphérique alors que les températures d'ébullition des composés aromatiques sont pour la plupart très élevées, la vapeur d'eau ainsi restée de ces essences est envoyée dans un compartiment pour y refroidir. Là, la vapeur redevient donc liquide et les huiles s'en désolidarisent (elles flottent à la surface). On les récupère alors par décantation (Labioud, 2016).



Figure 06:Extraction par hydrodistillation (Laboratoire de microbiologie appliquée, 2020).

2.6. Activités antibactériennes de l'huile essentielle :

Les molécules aromatiques possédant l'activité antibactérienne la plus importante sont les phénols, les terpènes ou terpénoïdes ont aussi des effets contre les bactéries et différents autres germes causant des problèmes dans le domaine médicale et agroalimentaire. Cependant le mécanisme de l'action de ces terpènes n'est pas entièrement compris et qu'il peut être s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles.

D'une manière générale, l'action des huiles essentielles se déroule en trois phases :

- Attaque de la paroi bactérienne par l'huile essentielle, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires.
- Acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure.
- Destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie.

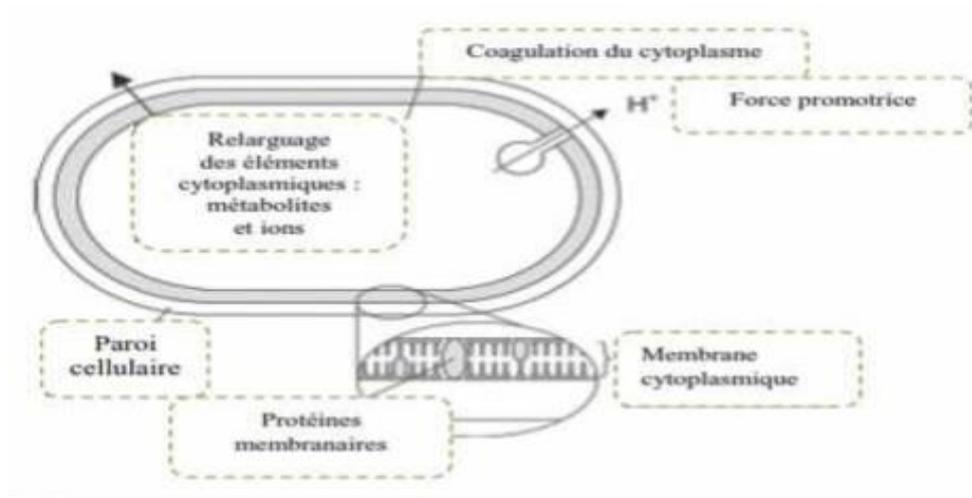


Figure 07: Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Chibah et Djouaher , 2018).

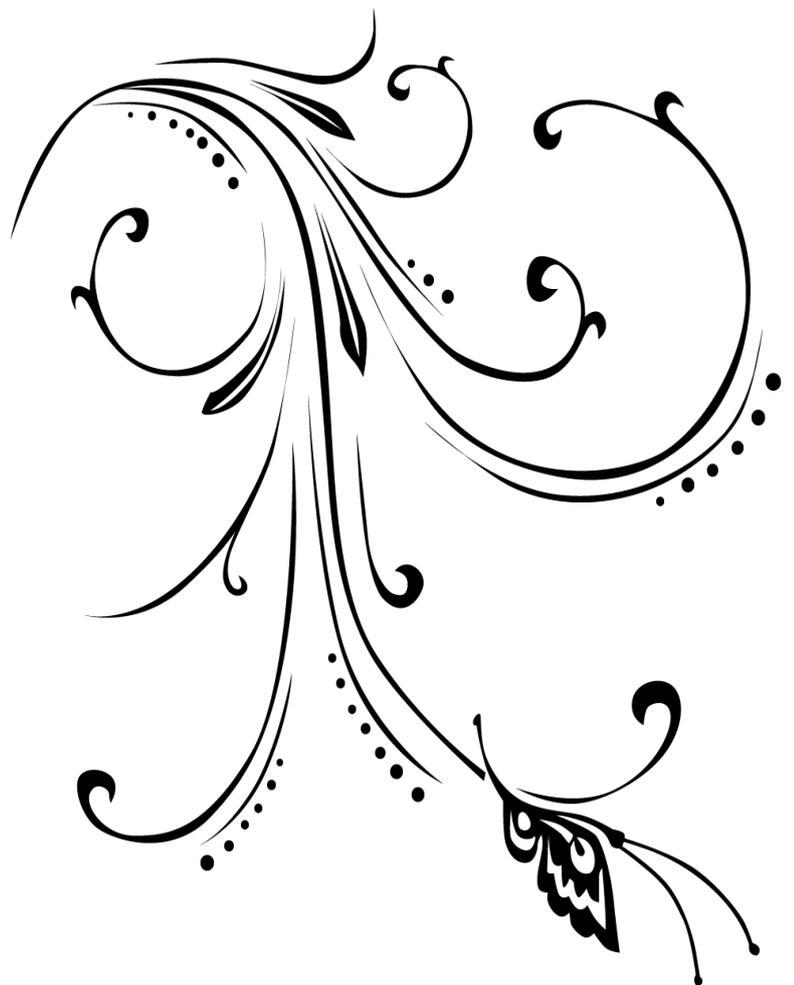
2.7. Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus*, en étant ingérées à forte dose, pourraient être toxiques au moins chez l'enfant. Les premiers symptômes sont d'ordre digestif, puis on observe de l'hypotension, de l'hypothermie et des troubles mentaux.

En usage externe, des applications de quantités excessives d'essences d'*Eucalyptus* ont pu aussi provoquer quelques troubles chez l'homme (Mychel, 2010).



Partie II : Matériels et Méthodes



Partie II: Matériels et Méthodes

II.1. Objectifs de travail :

L'ensemble de ce travail a été effectué au sein du laboratoire de microbiologie du département de Biologie appliquée de la faculté des sciences exacte et science de la nature et de la vie, de l'Université Laarbi Tbessi de Tébessa pendant une durée de deux mois (Janvier jusqu'au début de Mars) de l'année universitaire 2020.

Le but de ce travail consiste à l'étude «In vitro» de l'effet antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* sur différents souches bactériennes provenant d'infection urinaire (Test ECBU).

Les souches bactériennes testés sont des souches pathogènes clinique proviennent des différents cliniques tels que :

Le laboratoire d'analyses médicale privé Dr. Ziadi, la polyclinique 04 mars 1956 et le laboratoire d'analyses médical privé Dr. Allalou de Tébessa.

II.2. Préparation de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*

II.2.1. Matériel :

II.2.1.1. Matériel végétale :

Le matériel végétal est *Eucalyptus camaldulensis*. Les échantillons ont été récoltés dans la région de Tnoukla la commune de Bekkaria (Tébessa) le 25 janvier 2020. L'âge des arbres est d'environ 25 ans. (**Annex 01**)

La récolte a été réalisée l'après midi, elle concerne seulement la partie aérienne de l'arbre adultes ; choisis au hasard.



Figure 08 : Partie aériennes d'*Eucalyptus camaldulensis* (photos personnelles ,2020).



Figure 09 : Région de récolte.

II.2.1.2. Produit chimique :

- ✓ Ethanol
- ✓ Eau distillé
- ✓ Acétone

II.2.1.3. Appareillage:

- ✓ Mortier avec pilon
- ✓ Chauffe ballon
- ✓ Appareil d'hydrodistillation de type « Clevenger »
- ✓ Eprouvette
- ✓ Flacons en verre
- ✓ Réfrigérateur
- ✓ Balance électronique.

II.2.2. Méthode :

II.2.2.1. Séchage de plante :

Les échantillons ont été bien séchés à une température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité pendant une période de 10 jours et sont conservés dans des sacs propres pour éliminer toutes impuretés puis transportées au laboratoire de biologie végétale du département des êtres vivants afin de commencer les procédés d'extraction.



Figure 10 : La plante d'*Eucalyptus camaldulensis* pendant le séchage (Photo personnelle, 2020).



Figure 11 : Partie aérienne d'*Eucalyptus camaldulensis* après séchage et broyage. (Photo personnelle ,2020).

2.2.2. Extraction des huiles essentielles :

➤ Principe :

L'hydrodistillation est la méthode la plus simple, la plus anciennement utilisée (Mebarki, 2010; Abdelli, 2017).

Le principe consiste à porter à ébullition dans un ballon, un mélange d'eau et de plante dont on souhaite extraire l'huile essentielle. Les cellules végétales éclatent et libèrent les molécules odorantes, lesquelles sont alors entraînées par la vapeur d'eau créée. Elles

Partie II: Matériels et Méthodes

passent par un réfrigérant à eau où elles sont condensées, puis sont récupérées dans un récipient.

➤ Mode opératoire :

L'extraction des huiles essentielles de partie aérienne d'*Eucalyptus camaldulensis* a été effectuée à l'aide d'un dispositif de type clewenger. Avant l'emploi, l'appareil a été rincé avec de l'acétone et l'eau distillée afin d'éliminer les poussières et les graisses probablement présentes dans l'appareil pour éviter toute contamination de l'huile au cours de l'extraction.

Cette méthode consiste à introduire 100g de matériel végétal dans un ballon de 2 L contenant 650 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à ébullition pendant 2 h 30 min à 3h à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle, traversent le réfrigérant et se condensent ainsi avant de chuter dans une ampoule de décantation, l'huile se sépare par la suite de l'eau par différence de densité (Figure 12).

Après extraction et la récupération, le volume de l'huile essentielle obtenu a été mesuré puis conservé dans un flacon en verre stérile. Le flacon a été couvert d'un papier aluminium à l'abri de la lumière puis conservé dans un réfrigérateur jusqu'à son usage pour les tests biologiques.

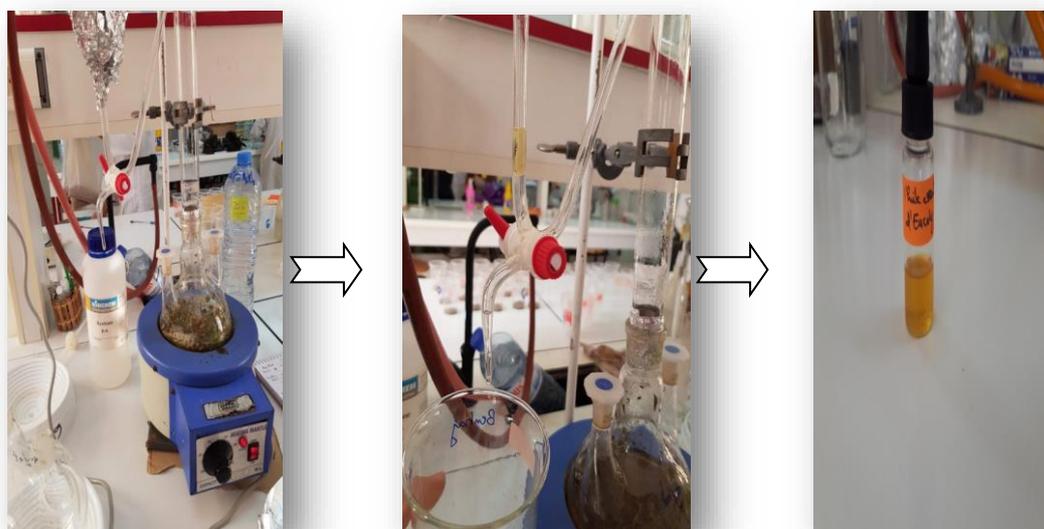


Figure 12 : Dispositif d'extraction des huiles essentielles de type clewenger + flacon de l'huile d'*Eucalyptus camaldulensis*. (Photo personnelle ,2020)

➤ Conservation de l'huile essentielle obtenue

L'huile essentielle étant volatil et peut être cohésive dans certains cas donc sa conservation nécessite certains conditions pour cela. L'huile essentielle ainsi obtenue est conservée à 4 °C dans des flacons en verre brun jusqu'à son analyse (Salemkour et Rahaoui ,2019).

II.2.2.3. Détermination de rendement en huile essentielle :

Le rendement en HE est défini comme étant le rapport entre la masse de l'huile essentielle et la masse du matériel végétal utilisé pour cent grammes de matière végétale sèche. Après récupération des huiles essentielles, le rendement est calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE}\% = \text{MHE} / \text{Ms} \cdot 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en (g) pour 100 g de la matière sèche

MHE : Masse d'huiles essentielles récupérées (g)

Ms : Prise d'essai du matériel végétal (g). (AFNOR, 1986).

II.2.3. Etude de l'activité antibactérienne:

II.2.3.1. Matériels

II.2.3.1.1. Matériels biologiques :

❖ Les souches bactériennes testées :

Les souches bactériennes qui ont été testés pour déceler l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* sont des souches pathogènes clinique proviennent d'infection urinaire (retenue d'antibiogramme). Leur caractéristiques sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 03 : Liste des caractéristiques des souches bactériennes testées.

Partie II: Matériels et Méthodes

Nom de la souche	Famille	Forme	Gram	Lieu de récupération
<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterococcaceae	coque	Positif	La polyclinique 04 mars 1956 -Tébessa-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Staphylococcaceae	coque	Positif	Le laboratoire d'analyses médicale privé Dr. Ziadi -Tébessa -
<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylococcaceae	coque	Positif	Le laboratoire d'analyses médical privé Dr. Allalou -Tébessa-
<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	bacille	Négatif	Le laboratoire d'analyses médicale privé Dr. Ziadi -Tébessa -
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	Enterobacteriaceae	bacille	Négatif	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pseudomonadaceae	bacille	Négatif	
<i>Proteus mirabilis</i>	Enterobacteriaceae	bacille	Négatif	La polyclinique 04 mars 1956 -Tébessa-

II.2.3.1.2. Les milieux de culture (annexe 02) :

- ✓ Chromagar d'orientation
- ✓ Gélose Muller-Hinton (MH)
- ✓ Gélose cétrimide (P.aeruginosa)
- ✓ Hecktoen (P.mirabilis)
- ✓ Mackonkey (E. coli)

II.2.3.1.3. Les réactifs chimiques :

- ✓ Les colorants de Gram
- ✓ DMSO

II.2.3.1.4.Appareillage :

a) Grands matériels

- ✓ Etuve
- ✓ Plaque chauffante
- ✓ Agitateur
- ✓ Autoclave
- ✓ Bain marie

Partie II: Matériels et Méthodes

b) Petits matériels :

- ✓ Bec Bunsen
- ✓ Boîtes de pétri
- ✓ Anse de platine
- ✓ Portoirs
- ✓ Micropipettes
- ✓ Pipettes Pasteurs
- ✓ Spatule
- ✓ Barreaux magnétique
- ✓ Papier Whatman n°1 de 6mm de diamètre
- ✓ Ecouvillons stériles
- ✓ Pince
- ✓ Fond noire
- ✓ Seringue
- ✓ Compte-gouttes
- ✓ Embouts
- ✓ Pied a coulisse.

c) les verreries :

- ✓ Les flacons
- ✓ Béchers gradués
- ✓ Tubes à essai stériles
- ✓ Lames et lamelles.

II.2.3.2. Méthodes :

II.2.3.2.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes étudiées :

Les souches bactériennes sont retenues d'un antibiogramme des patients ayant des infections urinaires, et pour vérifier la pureté des souches nous avons appliqué :

- ✓ Ensemencement sur milieux sélectif 24h à 37°C.
- ✓ Examen microscopique après coloration de Gram (**annexe 03**).
- ✓ Ensemencement sur chromagar d'orientation.

II.2.3.2.2. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne :

La méthode employée pour l'évaluation de l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*; est la méthode de diffusion à partir d'un disque de papier Whatman (l'aromatogramme) qui permet la mise en évidence de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle, et la méthode de micro dilution qui a pour objectif de détermination des CMI (concentrations minimales inhibitrices) (Yakhlef, 2010).

Partie II: Matériels et Méthodes

II.2.3.2. 3. L'aromatogramme sur milieu solide :

L'aromatogramme est basée sur une technique utilisée en bactériologie médicale, appelée antibiogramme. Elle a l'avantage d'être d'une grande souplesse dans le choix des produits à tester et de s'appliquer à un grand nombre des espèces bactériennes (Mehani, 2015).

Cette méthode consiste à mettre en évidence une éventuelle activité antibactérienne de l'huile d'*Eucalyptus camaldulensis*, en présence des germes testés. Des disques absorbants stériles, imprégnés d'une quantité de l'huile et disposés sur une gélose inoculée avec les souches bactériennes. La diffusion de l'huile dans la gélose permet de suivre l'inhibition et la croissance des germes qui se traduira par une zone claire autour de disque dite zone d'inhibition.

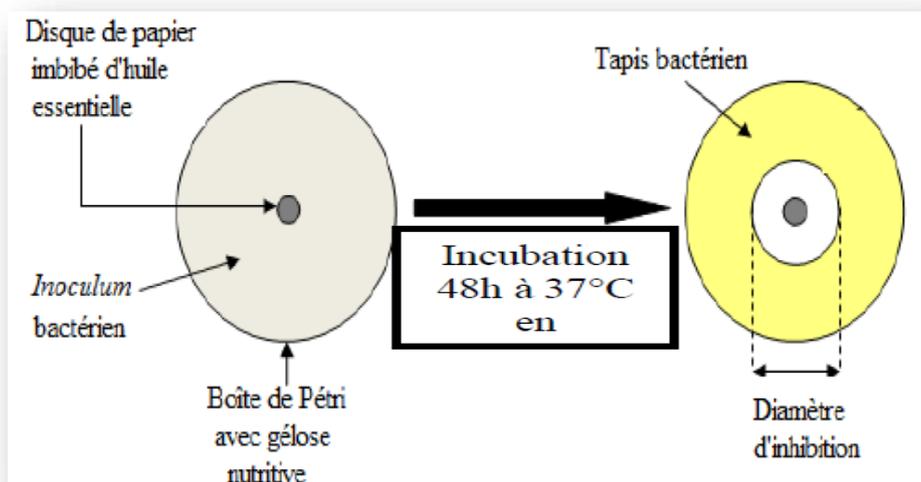


Figure 13 : Principe de la méthode de diffusion par disque (Medjekane, 2017).

A : Préparation de l'inoculum et ajustement de la charge bactérienne:

A partir d'une culture pure des bactéries sur chromagar d'orientation, nous avons raclé à l'aide d'une pipette pasteur scellée 4 colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Ensuite, nous avons déchargé la pipette pasteur dans 10 ml d'eau physiologique stérile et nous avons homogénéisé la suspension bactérienne afin de préparer des suspensions ayant

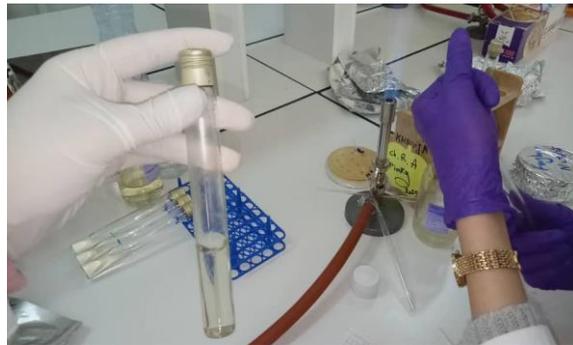
Partie II: Matériels et Méthodes

une turbidité équivalente au standard McFarland 0.5 ce qui correspond à $1,5 \times 10^8$ UFC/ml pour les bactéries (D.O = 0.08 à 0.1 / $\lambda = 600\text{nm}$). (**Annexe 04**).

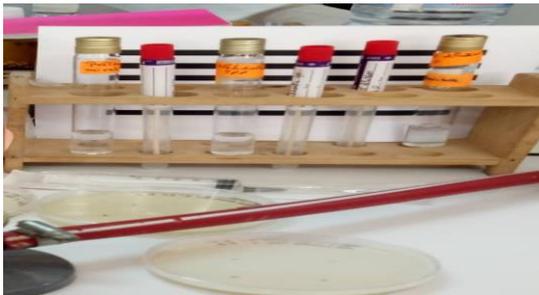
L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture si la DO est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile si elle est trop forte. La densité optique est ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre.



a- Prélèvement des colonies.



b-Déchargement dans l'eau physiologie.



c-Ajustement de la charge bactérienne.



d- Enrichissement.

Figure14 : Préparation de l'inoculum (photos personnelles ,2020).

B : Préparation des disques :

Nous avons utilisé le papier Whatman n°1 de 6 mm coupé en contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer. Les disques une fois préparés, sont introduits dans un flacon en verre et ont placé dans l'autoclave pendant 20 minutes à 120 °C pour éviter tous risques de contamination au germe exogène au cours de l'expérimentation.

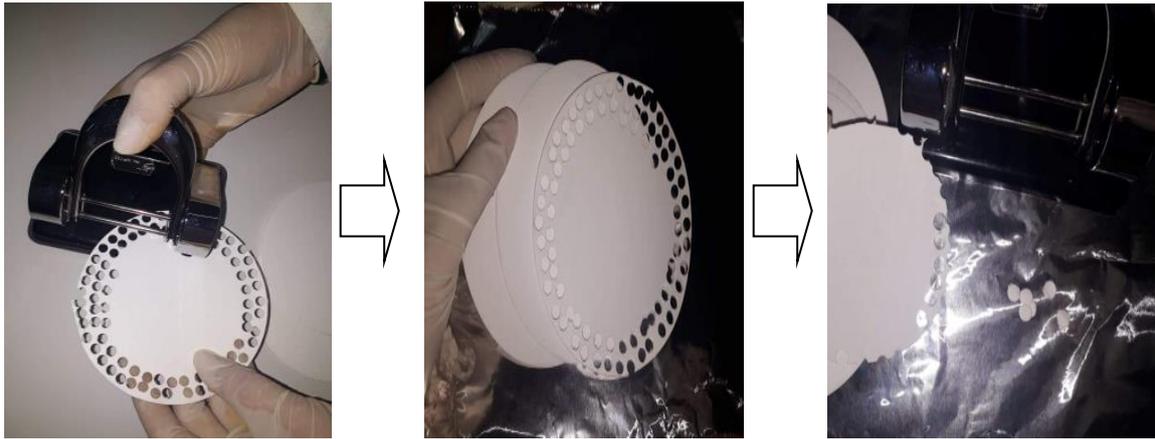


Figure 15: Etapes de préparations des disques (photos personnelles ,2020).

C : L'ensemencement :

Nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. Puis on l'essorer sur les bords, et on fait froter l'écouvillon sur la surface de la boîte contenant la gélose solidifiée (Muller Hinton) de haute en bas, en stries serrées.

L'opération doit se faire deux fois en tournant la boîte de Pétri d'un angle de 60° à chaque fois. Les boîtes ainsi ensemencées ont été mises à sécher pendant 20 min à température ambiante.



a. Faire tremper l'écouvillon dans une suspension bactérienne (photos personnelles ,2020).



b- Faire frotter l'écouvillon sur la surface de la boîte contenant la gélose MH.

Figure 16: Ensemencement bactérienne (photo personnelle, 2020).

D : Dépôt des disques :

A l'aide d'une pince stérile, nous préparons trois disques pour chaque boîte, qui sont imbibés avec l'huile essentielle de la plante jusqu'à imprégnation total du disque. Les disques ainsi traités sont déposés sur la face de la gélose Muller Hinton inoculée en les appuyant légèrement à l'aide d'une pince stérile, laissons diffuser, puis incuber à 37°C à l'étuve pendant 24 heures.

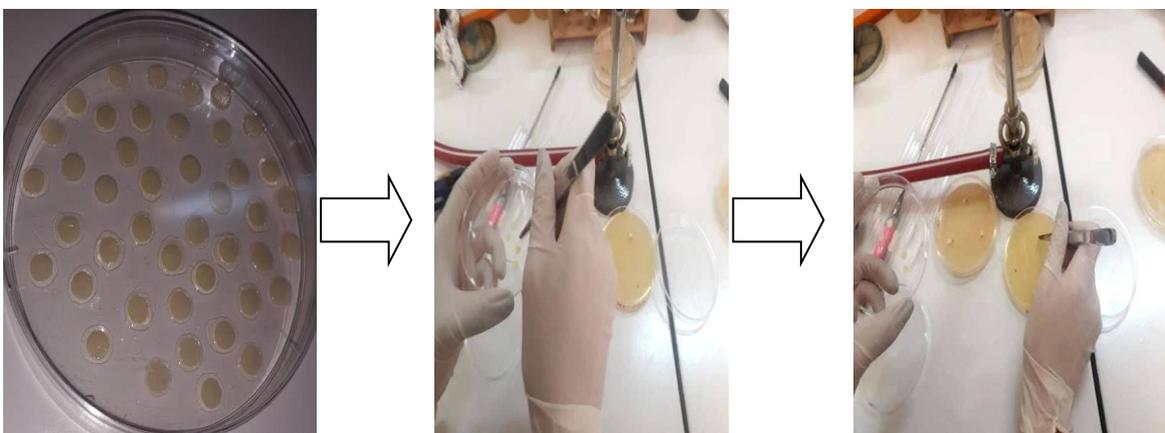


Figure 17 : Dépôt des disques sur milieu solide (photo personnelle, 2020).

E : Expression des résultats :

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition formée autour de chaque disque. Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés au millimètre selon (Moreira, Ponce et *al*, 2005), la

Partie II: Matériels et Méthodes

sensibilité des bactéries à l'huile essentielle a été classée selon le diamètre des halos d'inhibition comme le résume le Tableau suivant :

Tableau 04 : Transcription des diamètres d'inhibition des disques imprégnés (Moreira, Ponce et *a*, 2005).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	Transcription	Sensibilité des germes
<8	-	Résistante
9-14	+	Sensible
15-19	++	Très sensible
>20	+++	Extrêmement sensible

II.2.3.2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et le pourcentage d'inhibition (I%) :

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en huile essentielle capable d'inhiber la croissance microbienne à 90% (Bendjelloul ,2018).

Le pourcentage d'inhibition de la croissance bactérienne est calculé par la formule suivante : (Haddaf , Kaloustian et *all.*2004).

$$\% \text{ Inhibition} = (D \text{ test} / D \text{ control}) \times 100$$

D test : diamètre de la zone d'inhibition.

D control: diamètre de la boite de pétri

Partie II: Matériels et Méthodes

a. Préparation des dilutions de l'huile essentielle *d'Eucalyptus*

camaldulensis:

Après la préparation d'une série de dilution [1/2, 1/4, 1/6, 1/8 et 1/16] (v/v) dans des tubes des eppendorfs stériles. Nous l'avons diluée dans le DMSO (diméthylsulfoxyde). Ce choix a été fait parce que le DMSO est le solvant préférable pour la majorité des auteurs, notamment, (Gachkar et al, 2006) qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.

Le tableau suivant résume le protocole de préparation :

Tableau 05: Préparation des dilutions de l'huile essentielle *d'Eucalyptus camaldulensis*.

Concentration	HE pour (µl)	DMSO (µl)
1/2	500	500
1/4	250	750
1/6	125	875
1/8	62.5	937.5
1/16	31.25	968.75

Protocole d'ensemencement :

- Préparation d'inoculum selon la méthode précédente.
- Ecoulement de milieu de culture gélosé Mueller Hinton dans des boîtes de Pétrie.
- Préparation de l'huile essentielle, DMSO et les différentes concentrations de l'huile dans des tubes des eppendorfs.
- Ensemencement par écouvillonnage de haute en bas, en stries serrées (l'opération doit se faire deux fois).
- Des disques stériles sont imprégnés avec 10 µl d'HE ainsi que le DMSO et les différentes concentrations de l'huile.
- Dépôt des disques, puis les boîtes de Pétri étaient maintenues pendant 20 min à température ambiante et après les incubées à 37°C pendant 24 h.



Figure 18 : Préparation d'inoculum (photo personnelle, 2020).



Figure 19 : Ecoulement du milieu de culture MH (photo personnelle, 2020).

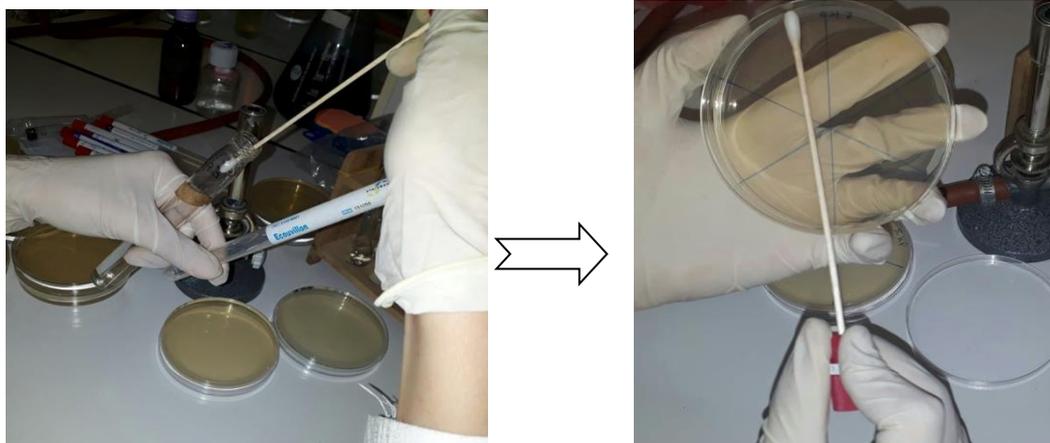


Figure 20 : Ensemencement des bactéries sur MH (photo personnelle, 2020).



Figure 21 : Préparation des dilutions, HE et DMSO (photo personnelle, 2020).

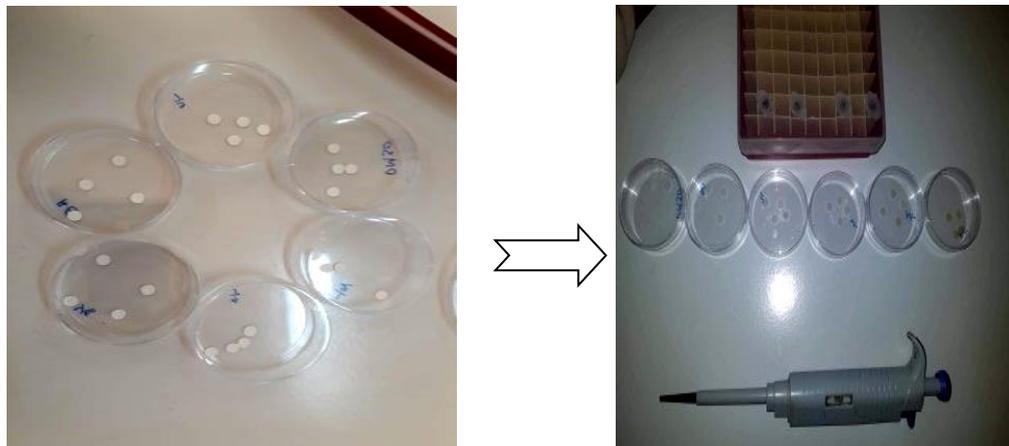


Figure 22 : Imprégnation des disques (photo personnelle, 2020).

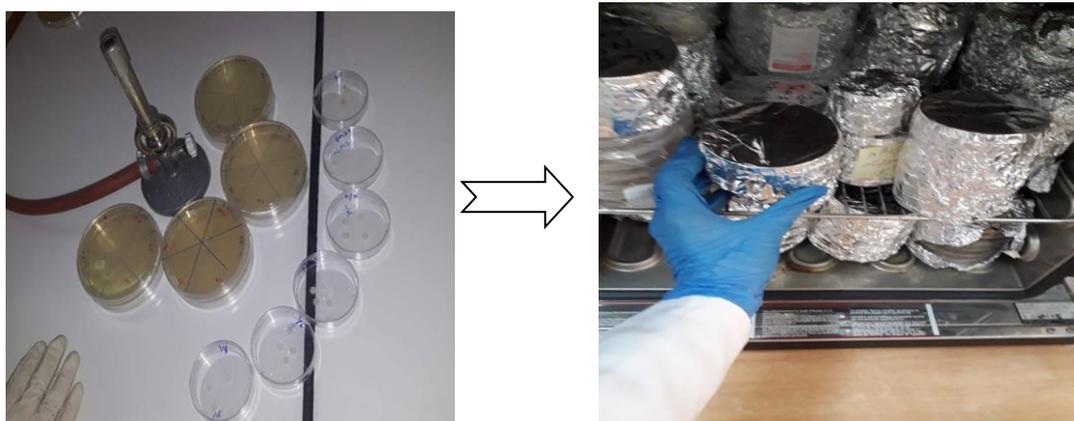
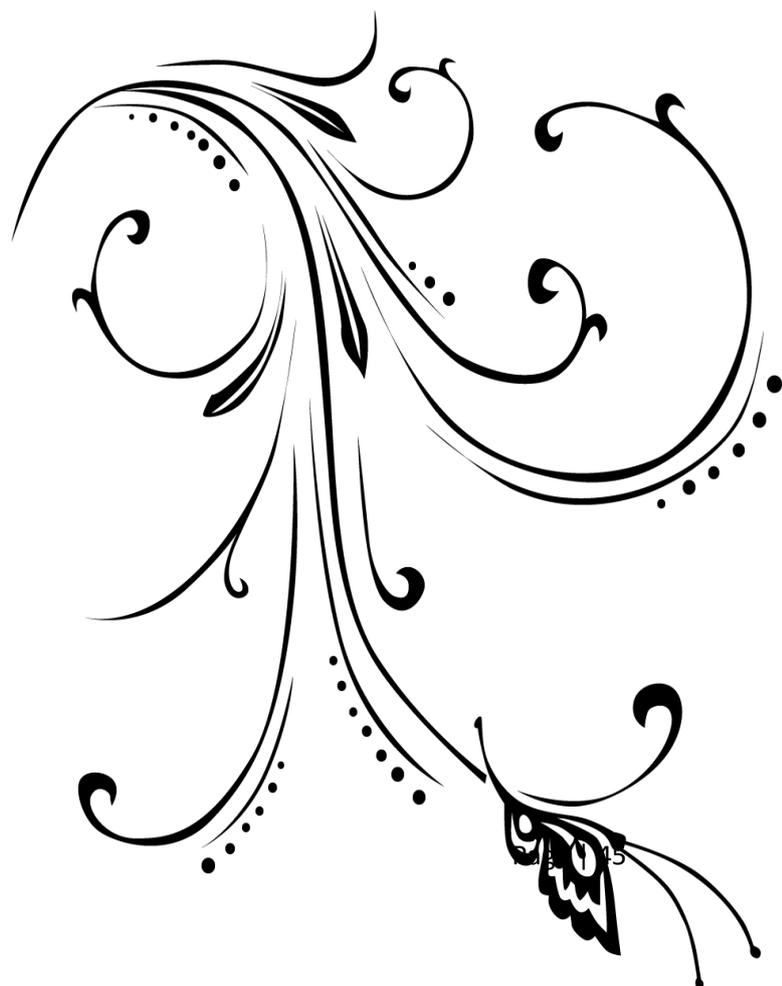


Figure 23 : Dépôt des disques et incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24h (photo personnelle, 2020).



Partie III : Résultats et discussion



III.1. Extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*

III.1.1. Rendement de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*:

L'hydrodistillation de la partie aérienne de la plante a été réalisée avec le dispositif de clevenger. Le rendement moyen en HE au mois de février est de $\approx 0,96\%$.

Ainsi que pour chaque extraction, nous avons pu récupérer une quantité de $\approx 0,95\text{ml}$ d'HE pour 100 g de matière végétale sèche (**Annexe 05**).

Cependant, le rendement en huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* est équivalent à (**0,96%**), la comparaison de nos résultats avec d'autres travaux sur la même espèce, nous a amené à dire que notre résultat est presque similaire à celui de (Mehani, 2015) qui a trouvé (**0,99%**) par rapport à différents endroits d'Ouargla, notre résultat est supérieur à celui rapporté par (Bouchra et Rania, 2019) est équivalent à (**0,6%**).

En Algérie, le rendement en HE peut varier d'une région à l'autre, Une étude réalisée par (Ashraf et al, 2010), sur des feuilles d'*Eucalyptus* originaire de Pakistan et du Maroc ont révélé une teneur en HE obtenu au cours de nos extractions est comprise entre (**0,90%-0,98%**).

D'un autre côté, certains auteurs notamment (Chalchat et al, 2000) estimé à (**0,5%**), un rendement en huile significativement plus élevé a été signalé pour l'*Eucalyptus* de Taiwan (**2,3%-3%**), une autre étude de celle de l'espèce de Bejaia obtenu par (Makhlouf et al ,2016) équivalent à (**3,1%**).

Par ailleurs, certains auteurs notamment (Chalchat et al, 2000) ont estimé un rendement égal à **0,5%** pour l'*Eucalyptus* tandis qu'un rendement en huile a été significativement plus élevé pour l'*Eucalyptus* de Taiwan (**2,3%-3%**) et celui de Bejaia (**3,1%**) obtenu par (Makhlouf et al ,2016).

En général, ces divergences entre les différents résultats sont dues aux différents facteurs : les espèces de plantes, les saisons, les régions géographiques, les produits et les réactifs utilisés dans l'extraction des huiles essentielles, les organes, le génotype des plantes, la période de récolte, le degré les conditions, le temps , la température de séchage et la présence des mauvaises herbes (Ghasemian, 2019).

III.1.2. Caractéristiques organoleptiques :

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation du matériel végétal d'*Eucalyptus camaldulensis* est de couleur jaune foncé. Elle présente une odeur très forte, pénétrante et prononcée fraîche, caractéristique de l'eucalyptol (1,8-cinéole).

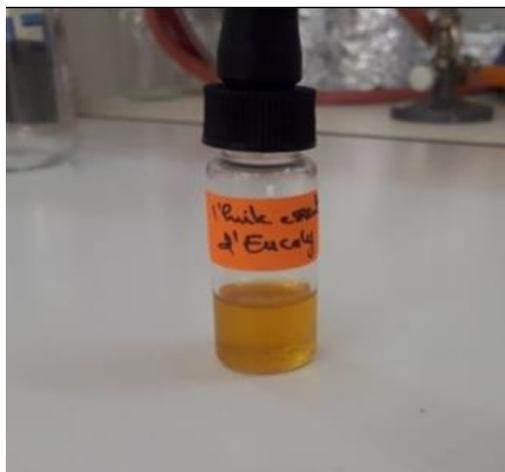


Figure 24: Huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* (photo personnelle 2020).

Les paramètres organoleptiques de l'HE sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes (AFNOR, 2000).

Tableau 06 : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*.

Caractéristiques organoleptiques	Aspect	Couleur	Caractéristiques
AFNOR	Liquide mobile, limpide	Presque incolore à jaune pâle	fraîche, plus ou moins Eucalyptolée selon l'origine
Huile essentielle étudiée	Liquide, limpide	Jaune foncé	Fraîche Eucalyptolée

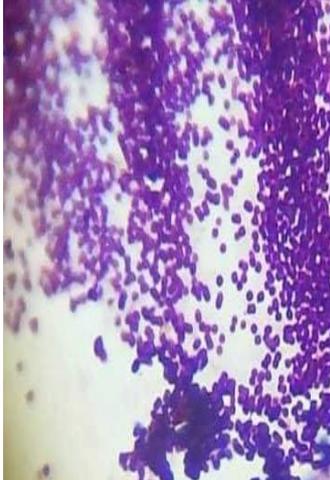
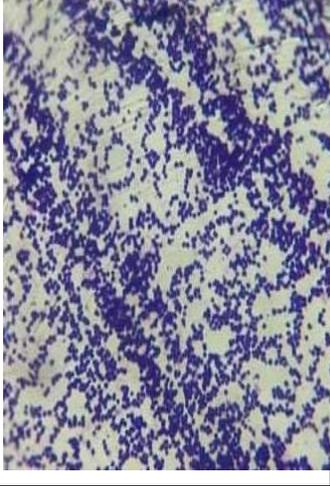
III.2. Etude de l'activité antibactérienne

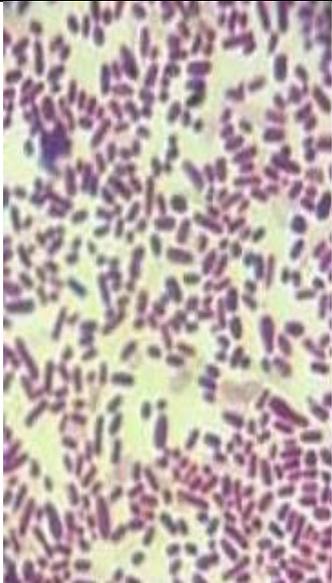
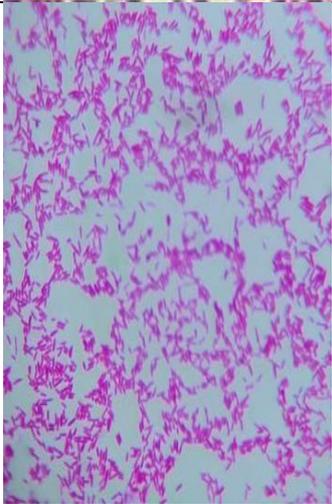
Partie III : Résultats et discussion

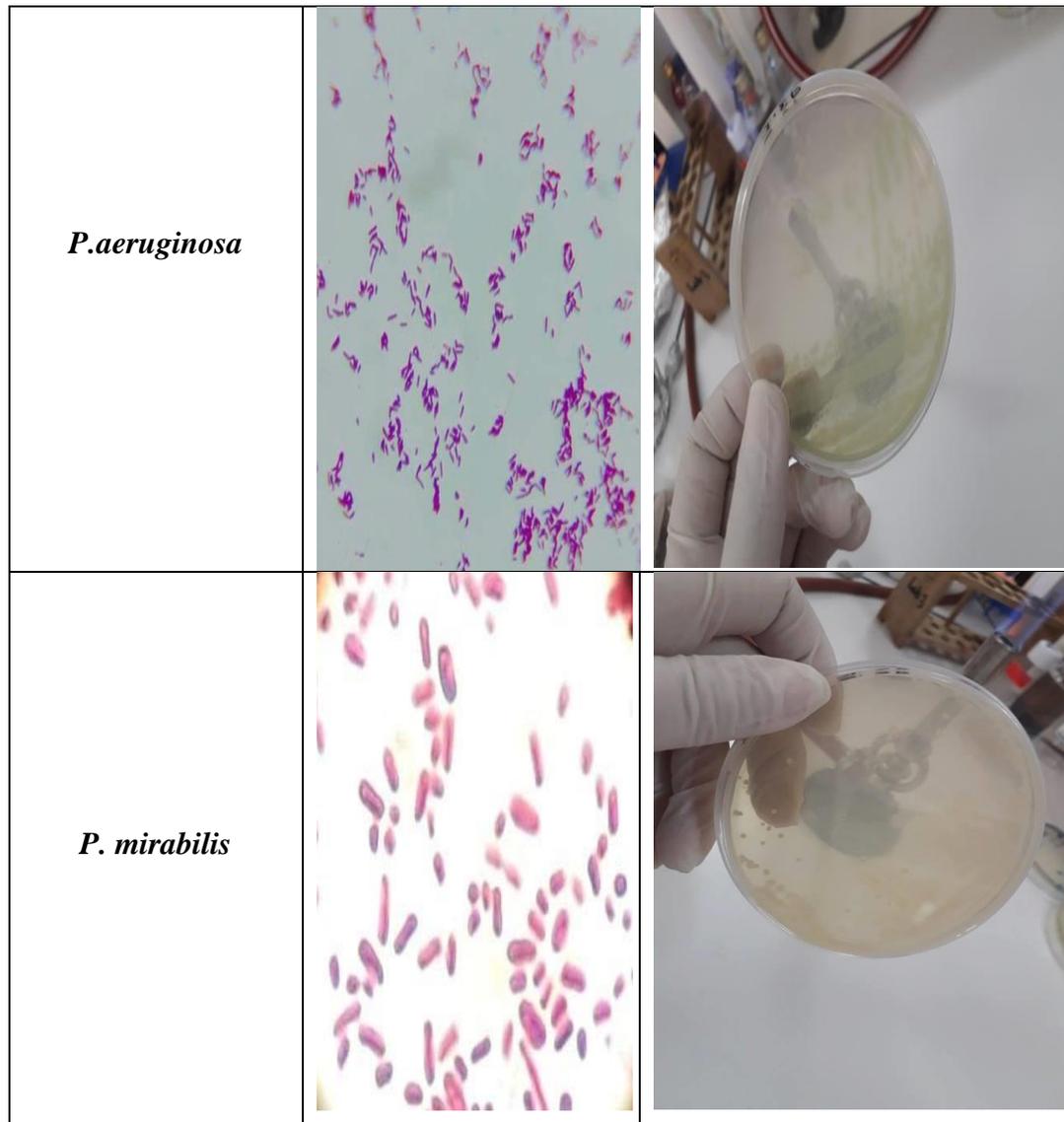
III.2.1. Vérification de la pureté des souches bactériennes étudiées :

Les résultats de la vérification de la pureté des souches bactériennes sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 07 : Aspect microscopique et macroscopique sur milieu chromagar des souches bactériennes testées.

La souche bactérienne	Sous microscope Après coloration de Gram	Sur chromagar
<i>E.faecalis</i>		
<i>S.saprophyticus</i>		

<p><i>S.aureus</i></p>		
<p><i>E. coli</i></p>		
<p><i>K. pneumoniae</i></p>		



III.2.2. Méthode de diffusion sur disque « Aromatogramme » (annexe 06)

III.2.3.Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne :

L'étude du pouvoir antibactérien d'*Eucalyptus camaldulensis* par la méthode de diffusion sur gélose. La mesure de la valeur de diamètre des zones d'inhibition y compris le disque (6 mm) permettent de déterminer cette activité antibactérienne de cette plante in vitro. Le pouvoir antibactérien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm).

L'échelle d'estimation de l'activité antibactérienne est donnée par (Moreira,Ponce et al,2005).

Ils ont classé les diamètres des zones d'inhibition (D) de la croissance bactérienne en 4 classes:

Partie III : Résultats et discussion

- ✓ Résistante : **D<8 mm**
- ✓ Sensible : **9 mm<D<14 mm**
- ✓ Très sensible : **15 mm<D<19 mm**
- ✓ Extrêmement sensible : **D>20 mm**

Les résultats issus de l'activité antibactérienne de l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis* par la méthode de diffusion sur milieu solide sont indiqués sur le tableau suivant :

Tableau 08 : Valeurs des diamètres moyennes de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition de l'huile essentielle pure d'*Eucalyptus camaldulensis*.

Souche		HE d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	
		D (mm)	I%
G+	<i>E.faecalis</i>	0 ± 0	0
	<i>S. saprophyticus</i>	12 ± 0	13,33
	<i>S. aureus</i>	17 ± 1	18 ,88
G-	<i>E.coli</i>	15,66 ± 0,577	17,4
	<i>k. pneumoniae</i>	13,66 ± 0,577	15,17
	<i>P.aeruginosa</i>	0 ± 0	0
	<i>P. mirabilis</i>	8 ± 0	8,88

D : Diamètre, I% : pourcentage d'inhibition

E.faecalis: *Enterococcus faecalis* , *S. saprophyticus*: *Staphylococcus saprophyticus* *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *E.coli*: *Escherichia coli*, *k. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*, *P.aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis*. : *Proteus mirabilis*.

G+: Gram+, G- : Gram -.

L'HE d'*Eucalyptus camaldulensis* pure a une très forte activité sur tous les souches bactériennes testés 8 mm<D<17 mm, sauf sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterococcus faecalis* D=0 mm. En effet nous avons remarqué une diminution importante du pourcentage d'inhibition avec les souches bactérienne suivante : *Staphylococcus aureus* 18,88 %, *Escherichia coli* 17,4%, *Klebsiella pneumoniae* 15,7 %, *Staphylococcus saprophyticus* 13,33% et *Proteus mirabilis* 8,88 % sauf pour *Pseudomonas aeruginosa* et

Partie III : Résultats et discussion

Enterococcus faecalis dont l'effet d'inhibition est nul, car elles ont déjà montré une résistance vis-à-vis de l'HE dans l'activité antibactérienne.

Les diamètres d'inhibition varient de 8 mm à 17 mm. Le plus grand diamètre d'inhibition est obtenu avec *Staphylococcus aureus* (17mm) et le plus petit avec *Proteus mirabilis* (8 mm). Donc, les résultats obtenus montrent que l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis* possède un large spectre d'activité antibactérienne sur les bactéries Gram+ que Gram - .

Des résultats similaires ont été rapportés par (Daroui, 2010). Elle montre que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (*Myrtaceae*), a une très forte activité à l'égard des *S.aureus* et *E. coli* ; aussi (Mehani, 2015) a montré que *P.aeruginosa* a un pouvoir résistante et *Proteus mirabilis* a une sensibilité sur l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* et on peut dire alors que la sensibilité des micro-organismes dépend de la composition chimique et la concentration en huiles essentielles utilisées et le type des microorganismes testés (Abdellah, 2013).

III.2.3.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

L'évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'huiles essentielle par la méthode de diffusion des disques sur le milieu MH, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau .

Toutes les valeurs (zone d'inhibition incluant le diamètre du disque de 6 mm) sont exprimées en moyenne de trois essais \pm écart type.

Tableau 09: Valeurs des diamètres moyennes de la zone d'inhibition et pourcentage d'inhibition des différentes dilutions de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*.

Partie III : Résultats et discussion

Souche		Les dilutions d'HE d' <i>Eucalyptus Camaldulensis</i>									
		1/2		1/4		1/6		1/8		1/16	
		D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %	D (mm)	I %
G+	<i>E.faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. saprophyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i>	8 ± 0	8,88	0	0	0	0	0	0	0	0
G-	<i>E.coli</i>	7 ± 0	7,77	7 ± 1,73	7,77	5,5 ± 4,59	6,11	0	0	0	0
	<i>k. pneumoniae</i>	7 ± 0	7,77	6 ± 0	6,66	6 ± 0	6,66	6 ± 0	6,66	6 ± 0	6,66
	<i>P.aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>P. mirabilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D : Diamètre, I% : pourcentage d'inhibition

E.faecalis: *Enterococcus faecalis*, *S. saprophyticus*: *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *E.coli*: *Escherichia coli*, *k. pneumoniae*:

Klebsiella pneumoniae, *P.aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis*. : *Proteus mirabilis*.

G+: Gram+, G- : Gram -.

Partie III : Résultat et discussion

III.2.3.2. Evaluation quantitative de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*:

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 10: Aromatogramme et concentration minimal inhibitrice (CMI) de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*.

Souche		Les dilutions d'HE d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>							CMI
		DMSO	0,06%	0,125 %	0,16 %	0,25 %	0,5 %	1 %	
G+	<i>E.faecalis</i>	+++	+	+	+	+	+	+	Absence
	<i>S. saprophyticus</i>	+++	+	+	+	+	+	-	1%
	<i>S. aureus</i>	+++	+	+	+	+	+	-	1%
G-	<i>E.coli</i>	+++	+	+	-	-	-	-	0,16%
	<i>k. pneumoniae</i>	+++	-	-	-	-	-	-	0,06%
	<i>P.aeruginosa</i>	+++	+	+	+	+	+	+	Absence
	<i>P. mirabilis</i>	+++	+	+	+	+	+	-	1%

E.faecalis: *Enterococcus faecalis*, *S. saprophyticus*: *Staphylococcus saprophyticus*, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *E.coli*: *Escherichia coli*, *k. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*, *P.aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. mirabilis*: *Proteus mirabilis*.

G+: Gram+, G- : Gram -

+ : Présence des germes.

- : Absence des germes.

L'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* a exercé une importante activité inhibitrice vis-à-vis des bactéries, sauf la *P.aeruginosa* et *E.faecalis* qui se révèlent une

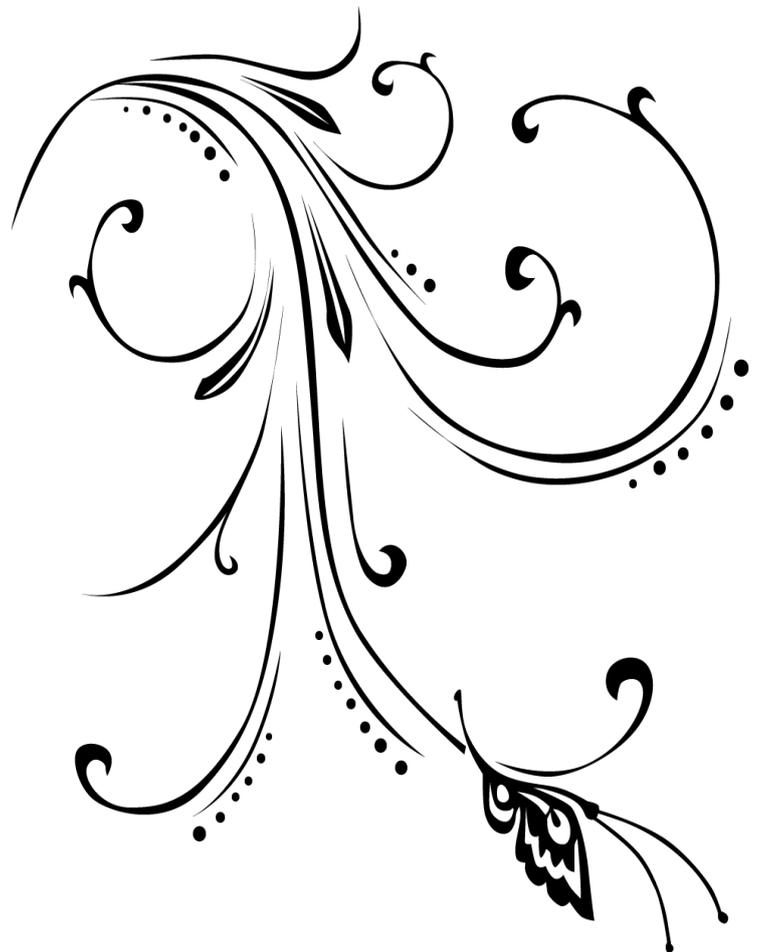
Partie III : Résultat et discussion

grande résistante. Ainsi que *K.pneumoniae* s'est montré le plus sensible, il a été inhibé à partir de la concentration minimale de 0,06% (v/v). La concentration de 0,16% (v/v) a été suffisante pour arrêter la croissance d'*E.coli*.

Tandis que *S.aureus*, *S.saprophyticus* et *P.mirabilis* ont résisté jusqu'à la concentration en huile essentielle de 1% (v/v).



Conclusion et perspective



Conclusion et Perspective

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. En effet les plantes constituent de véritables produits naturels dont il faut tirer le maximum de profit pour le bien-être des populations.

Notre étude avait pour but de mieux connaître l'*Eucalyptus camaldulensis* à travers l'étude de sa fraction aromatique (HE) ainsi que l'étude de l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* sur différentes souches bactériennes provenant d'infection urinaire humaine.

Au terme de notre étude et à la lumière des résultats de l'expérimentation obtenue il apparaît nettement que l'huile essentielle de cette essence est de couleur jaune foncé, avec une odeur agréable et un goût caractéristique. Le rendement en huile essentielle obtenu par l'hydrodistillation de plante est important de $0,96\% \pm$ écart type.

Dans l'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis*, il apparaît que les espèces bactériennes *S.aureus*, *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.saprophyticus*, *P.mirabilis* testés par la méthode de diffusion des disques sur milieu solide (Aromatogramme) sont respectivement sensibles tandis que *E.faecalis* et *P.aeruginosa* ont montré une résistance vis-à-vis d'HE.

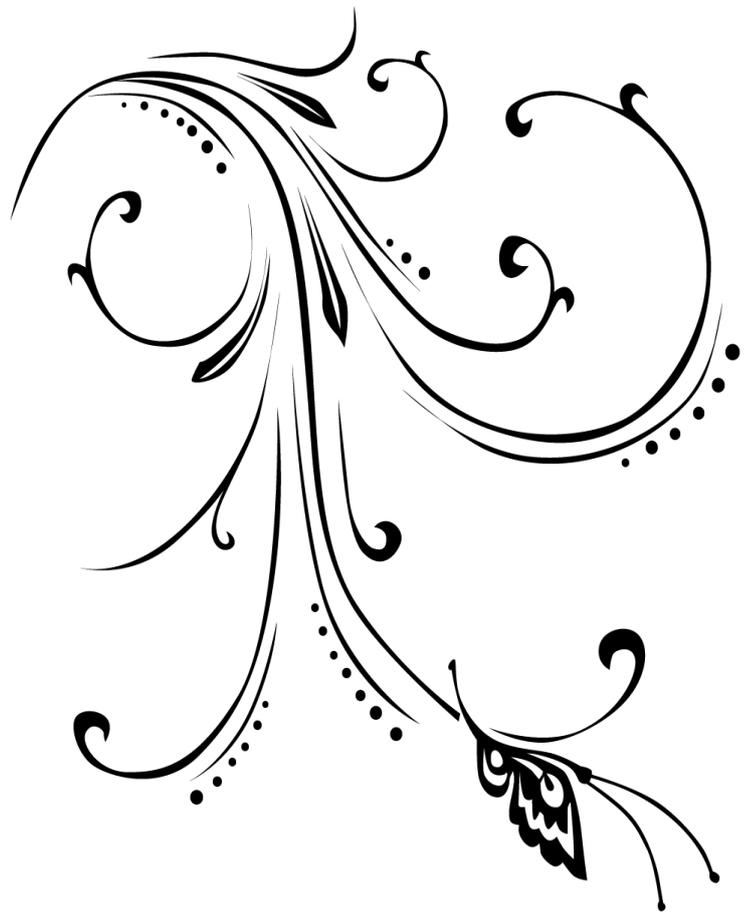
La concentration minimale inhibitrice (CMI) des huiles essentielles (0,06% à 1%) (v/v) a été suffisante pour montrer un effet inhibiteur sur la croissance de toutes les bactéries testées sauf pour *E. faecalis* et *P. aeruginosa* qui ont montré une résistance.

Nous terminerons en rappelant que, malgré les progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre toute fois plusieurs avantages et trouve son application dans divers domaines à savoir la médecine, le cosmétique, l'agriculture et le domaine pharmaceutique. D'ailleurs, il reste à l'homme beaucoup à découvrir sur ce sujet. En effet, le philosophe français Jean- Jacques Rousseau l'a si bien écrit dans son ouvrage inachevé intitulé *Les rêveries du promeneur solitaire* : "*Les plantes semblent avoir été semées avec profusion sur la terre, comme les étoiles dans le ciel, pour inviter l'homme par l'attrait du plaisir et de la curiosité à l'étude de la nature*".

En perspective, nos résultats obtenus restent préliminaires et mérites d'être exploités et complétés en les appliquant sur une large gamme de bactéries et voir même des champignons et des levures pour étudier l'effet antimicrobiens des huiles essentielles de la plante l'*Eucalyptus camaldulensis*.



Référence et Bibliographie



Référence et Bibliographie

-A-

- Abdellah, F ;Badr,S ;Mohamed.et *al*; 2013. Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'Eucalyptus camaldulensis et de son hybride naturel (clone 583). [en ligne].JournalActa Botanica Gallica, 148(3) ,183-190. disponible sur : <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/12538078.2001.10515886>. (page consulter le 20/06/2020).
- Abdelli, W., 2017. Caractérisation chimique et étude de quelques activités biologiques des huiles essentielles de *Juniperusphoenicea* et de *Thymus vulgaris*. Thèse de doctorat 3ième cycle LMD : Microbiologie Appliquée : Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 104p.
- Ashraf, M., Ali, O., Anwar, F.et *al*; 2010. Composition of leaf essential oil of V. Aleksic Sabo and P. Knezevic Eucalyptus camaldulensis. Asian J. Chem. 22 (3), 1779–1786.
- AFNOR., 1986. Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles », AFNOR. Paris. 57 p.
- AFNOR (Association Française de Normalisation) 2000. Recueil des normes françaises.
- Alzoreky, N; Nakahara, K (2003). Antimicrobial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International journal of Food Microbiology [en ligne] 80, 223_230. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12423924/?fbclid=IwAR1U5qfuM8nCXsZJaX_zjVnSYEmZBBSqWurGAHIE9pZsrKHqU-j4BcyCpA . (Page consulter le 30/05/2020).

-B-

- Belyagoubi, N ; 2012. Activité antioxydant des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-ouest Algérien [en ligne]. Thèse de doctorat : Substances Naturelles, Activités biologiques et Synthèse. Tlemcen : Biologie Université AboubakrBelkaïd-Tlemcen, 161P .disponible sur : <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/2006/1/Activite-antioxydante-des-extraits-des-composes-phenoliques.pdfpage> (page consulter le 01/02/2020).

Référence et Bibliographie

- Bendjelloul, F ; 2018. Détermination du pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle de *Menthapulegium* L. sur quelques microorganismes phytopathogènes. [en ligne]. Mémoire de master : biotechnologie et valorisation des plantes. Mostaghanem : Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, 52P. Disponible sur : <http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/5492/memoire%20final%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR0vZW6yfNF-16idqY2Ar46VBWNeHYKKGxSgZIM-wq8odUGWLtK9xFkGj-A> (page consultée le 01/01/2020).
- Bigendako M j ; 2004. Identification et Zonage des *Eucalyptus Globulus* au Rwanda, Chemonics International Inc., projet ADAR, page 01.
- Bouvet, J ; 2013. Les eucalyptus dans le monde, L' *eucalyptus* une essence majeure pour le reboisement à Madagascar, Antananarivo-Madagascar ,18-19 juin 2013, Ankatso. [en ligne]. , Université d'Antananarivo, 30pages. Disponible sur : <https://www.foretsbiodiv.org/content/download/4326/32221/version/1/file/12.+Eucalyptus+dans+le+monde.pdf>, (page consultée le 15/02/2020)
- Brooker, MIH; Kleinig, D; 1996. *Eucalyptus*, an illustrated guide to identification, Reed Books, Melbourne, p 230.

-C-

- Chalchat, J.C; Gary, R.P; Sidibe, L. et al, 2000. Aromatic plants of Mali (V): chemical composition of four *Eucalyptus* species implanted in Mali, *Eucalyptus Camaldulensis*, *E. torelliana*, *E. citriodora*, *E. Tereticornis*. *J. Essent. Oil Res.* 12, 695–701
- Chibah, S ; Djouaher, F ; 2018. Activité antibactérienne. antioxydante et anti-insectes des huiles essentielles d'eucalyptus, laurier de la région d'Ain Defla. [en ligne]. Mémoire de master : Chimie pharmaceutique. Ain Defla : Université Djilali Bounaâma de Khemis Miliana, 82p. disponible sur : <http://dspace.univ-km.dz/xmlui/bitstream/handle/123456789/2674/Activit%C3%A9-antibact%C3%A9rienne-antioxydante-et-anti-insectes-des-huiles-essentiell-es-deucalyptus-laurier-de-la-r%C3%A9gion-dAin-Defla.pdf?sequence=1&isAllowed=y%20%20%20page%20consult%C3%A9%20le%20>: (page consultée le 28/02/2020)

-D-

- Daroui-Mokaddem, H ; 2012. Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolumolusatrum* (Apiaceae), *Asteriscusmaritimus* et *chrysanthemumtrifurcatum* (asterarceae). [en ligne]. Thèse de doctorat en Biochimie Appliquée. Université Badji Mokhtar-Annaba. P8,14,28

Référence et Bibliographie

Disponible sur : <http://www.umc.edu.dz/lost/images/equipe1/doctorat/Mokaddem-Daroui.pdf>(page consulté le 30/05/2020).

-E-

- Echchaou, M ; 2018. Pouvoir antibactérienne des huiles essentielles. [en ligne].Thèse de doctorat : Pharmacie. Rabat : Université de Mohammed V ,138P .disponible sur : <http://ao.um5s.ac.ma/xmlui/bitstream/handle/123456789/16429/P0462018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
(Page consulté le 28 /02/2020).

-F-

- Franchomme, P ; Jollois, R ; Pénoël, D ; 2001. L'aromathérapie exactement : fondements, démonstration, illustration et applications d'une science médicale naturelle. [en ligne]. Edition : Roger Jollois. p 18.disponible sur : <http://voila.mes.photo.free.fr/livre/plante%20medicinale/L'aromath%C3%A9rapie%20exactement.pdf?fbclid=IwAR1VjAkzhFjeLnUqdBIFDie70vLPqZbub4T1aafALvkTln-OyV2GDYpbJxo>(Page consulté le : 01 /01/2020).

-G-

- Gachkar, L., Yadegari d., Rezaeim, B.et al; 2007. Chemical and biological characteristics of *Cuminumcyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. Food Chem., 102,898-904.
- Ghasemian, A; Eslami, M; Hasanvand .et al.2019. Eucalyptus camaldulensis properties for use in the eradication of infections.
- Goetz, P; Ghedira, K; 2012. Phytothérapie antinfectieuse. [en ligne].Springer .Paris, 147-180.disponible sur : https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-2-8178-0058-5_7?fbclid=IwAR0IEgfDz8uq6WF2D5GthYJsZooSU9BnIBbiMc9b7uxoopfaSujmRZuYhZo#citeas. (Page consulté le 30 /01/2020).
- Guignard, JI ; 2001. Abrégé Botanique : Systématique Moléculaire .12Ed. Paris. Elsevier Masson, 290P.ISBN 2-294-00452-3.

-H-

- Haddaf, Y ; Kaloustian, J ; Giordan, R. et al ; 2004.Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus vulgaris L.* et de *Thymus*

Référence et Bibliographie

numidicus Poiret d'Algerie. 6^e symposium international d'aromathérapie scientifique et plantes médicinales, Grasse, France. 2004.

-I-

- Institut national de recherche forestière;1996. «La forêt Algérienne» éditer par– Bainen-Alger février -mars page10.

-J-

- Jacques grec, 1966. L'érison, la défence, et la restauration des sols. le reboisement en Algérie, Alger.p275-281.

-K-

- Kara, k ; Saidii, S ; 2016. Contribution à l'étude comparative du rendement et des composés chimiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus L* entre les feuilles âgées et les feuilles jeunes de la forêt de Harouza (Commune de Tizi-Ouzou). [en ligne].thèse de doctorat : Biologie Animale et Végétale. Tizi-Ouzou : Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, 82p. Disponible sur : <https://dl.ummo.dz/bitstream/handle/ummo/2005/Kara%20Kahina%20%26%20Saidi%20Siham.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (page consultée le 15/02/2020).

-L-

- Labiod, R ; 2016. Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calamintha nepeta*: activité antibactérienne, activité antioxydant et activité fongicide. [en ligne]. Thèse de Doctorat. Annaba. Université Badji Mokhtar. 115p. Disponible sur : <http://www.univ-soukahrass.dz/eprints/2016-9175-fa163.pdf?fbclid=IwAR2WG7NQeI9WMgUMgdBuiz2qL2fuqphE2P2a4svSxdizGQ0AdcclXvq0I2U>.(page consultée le 28/02/2020).
- Laurent, J ; 2017.Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courantes en officine. [En ligne]. Toulouse, France. Thèse de doctorat en Pharmacie: science pharmaceutique : Université Paul Sabatier Toulouse III. 213 p. Disponible sur : <http://thesesante.upstlse.fr/2095/1/2017TOU32090.pdf>. (page consultée le 10/02/2020).

-M-

- Makhlof, L; Bey, Z ; Khodir ,M .et al, 2016. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. Journal of Microbial & Biochemical Technology. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.longdom.org/proceedings/essential-oils-composition-antibacterial-and-antioxidant-activities-of-hydrodistilled-extract-of-eucalyptus-globulus-f->

Référence et Bibliographie

[11153.html?fbclid=IwAR2_BDGe1RmQpJav6lOI3IUy0Hc0XRWWJcH4MryzEA_FubtMBjt6XHOUwwG4](https://www.researchgate.net/publication/3411153.html?fbclid=IwAR2_BDGe1RmQpJav6lOI3IUy0Hc0XRWWJcH4MryzEA_FubtMBjt6XHOUwwG4)(page consulté le 28/05/2020).

- Mazari, K; Bendinerad; N; Benkhechi, Ch .et *al.*2010. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil isolated from Algerian *Juniperus phoenicea* L and *cupressus sempervirens* L .Médicinal Plant Research [En ligne], 4(10), 959-964.Disponible sur:[https://academicjournals.org/app/webroot/article/article1380705668_Mazari%20et%20al.pdf?fbclid=IwAR2snFbJhv_1oHDDNMkwcrZCJe3LaPLiwdWyR2rR_HKK8Mrkbr7-jiBINts\(Opqge](https://academicjournals.org/app/webroot/article/article1380705668_Mazari%20et%20al.pdf?fbclid=IwAR2snFbJhv_1oHDDNMkwcrZCJe3LaPLiwdWyR2rR_HKK8Mrkbr7-jiBINts(Opqge) (page consulté le 07/06/2020).
- Mebarki, N ; 2010. Extraction de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse – antimicrobienne. [En ligne]. Magister : Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques Boumerdes: Université M'hamed Bougara Boumerdes, 137p. Disponible sur:
<http://dlibrary.univ-boumerdes.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/178/1/Mebarki%20Noudjoub%20.pdf?fbclid=IwAR1kPaypLSnbEf2221nRkHZ-gpf7V0B2mVTSpuDvHcAnvUeHMEuHNgJPILM>
(Page consulté le20/05/2020).
- Medjekane, M ; 2017. Prévalence de l'infection à *Helicobacterpylori* et son inhibition par des molécules bioactives. Thèse de Doctorat : Nutrition humaine Chlef : Université Hassiba Benbouali de Chlef.171P.
- Mehani, M ; 2015. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Eucalyptus camaldulensis dans la région d'Ouargla. [En ligne]. Thèse de doctorat: Microbiologie. Ouargla : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Sciences Biologiques, 170 p. Disponible sur :
https://www.academia.edu/32338651/Pr%C3%A9sent%C3%A9e_et_Soutenue_pu_bliquement_Par_Activit%C3%A9_antimicrobienne_des_huiles_essentielle_dEucalyptus_camendulensis_dans_la_r%C3%A9gion_de_Ouargla (page consulté le 22/01/2020).
- Mekelleche, H ; 2015. l'étude morphométrique d'*Eucalyptus globulus Labill.* (*Myrtacées*) dans la région de Tlemcen. [En ligne].Mémoire de master : Ecologie

Référence et Bibliographie

végétale et Environnement. Tlemcen : Université AboubakerBelkaid Tlemcen ,49p. Disponible sur : <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/8374/1/MEKELLECHE-Hassiba.pdf>(page consulté le 22/01/2020).

- Menef, A ; Mehrez, R ; 2006. Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis* cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. Journal de la Société Algérienne de Chimie . Disponible sur [En ligne]. <https://www.researchgate.net/publication/242364891>. (page consulté le 22/02/2020).
- Moreira, M ; Ponce, A et al. (2005). Inhibitory parameters of essential oils to reduce a food borne pathogen. LWT-Food Science and Technology. [En ligne]. 38(5),565 570. Disponible sur : https://www.researchgate.net/publication/222186515_Inhibitory_parameters_of_essential_oils_to_reduce_a_foodborne_pathogen (page consulté le 22/05/2020).
- Mychel, B.2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Tec and doc .11 rue Lavoisier 75008 Paris. Lavoisier, 1335p .ISBN 978-2-7430-1112-3.

-N-

- Nedja, I ; Nedjai, S ;(2017). Activité antimicrobienne des huiles essentielles. [En ligne]. Mémoire de mater: Ecologie microbienne. Bejaia : Université A. MIRA Bejaia ,33p. Disponible sur : http://univbejaia.dz/Fac_Sciences_Nature_Vie/documents/Ecologie%20Microbienne.pdf(page consulté le 25/05/2020).

-O-

- Ouraïni, D ; Agoumi, A ; Alaoui ; M et al.2007. Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Menthapulegium* L., comparé aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques - Phytothérapie; Vol (1), 6-14.
- Oyen, L.P.A ; Lemmens, R.H.M.J ; 2002. Ressources végétales de l'Afrique tropicale. Programme PROTAWageningen. Pays-Bas. 207 pp. ISBN 90-77114-033

-P-

- Perillaud, M ; 2018. Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles de plantes aromatiques du maquis corse. Lille, France. [En ligne]. Thèse de doctorat en pharmacie :

Référence et Bibliographie

Université de Lille. Lille, France.96p. Disponible sur:

<https://pepite-depot.univlille2.fr/nuxeo/site/esupversions/005fd9d2-e1f8-4ff2-bc56-acc40a8a5e5b> (page consulté le 20/03/2020).

-S-

- Salemkour, B ; Rahaoui, R ; 2019.Etude De L'effet Antimicrobien Des Extraits Et De L'huile Essentielle D'une Plante Médicinale *Eucalyptus Camaldulensis* De La Région de Ain Temouchent .Mémoire de mater 2:Microbiologie Appliquée .Temouchent : Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent ,83p. D

-T-

- Takahashi, T; Kokubo, R; Sakaino, M. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus Maculata*. Letters in Applied Microbiology, 39(1), 60–64.
- Tesche, S; Metternich, F; 2008.The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis. Results of a double-blind, randomised, controlled trial.Arch. Otorhinolaryngo. 1265 (11), 1355-1359.
- Traore N., Sidibe L; Bouare, S et al.1991. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Eucalyptus citriodora*Hook et *Eucalyptus houseana*W.Fitzg. ex Maiden. Int. J. Biol. Chem. Sci. 7(2): 800-804.

-W-

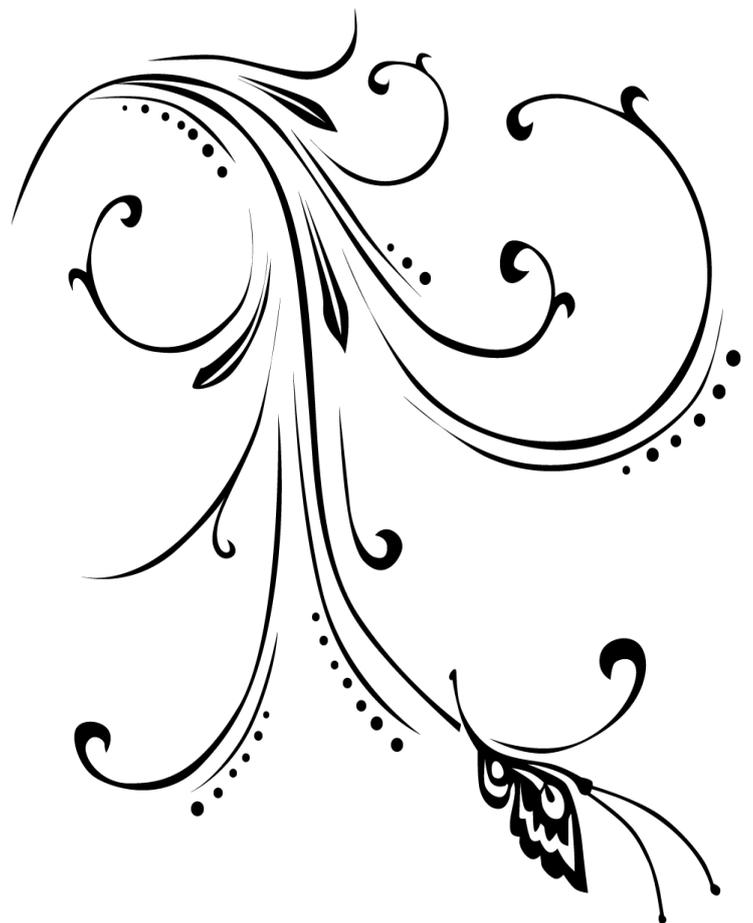
- Warot, S ; 2006. Les Eucalyptus utilisés en Aromathérapie .Préparatrice en pharmacie.[En ligne]. Mémoire de fin de formation en Phyto-aromathérapie. 31P. Disponible sur :
https://www.doc-developpement-durable.org/file/Plantes-Medicinales-Aromatiques/Eucalyptus%20utilises%20en%20Aromath%C3%A9rapie_memoire_S_Warot.pdf page consulté le 30/01/2020).

-Y-

- Yakhlef, G ; 2010. Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris l. et Laurusnobilis l.*[En ligne]. Magister : Biochimie Appliquée Batna : université el hadj lakhdar –Batna, 78p. Disponible sur:
[https://cse.google.com/cse?cx=partner-pub-2698861478625135%3A1721246843&ie=UTF-8&q=%E2%80%A2%09Yakhlef%20G.%2C%20\(2010\).%20Etude%20de%20l%E2%80%99activite%20biologique%20des%20extraits%20de%20feuilles%20de%20Thymus%20vulgaris%20l.%20et%20La](https://cse.google.com/cse?cx=partner-pub-2698861478625135%3A1721246843&ie=UTF-8&q=%E2%80%A2%09Yakhlef%20G.%2C%20(2010).%20Etude%20de%20l%E2%80%99activite%20biologique%20des%20extraits%20de%20feuilles%20de%20Thymus%20vulgaris%20l.%20et%20La)



Annexes



01. L'âge de l'arbre d'*Eucalyptus camaldulensis* :

Pour l'âge de l'arbre, il faut faire des mesures à 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 Larbi Tebessi Tébessa).

Notre arbre est de 10 cm de tour de tronc à 1.50m du sol : $10 \times 2 = 20$ ans et $10 \times 2.5 = 25$ ans donc l'arbre a environ 20 à 25 ans.

2. Composition et préparation des milieux de culture :

2.1. Les milieux solides :

Milieu	Composition	Préparation
Gélose nutritif (GN)	<ul style="list-style-type: none"> -<u>Extrait de viande</u>.....1,0 g/L -<u>Extrait de levure</u>2,5 g/L -<u>Peptone</u> 5,0 g/L -<u>Chlorure de sodium</u>...5,0 g/L -<u>Agar-agar</u>.....15,0 g/L - PH = 7,0 	<ul style="list-style-type: none"> - 20 g de milieu déshydraté - 1 L d'eau distillée
Muller-Hinton (MH)	<ul style="list-style-type: none"> -Infusion de viande de bœuf déshydraté.....300g - Hydrolysate de caséine.....17.5g - Amidon de maïs ...5g - Agar-agar.....13g - Eau distillée.....1l 	Prêt à l'emploi.
Hektoén	<ul style="list-style-type: none"> -<u>Protéase-peptone</u>:.....12,0 g -<u>Extrait de levure</u> : facteur de croissance.....3,0 g -<u>Lactose</u> : critère de différenciation.....12,0 g -<u>Saccharose</u> : critère de différenciation.....12,0 g -<u>Salicine</u> : critère de différenciation.....2,0 g -Citrate de fer III et d'ammonium révélateur d'H₂S.....1,5 g -<u>Sels biliaires</u> : inhibiteur.....9,0 g -<u>Fuchsine acide</u> : inhibiteur.....0,1 g -<u>Bleu de bromothymol</u> : indicateur de pH.....0,065 g -<u>Chlorure de sodium</u> : maintien de la pression osmotique.....5,0 g -Thiosulfate de sodium : précurseur d'H₂S.....5,0 g -<u>Agar</u>.....14,0 g -<u>PH</u> = 7,6 	<ul style="list-style-type: none"> - 75 g de milieu déshydraté. -1L d'eau distillée.
Cétrimide	<ul style="list-style-type: none"> -Peptone de gélatine16 g - Peptone de caséine10 g - <u>Bromure de tétradonium</u> (cétrimide)....0, 2 g - <u>Acide nalidixique</u>.....15 mg 	<ul style="list-style-type: none"> - 45,3 g de milieu déshydraté. -1L d'eau distillée.

	- Sulfate de potassium... 10 g - <u>Chlorure de magnésium</u> 1,4 g - Agar.....10g - PH = 7,1	
Mac Conkey	- <u>Peptone</u> 20,0 g - <u>Sucre</u> 10,0 g - <u>Sels biliaires</u> n° 3 1,5 g - <u>Cristal violet</u> 0,001 g - <u>Rouge neutre</u> 0,05 g - <u>Chlorure de sodium</u> 5,0 g - <u>Agar-agar</u> 15,0 g	- 50 g de milieu déshydraté. - 1L d'eau distillée.
Choromgar d'orientation	/	Prêt à l'emploi

2.2. Le milieu liquide :

Milieu	Composition	Préparation
Bouillon nutritif	- Peptone.....5 g - Extrait de viande.....3g - PH final à 25°C : 6,8 ± 0,2	- 8 g de milieu déshydraté. - 1L d'eau distillée.
Solution physiologique	- Eau distillée. - Chlorure de sodium (NaCl)	- 9 g NaCl - 1 L d'eau distillée.

2.3. L'utilisation de Choromgar d'orientation :

L'utilisation de Choromagar pour l'isolement et la différenciation des agents pathogènes des voies urinaires.

L'objectif majeur de ce milieu est la détection des agents pathogènes des voies urinaires comme *E.coli* (colonies rouges), *Klebsiella* (colonies bleues métalliques), *P.mirabilis* (colonies brunes avec halo), etc.

Toutefois CHROMagar™ Orientation a une application plus large en tant que gélose nutritive pour l'isolement des différents micro-organismes. Par exemple, CHROMagar™ Orientation peut être utilisé pour différencier les divers micro-organismes dans d'autres zones infectées, par exemple dans les cicatrices.

CHROMagar™ Orientation est aussi utile lorsqu'il est complété par divers antibiotiques dans la détection des micro-organismes multi-résistants.

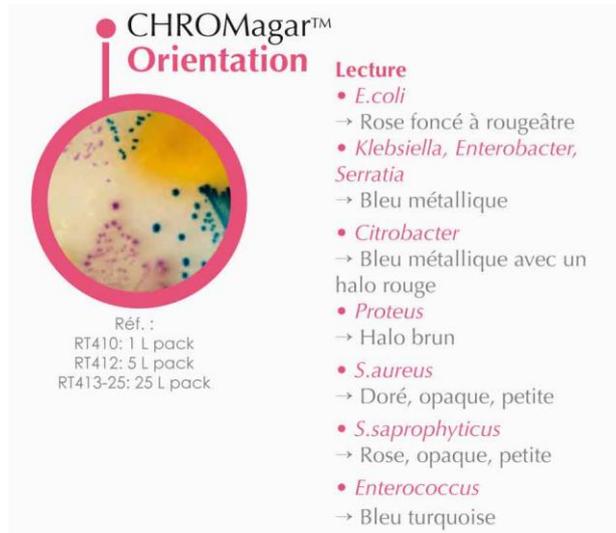


Figure : Guide de Chromagar d'orientation.

3. Examen microscopique par coloration de Gram :

BUT :

Il permet l'étude microscopique des bactéries mortes après fixation et coloration. 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

✎ Matériel nécessaire :

- une lame
- du Violet de Gentiane (ou Violet Cristal sous forme sèche)
- du lugol
- de l'alcool (éthanol à 95°) très peu dilué
- de la Fuschine fraîchement préparée
- de l'eau déminéralisée
- du papier filtre
- microscope photonique : objectif x 40 et x100

✎ Technique :

1. Prélèvement :

- A partir d'un milieu solide : réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile).



Figure : prélèvement d'un colonie bactérienne .

2. Réalisation du frottis:

Étaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.

Le frottis réalisé doit être :

- Mince et homogène, étendu sur la lame sans toucher les bords
- Réalisé sur une lame propre et dégraissée, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.



3. Séchage :

- à la température du laboratoire, si possible
- ou bien à **chaleur douce** : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante. Ne jamais chauffer brutalement.

4. Fixation :

But : tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire adhérer à la lame.

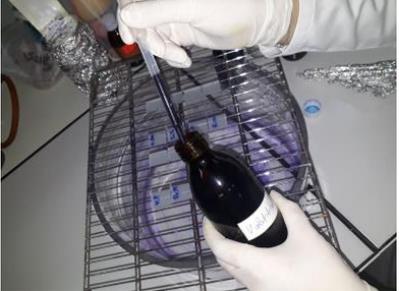
- Fixation par la chaleur :
 - à utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de **cultures bactériennes**
 - passer la lame -frottis situé sur le dessus- dans la flamme chauffante, lentement et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir.

5. Coloration :

Principe :

Cette coloration est une coloration complexe qui permet de différencier les bactéries d'après leur forme et leur affinité pour les colorants.

La coloration permet de distinguer les bactéries Gram + des Gram – grâce à leurs différences de nature de paroi. Les bactéries à Gram négatif ont une paroi plus fine et riche en lipides, alors que les bactéries Gram positifs ont une paroi épaisse et pauvre en lipide.

Étapes	Mode opératoire	Temps	Principe
Coloration primaire	<ul style="list-style-type: none"> - Recouvrir la lame de crystal violet ou violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée et récupérer le crystal violet dans un b�cher (ne pas le jeter dans le bac à coloration) 	1 minute	<p>Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes</p> 
Mordantage	<ul style="list-style-type: none"> - Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distill�e et l'égoutter 	1 minute	<p>Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.</p> 
Décoloration	<ul style="list-style-type: none"> - Tenir la lame inclin�e et faire couler pendant <u>quelques secondes</u> de l'alcool à 95� jusqu'à écoulement incolore. - Rincer immédiatement à l'eau distill�e et égoutter 	5 secondes environ	<p>L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores.</p> <p>Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (�paisse et sans lipides), elles restent color�es en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.</p>
Coloration secondaire	<ul style="list-style-type: none"> - Recouvrir la lame de 	1 minute	<p>La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment d�color�es : les bactéries Gram -</p>

	fuschine - Rincer à l'eau distillée		ou négatif. 
Séchage	- Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher		

6. Mise au point :

- Repérer les bactéries à l'objectif x40.
- Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis
- Faire la mise au point en forte luminosité (condensateur levé et diaphragme ouvert) objectif x100.
- Se placer dans un endroit où la répartition des bactéries est homogène et la coloration nette
- Eliminer les lames dans le bocal déchets non infectieux.

7. Observations :

On peut noter la morphologie des bactéries et la coloration de celles-ci : les bactéries violettes sont dites Gram positives, celles qui sont roses sont dites Gram négatives. On peut également noter l'homogénéité de coloration de la bactérie.

Standard McFarland :

Les normes **McFarland** sont utilisées comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour que le nombre de bactéries se situe dans une gamme de concentrations donnée afin de normaliser les tests microbiens.

Composition :

-Acide sulfurique (H_2SO_4) : 9,95 ml

-Chlorure de barium ($BaCl_2$) : 0,05 ml

Standard McFarland	1% $BaCl_2$ (mL)	1% H_2SO_4 (mL)	Approximatif Bactérien Suspension / ml
0.5	0.05	9.95	1.5×10^8



Figure : Préparation standard de **McFarland** (photo personnelle ,2020).

Procédures :

1. Mélanger la solution de McFarland Standard sur un mélange vortex avant l'examen. Assurez-vous que

McFarland Standard est aliquoté 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.

Contrôle de qualité :

Les normes peuvent être vérifiées à l'aide d'un spectrophotomètre avec un trajet lumineux de 1 cm; un 0,5 McFarland Standard a une lecture d'absorbance de 0,08 à 0,1 à 625 nm.

Le rendement de l'huile essentiel d'*Eucalyptus camaldulensis* :

A	B	C	D	E
Essai	Poid sec	V d'eau	Poid d'HE	R%
1 ^{er}	100 g	650 ml	0,9	0,9
2 ^{ème}	100 g	650 ml	0,951	0,951
3 ^{ème}	100 g	650 ml	0,964	0,964
4 ^{ème}	100 g	650 ml	0,974	0,974
5 ^{ème}	100 g	650 ml	0,998	0,998
Moyenne				0,9574

Figure : Le rendement de l'huile essentiel d'*Eucalyptus camaldulensis*

6.1.Évaluation qualitative de l'activité antibactérienne :

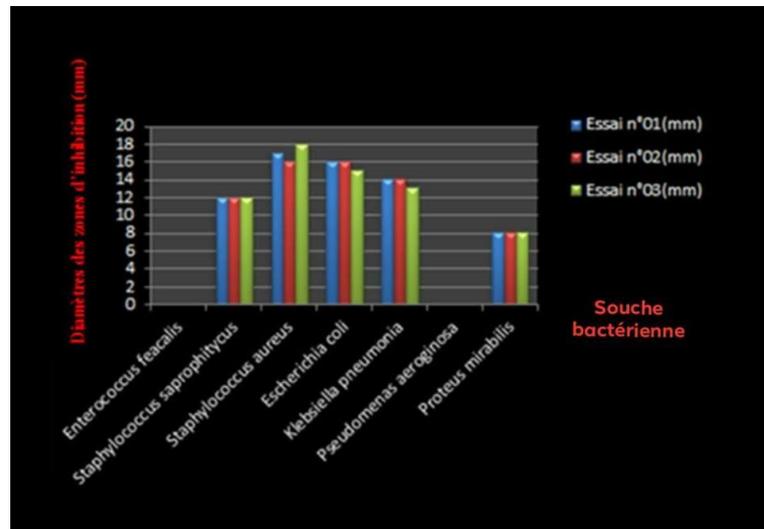


Figure : Histogramme représentatif les valeurs des diamètres moyennes de la zone d'inhibition de trois essais par apport ou souches bactériennes d'huile essentielle pure d'*Eucalyptus camaldulensis*.

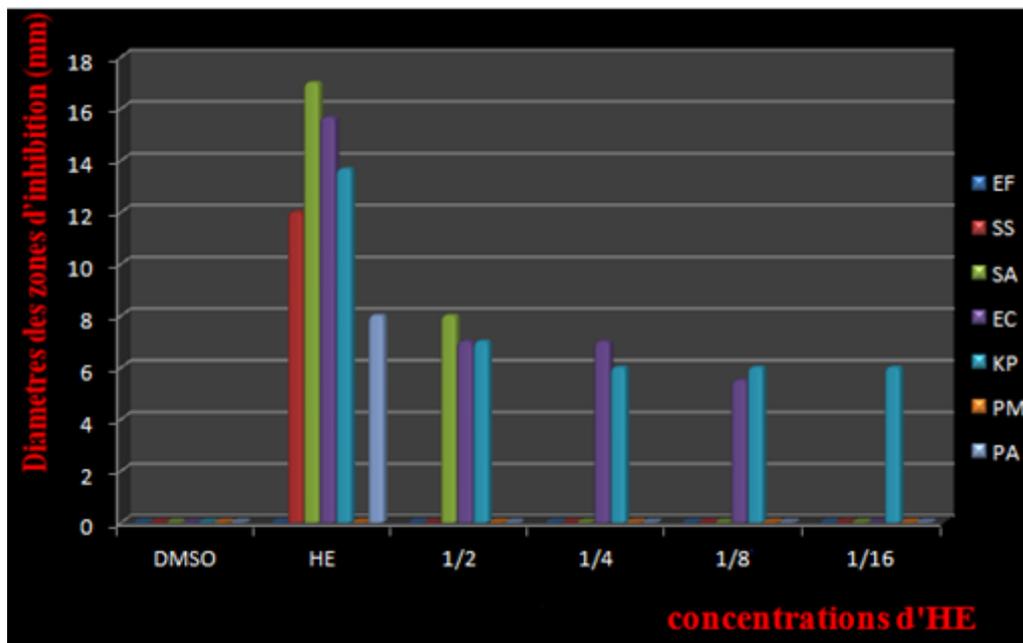
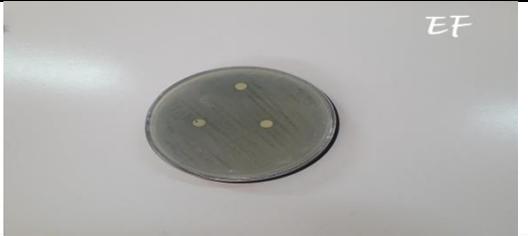
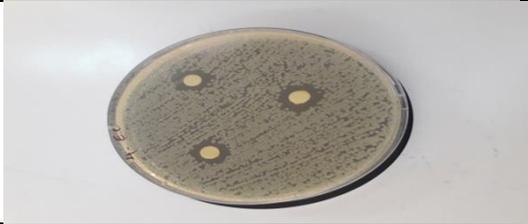
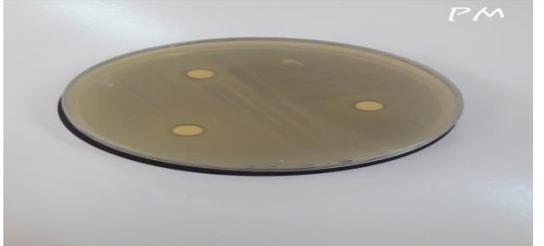


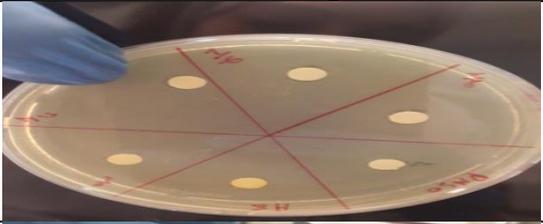
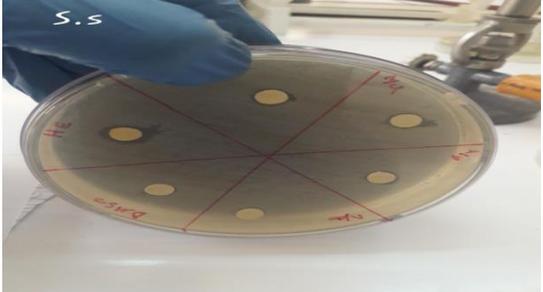
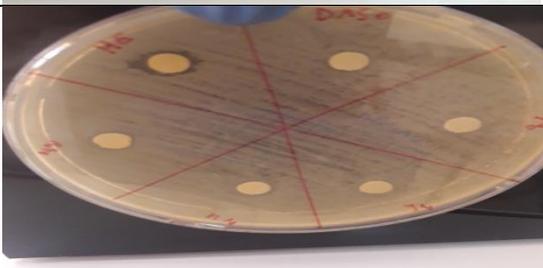
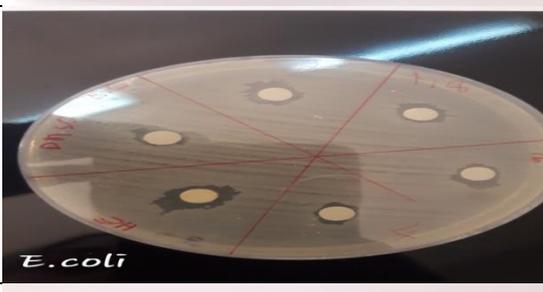
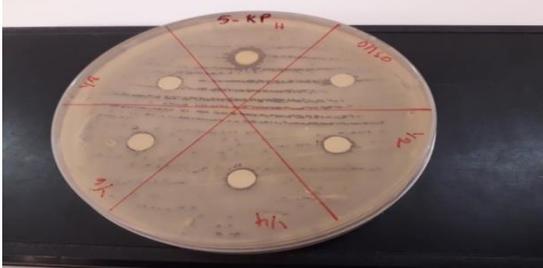
Figure : Histogramme représentatif les valeurs des diamètres moyennes de la zone d'inhibition par apport ou différents concentration de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis*.

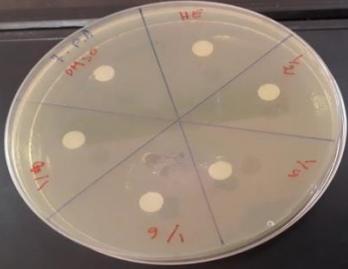
6.2. Les résultats d'activité antibactérienne d'huile essentielle pure d'*Eucalyptus camaldulensis* :

Gram	Souche	Résultats d'aromatogramme
Gram +	<i>Enterococcus Faecalis</i>	
	<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Klebsiella Pneumonia</i>	
	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	

	<i>Proteus mirabilis</i>	
--	--------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

6.3. Les résultats d'activité antibactérienne de différentes dilutions d'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* :

Gram	Souche	Résultats d'aromatogramme
Gram+	<i>Enterococcus Faecalis</i>	
	<i>Staphylococcus Saprophyticus</i>	
	<i>Staphylococcus Aureus</i>	
Gram -	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Klebsiella Pneumonia</i>	

	<p><i>Pseudomonas Aeruginosa</i></p>	
	<p><i>Proteus mirabilis</i></p>	