



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Présenté par

YESSAD Chahira & ZAHAF Nawal

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN BIOLOGIE

Spécialité : Microbiologie Fondamentale

THÈME :

Etude et détermination du pouvoir
antibactérienne des huiles essentielles d'Eucalyptus
vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes

DEVANT LE JURY

Président: BOUZNAD A.

MCB U.MOSTAGANEM

Encadreur : MEKHALDI A.

Pr U. MOSTAGANEM

Examineur : HAMOUM H.

MCB U.MOSTAGANEM

Thème réalisé à l'université d'Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem au laboratoire de
Biochimie & Microbiologie

Année scolaire : 2021/2022



Dédicaces

Je dédie ce modeste travail,
avant tout, à vous mes très
chers parents, je n'oublierais
jamais ce que vous faites pour
moi vous me comblez de
bonheur, Merci d'être là pour
moi.

A mes frères : Abdelkader,
Ahmed et Arbi

A mes sœurs : fathia najdat et
hanan

A mon encadreur Mr.
MIKHALDI Abdelkader . que m'a
dirigé tout au long de cette
recherche, laissez moi vous
témoigner ma profonde
reconnaissance

je dédie ce travail à mon mari
said et sa famille

et le mari de la sœur mouffak

A Tous mes amis : chahra,
Warda, Nadia Aicha et najdat



ZAHAF NAWAL



Dédicace

Je dédie ce modeste travail, avant tout, à vous mes très chères parents, je n'oublierais jamais ce que vous faites pour moi, vous me comblez de bonheur, Merci d'être la pour moi.

A Mes frères

A Mes sœurs surtout Halima et Djamila, qui l'aimaient tant et qui ont été mon soutien pendant mes études et dans ma vie .

A mon encadreur *Mr. MIKHALDI Abdelkader* , que m'a dirigé tout au long de cette recherche, laissez-moi vous témoigner ma profonde reconnaissance.

A ma binôme ma meilleure amie et la personne la plus chère à mon cœur Zahaf Nawal

A tous mes chers amis et tous mes proches que j'aime
Surtout :Nadia, Aicha, Khadidja , Nadjat, Nassima, khaira, Bakhta

A tous ce que j'aurais oublié de citer mais Ils sont toujours présents dans mon coeur.

♥♥ Yessad Chahira ♥♥

Remerciement

Avant tout, nos remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener ce travail à terme.

Nous tenons à remercier profondément tous ceux qui ont participé de près ou de Loin à la réalisation de ce travail et particulièrement :

*Notre encadreur, Mr. **MIKHALDI Abdelkader**, professeur à l'Universitaire de Mostaganem, On lui remercie pour la bienveillance, l'aide, le soutien, les précieux conseils, la patience et la disponibilité permanente qu'il nous a témoignés dans ce travail.*

Nos remerciements aux membres de jury :

*• **Mr. BOUZNAD A** ; MCB à l'Université de Mostaganem qui nous a fait l'honneur de présider ce jury.*

*• **Mr. HAMOUM H** ; MCB à l'Université de Mostaganem, d'avoir accepté d'être l'examineur de notre travail.*

*Nous exprimons, notre profonde gratitude à nos enseignants, sans oublier de remercier toute l'équipe du laboratoire de notre université en particulier **Mme Hafida**, Mr. Djilali ,Mr. Salah ,Mr. Mohamed et Mr. **BATAHAR Mohamed** pour leurs aides .*

On tient à remercier nos très chers parents du plus profond de notre coeur, pour leurs innombrables sacrifices et de nous avoir tant aidé, soutenu, réconforté, cru en nous et encouragé dans les moments de doute. Tous les mots ne suffiraient pas à vous dire combien on vous aime et combien vous comptez pour nous.

En fin nous remercions toutes les personnes qui ont contribué à Différent degrés à la réalisation de cet humble mémoire de fin d'études.

Liste des abréviations

Abs : Absorbance.

AFNOR : l'Association Française de Normalisation.

CM : carrée moyenne.

DO : Densité optique.

DMSO : Diméthylsulfoxyde

g : gramme.

HE : huile essentielle

McF : Mc Farland.

MH : Muller Hinton.

MHA : Muller Hinton Agar.

MHE: masse de l'huile essentielle

ml : millilitre.

mm : millimètre.

R : répétition.

R% : Rendement en pourcentage %.

T : Témoin.

TR : Temps de rétention.

μ l : microlitre.

Liste des figures

Figure 1 : Arbre d'*Eucalyptus globulus*

Figure 2 : Utilisation et propriétés thérapeutiques de l'HE d'*E. globulus*

Figure 3 : Structures chimiques des composants majoritaires de l'HE d'*E. globulus*

Figure 4 : Aspects des colonies d'*E. coli* sur différents milieux de culture

Figure 5 : Aspect de *S. aureus* en microscopie électronique (X 20000)

Figure 6: Arbre et feuilles d'*Eucalyptus globulus*

Figure 7 : Montage de l'extraction par hydro distillation

Figure 8 : Le coulage des boîtes avec la gélose **MH**

Figure 9 : Les étapes de la standardisation de la suspension bactérienne à 0.5 Mc

Ferland et leur étalement sur les boîtes gélosées de **MH**

Figure 10 : les étapes de la dilution des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et leur dépôt sur les disques

Figure 11 : Coloration de gram de *E. coli*

Figure 12 : Coloration de gram de *Staphylococcus aureus*

Figure 13 : Résultats de l'aromatogramme d'*E. coli*

Figure 14 : Résultats de l'aromatogramme de *Staphylococcus aureus*

Liste de tableaux

Tableau 1 : Classification botanique d'*Eucalyptus globulus*.

Tableau 2 : Les dilutions de l'huile essentielle dans le DMSO.

Tableau 3 : Quantités d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* extraites par Hydrodistillation.

Tableau 4 : Résultats de l'aromatogramme exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition (mm).

Résumé

L'utilisation abusive des antibiotiques est le facteur majeur qui contribue à l'apparition de différents types des bactéries antibiorésistantes. L'émergence et la diffusion croissante de ces dernières remettent en question l'efficacité de ces traitements tant chez l'homme que chez l'animal, en conséquence, nous proposons dans cette étude d'autres alternatives thérapeutiques.

L'extraction de l'huile essentielle de 1000g d'*Eucalyptus globulus* par la méthode d'hydrodistillation, a fourni un rendement de 0,46%. La détermination de l'activité antimicrobienne *in vitro* des huiles essentielles est réalisée par un aromatogramme en suivant la méthode de diffusion sur gélose. Des résultats satisfaisants vis-à-vis des agents pathogènes cliniques expérimentés ont été obtenus, les diamètres des zones d'inhibition ont été de l'ordre de 12 et 19,5 mm pour *E. coli* et *Staphylococcus aureus* respectivement. L'effet inhibiteur de ces huiles essentielles est proportionnel aux concentrations testées, les bactéries à Gram négatif semblent être plus sensibles que les bactéries à Gram positif.

Ainsi, cette étude permet de conclure que l'huile d'*Eucalyptus globulus* possède une importante activité antibactérienne.

Mots clés : Huiles essentielles ; *Eucalyptus globulus* ; Activité antibactérienne ; aromatogramme

Abstract

The overuse of antibiotics is the major factor contributing to the appearance of different types of antibiotic-resistant bacteria. The emergence and increasing diffusion of these bacteria call into question the efficiency of these treatments in both humans and animals. Consequently, in this study we propose other therapeutic alternatives.

Extraction of 1000g of *Eucalyptus globulus* essential oil by the hydrodistillation method yielded 0.46%. The *in vitro* antimicrobial activity of essential oils is determined by an aromatogram using the agar diffusion method. Satisfactory results were obtained with regard to the clinical pathogens tested, the diameters of the inhibition zones were in the order of 12 and 19.5 mm respectively for *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. The inhibitory effect of these essential oils is proportional to the concentrations tested, gram negative bacteria appear to be more sensitive than Gram-positive bacteria.

Thus, this study makes it possible to conclude that *Eucalyptus globulus* oil has an important antibacterial activity.

Keywords: Essential oils; *Eucalyptus globulus*; Antibacterial activity; aromatogram

Table des Matières

Dédicaces	
Remerciements	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Abstract	
Table de matières	
Introduction.....	1
I.1 Plantes aromatiques et médicinales :	2
I.2 Description Botanique d' <i>Eucalyptus globulus</i>	2
I.3. Origine et distribution d' <i>Eucalyptus</i>	3
I.4. Classification botanique d' <i>Eucalyptus</i>	3
I.5 Utilisation et propriétés thérapeutiques	3
I.6 Composition	4
I.7 Synonyme et Nomenclature	5
II.1. Définition des huiles essentielles	6
II.2. Localisation et rôle des huiles essentielles chez végétaux	6
II.3 Propriétés physico-chimique des huiles essentielles	6
II.3.1 Propriétés physiques	6
II.3.2 Propriétés chimiques	7
II.4. Conservation des huiles essentielles	7
II.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	8
II.6. Les trois grands groupes des métabolites secondaires	8
II.6.1. Les composés phénoliques ou polyphénols	8
II.6. 1.1. Acides phénoliques	9
II.6. 1.2. Flavonoïdes	9
II.6.1.3. Acides coumariques	9
II.6.1.4. Les Stilibènes	9
II.6.1.5. Lignines et lignanes	10
II.6.1.5.1. La lignine	10

II.6.1.5.2. Les lignanes	10
II.6.1.6. Tanins	10
III. Matériel et Méthodes	11
III. 1. Matériel végétal	11
III. 1.1. Récolte	11
III.2 Méthodes	12
III.2.1 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation	12
III.2.2 Procédés d'étude microbiologique	13
III.2.2.1 Etude microscopique	13
III.2.2.2 Préparation de l'inoculum :	13
III.2.2.3 Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antibactériens	13
III.2.2.4 Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles	13
III.2.2.4.1 Technique d'Aromatogramme	13
III.2.2.4.2 Inoculation des géloses	15
IV.1 Huiles essentielles	18
IV.1.1. Rendement des huiles essentielles	18
IV.1.2 Examen microscopique	19
IV.1.2.1 Coloration de gram	19
IV.1.3 Activité antimicrobienne (Aromatogramme)	19
Conclusion générale	23
Références bibliographiques	23

Chapitre I :

Présentation de la plante étudiée

Introduction :

Les plantes aromatiques et médicinales représentent une source inépuisable de remèdes traditionnels et efficaces grâce aux principes actifs qu'elles contiennent :

Alcaloïdes, flavonoïdes, hétérosides, saponosides, quinones, vitamines,...et huiles essentielles (Lafon et Tharaud, 1991)

La plupart de ces plantes sont bien connues et traditionnellement utilisées dans le monde entier. En effet, les huiles essentielles, principes actifs issus du métabolisme secondaire des plantes médicinales, ont été utilisées depuis l'antiquité et sont largement employées de nos jours, pour leur propriétés biologique (antimicrobienne, antioxydant, analgésique, anti-inflammatoire, anti-cancérigène, antiparasitaire, anti-insecticide), (Bakkali *et al*, 2008 ; Teles Andrade et Barbosa, 2014) ... et leurs applications dans de multiples et diverses industries : alimentation, cosmétique, parfumerie et pharmacie (El Abed et Kambouche, 2003 ; DaCruz-Cabral , 2013)

Le développement de nouveaux agents thérapeutiques s'avère indispensable pour lutter contre les phénomènes d'oxydations et de la résistance microbienne. Dans ce but l'investigation des plantes représente un potentiel inestimable pour la découverte de nouvelles substances à caractère antimicrobien et antioxydant (Kanko *et al*, 2004)

Parmi les plantes aromatiques, *Eucalyptus globulus*. Utilisations (pharmaceutique, etc.). Une recherche dans la littérature scientifique indique qu'il y a peu de rapports d'études sur les caractérisations physico-chimiques et les propriétés biologiques de l'huile essentielles.

Notre travail est réparti en deux parties :

- ✓ La première partie est relative à l'étude bibliographique des plantes ; des huiles essentielles .
- ✓ La deuxième partie représente la partie expérimentale où nous présenterons les techniques utilisées :
 - Extraction des huiles essentielles des *Eucalyptus globulus* par l'hydrodistillation.
 - Le deuxième axe consiste à déterminer l'effet antibactérien des huiles essentielles

I.1 Plantes aromatiques et médicinales :

Les plantes aromatiques et médicinales peuvent être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique et agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes ou encore pouvant être utilisées comme source d'isolats pour les hémisynthèses. Ces plantes aromatiques sont, donc, à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines ... etc) qui se présentent presque toujours comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation (Fadi, 2011)

L'eucalyptus et le laurier comme toutes les plantes qui auraient une activité pharmacologique pouvant conduire à des emplois thérapeutiques, cela grâce à la présence d'un certain nombre de substances actives dont la plus part agissent sur l'organisme humain

I.2 Description Botanique d'*Eucalyptus globulus*

Eucalyptus globulus est un arbre aromatique de 30 à 100m de haut et plus de 1.5m de diamètre (fig. 1), les feuilles jeunes sont opposées, ovales, luisantes et pendantes sur les jeunes rameaux (Deyson, 1978 ; Boullard, 2001). Les feuilles adultes sont alternes, falciformes, épaisses et coriaces, lancéolées et aiguës, de couleur vert foncé (Bruneton, 1987) les boutons floraux sont blancs.



Figure 1 : Arbre d'*Eucalyptus globulus* (Chibah et Djouaher, 2018)

Il s'épanouit au printemps et possède un calice, en forme de pyramide quadrangulaire, coiffé par un couvercle formé par la corolle qui se soulève à la floraison, laissant apparaître plusieurs étamines qui se détachent à maturité (Wicht et Anton , 2003) .

Les fleurs sont blanches solitaires ou groupées par 2 ou 3, elles possèdent 4 sépales rugueux et cireux, soudés en urne, les fleurs sont bisexuées et régulières. Le fruit est une capsule loculicide et anguleuse renfermant plusieurs graines. Les graines sont exalbuminées à ovules anatropes ((Bruneton, 2002 ; Bosse, 2005).

I.3 Origine et distribution d'*Eucalyptus*

Les *Eucalyptus* sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur, poussant principalement, en Australie, en Amérique tropicale, Région méditerranéenne, l'Afrique subsaharienne, Madagascar, Régions tropicales et tempérées d'Asie, et les îles du Pacifique, notamment de la province de Tasmanie ; *Eucalyptus* fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du Bassin méditerranéen. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, *Eucalyptus* assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom d'« arbre à la fièvre » ou Australien fever tree (Gao *et al.*, 1999).

I.4 Classification botanique d'*Eucalyptus*

Ce classement se réfère à la classification botanique antérieure (Cronquist, 1981) :

Règne : Plantea

Sous Règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Ordre : Rosidae

Famille : Myrtacées

Genre : *Eucalyptus*

Espèce : *Globulus*

I.5 Utilisation et propriétés thérapeutiques

Les huiles essentielles (HS) d'*Eucalyptus* étaient utilisées depuis l'antiquité comme remède, principalement pour lutter contre les maladies respiratoires. Elles sont dotées de nombreuses propriétés thérapeutiques (fig. 2) : antipyrétique, antiseptique, astringente et hémostatique, antiparasitaire, antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et antitumorales (Boukhatem *et al.*, 2017 ; Salehi *et al.*, 2019). De même, elles peuvent être employées dans la conservation d'aliments ou comme bioinsecticide contre les moustiques et les mouches domestiques (Koziol, 2015). En cas de brûlures ou blessures, elles peuvent

accélérer le temps de cicatrisation, aident à renfermer les plaies et peuvent également calmer les douleurs musculaires et rhumatismales (Koziol, 2015). Elles sont utilisées aussi, comme désinfectant atmosphérique au niveau des hôpitaux pour combattre les maladies nosocomiales et les contaminations à transmission aérienne (Boukhatem *et al.*, 2017). Dans les troubles respiratoires et bronchiques, lorsque l'HE atteint les poumons, elles excitent les cellules sécrétrices pulmonaires, éliminent l'irritation au niveau des zones réflexogènes, soulagent la toux et agissent comme expectorant et mucolytique (Wichtl et Anton, 2003).



Figure 2 : Utilisation et propriétés thérapeutiques des huiles essentielles d'*E. globulus*
https://target.scene7.com/is/image/Target/GUEST_4f756e02-72f5-4422-90f3-75353c05baf3?wid=488&hei=488&fmt=pjpeg modifié

1.5.2 Composition

La composition chimique des huiles essentielles d'*E. globulus* varie en fonction de différents facteurs biotiques et abiotiques. Or, certains constituants restent quasiment toujours présents, mais à des taux variables. Les constituants majoritaires les plus caractéristiques sont : Le 1,8-cinéole ou Eucalyptol (1), α -pinène (2), β -pinène (3), aromadendrène (4), globulol (5), p-cymène (6), α -terpinéol (7) et parfois le limonène (8) (Curir *et al.*, 1995 ; Goldbeck *et al.*, 2014 ; Luís *et al.*, 2015 ; Boukhatem *et al.*, 2017). Leurs structures chimiques sont montrées dans la figure (3), ci-dessous :

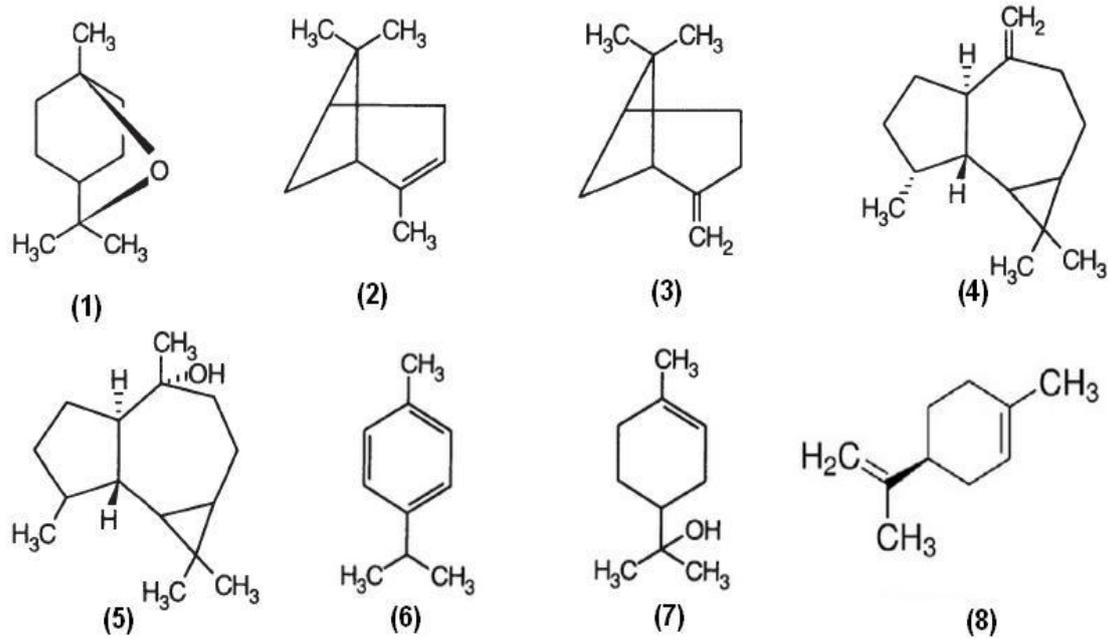


Figure 3 : Structure chimique des composants majoritaires de l'HE d'*E. globulus* (Boukhatem *et al.*, 2017)

I.6 Synonyme et Nomenclature

- Synonymes: *Gommier bleu*, *Eucalyptus globuleux*, *Arbre de fièvre*, *Eucalyptus officinal*.
- Nomenclature: en français, il est appelé par plusieurs noms qui sont : *Eucalyptus*, *Arbre de la fièvre*, *Gommier bleu*, en anglais: *Blue gumtree* et en arabe: *Kalitus*, *Kalatus* (Goetz et Ghadira, 2012). On mention spécialement les noms vernaculaires dans notre pays l'Algérie : *Calitouss* « le nom le plus connue en Algérie », *Calibtus*, *Kafor*. Ces noms sont les plus populaires en Algérie qui sont appelés dans plusieurs différentes régions (Daroui-Mokaddem, 2012).
- Etymologie: *globulus* fait référence à la forme de l'opercule du fruit (Pauline, 2019).

Chapitre II :
Généralités sur les huiles
essentiels

II.1. Définition des huiles essentielles

Le nom «huile essentielle» a été conçu empiriquement. Le terme «huile» souligne le caractère visqueux et hydrophobe de ces substances. Cependant, le terme «essentielle» fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante (Bernard *et al.*, 1988 ; Teuscher *et al.*, 2005).

Les huiles essentielles sont des substances huileuses mais sans corps gras, souvent liquides, volatiles, d'odeur et de saveur généralement forte et souvent colorées. Elles sont extraites à partir des différentes parties de certaines plantes aromatiques par les méthodes de distillation ou par d'autres méthodes (Valnet, 1984, Wichtel and Anton, 1999).

II.2. Localisation et rôle des huiles essentielles chez végétaux :

La teneur des plantes en huiles essentielles est généralement faible, de l'ordre de 1% (Guignard, 1995).

Les huiles essentielles sont largement répandues chez les végétaux supérieurs. Elles peuvent être stockées dans tous les organes, les sommités fleuries, les feuilles, les rhizomes, les fruits, les écorces et les graines (Houel, 2011).

Les plantes aromatiques produisent des huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle exact dans les processus de la vie de la plante reste inconnu (Rai *et al.*, 2003).

Certains auteurs pensent que la plante utilise l'huile pour repousser ou attirer les insectes, dans ce dernier cas, pour favoriser la pollinisation. D'autres considèrent l'huile comme source énergétique, facilitant certaines réactions chimiques, conservent l'humidité des plantes dans les climats désertiques (Belaiche, 1979). Certaines huiles essentielles servent à la défense des plantes contre les herbivores, insectes et micro-organismes (Capo and Courilleeau, 1990).

II.3 Propriétés physico-chimique des huiles essentielles :

II.3.1 Propriétés physiques :

Les huiles essentielles forment un groupe homogène des propriétés physiques que nous résumerons en :

- Liquides à température ambiante. À basse température certaines **H.E** se solidifient.
- De consistance huileuse mais non grasse.

- Volatiles (contrairement aux huiles fixes et odorantes). Leur volatilité augmente avec La chaleur.
- Densité inférieure à celle de l'eau sauf celle de cannelles, sassafras, girofle.
- Rarement colorées.
- Solubles dans l'alcool jusqu'à concurrence de 5%, les solvants organiques apolaires, les corps gras.
- Insoluble dans l'eau (Ayad *et al.*, 2004).

II.3.2 Propriétés chimiques :

On détermine essentiellement l'indice d'acide, d'ester, de carbonyle (aldéhyde) , ainsi que le dosage de quelques majoritaires de huiles essentielles, ajouter à ces caractéristiques, l'examen olfactif qui est très important.

Néanmoins la détermination de ces indices physico-chimiques est généralement insuffisante pour une étude analytique approfondie des huiles essentielles pour cela, le recours aux techniques plus puissantes et fréquentes telle la chromatographie en phase gazeuse et liquide, la résonance magnétique nucléaire et des couplages du genre C.G/S.M semblent être nécessaires (Ruasmadiedo *et al.*, 2002).

II.4. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles doivent être conservées correctement pour préserver leur qualité. Avec le temps, elles s'oxydent, ce phénomène étant amplifié par la chaleur, l'air, la lumière...etc., Il faut les conserver dans un endroit frais, à l'abri de la lumière, dans du verre brun ou de l'aluminium vitrifié. Une essence bien distillée se conserve trois ans au moins (Benbouli, 2005).

II.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles :

Différentes méthodes sont mises en oeuvre pour l'extraction des essences végétales, cette diversité est due à la variété des matières et à la sensibilité considérable de leurs certains constituants. Le choix de méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire et de l'usage de l'extrait.

Les principales méthodes d'extraction sont :

- Hydro-distillation
- L'Entrainement a la vapeur d'eau
- L'hydro-diffusion
- L'expression à froid
- Extraction par solvants
- Extraction par les fluides supercritiques
- Extraction par micro- ondes
- Extraction par Macération (enfleurage à chaud)
- Extraction par Enfleurage

II.6. Les trois grands groupes des métabolites secondaires

II.6.1. Les composés phénoliques ou polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes le plus représenté et largement distribué dans le monde végétal avec plus de 8000 structures phénoliques. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction: éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2015 ; Šaponjac et al, 2016).

Il existe différentes classes de polyphénols, on y trouve les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbénoides , les acides coumariques et les tanins.

II.6. 1.1. Acides phénoliques

Un acide-phénol (ou acide phénolique) est un composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique (Ignat *et al*, 2011). Ils appartiennent au groupe des métabolites secondaires.

II.6. 1.2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, dont plus de 9000 structures naturelles ont été isolées et caractérisées (Harbone, 1993) sont des molécules connues pour leurs multiples activités biologiques. Ils sont généralement hydrosolubles, on les trouve généralement dans les plantes sous forme glycosilées.

Les flavonoïdes peuvent-être subdivisés en différents sous-groupes en fonction du carbone de l'anneau C sur lequel est fixé l'anneau B et du degré d'insaturation et d'oxydation de l'anneau C (Saidi, 2019), Les différentes classes dans le groupe se distinguent par des anneaux hétérocycliques contenant de l'oxygène et des groupes hydroxyles. Il s'agit notamment des chalcones, des flavones, des flavonols, des flavanones, des anthocyanines et des isoflavones (Williams et Grayer, 2004).

II.6.1.3. Acides coumariques

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Elles ont fréquemment un rôle écologique ou biologique et se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combinées avec des sucres et elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (Cowan, 1999).

II.6.1.4. Les Stilbènes

Sont des composés phénoliques issus du métabolisme secondaire des végétaux, présentent une structure de type C6-C2-C6 : deux cycles benzéniques reliés par un pont éthylène (Jean-Denis, 2005) et ce sont des phytoalexines, composés produits par les plantes en réponse à l'attaque par les microbes pathogènes fongiques, bactériens et viraux (Crozier *et al*, 2006). Ces composés existent sous deux formes, la forme Cis (obtenue sous action de la chaleur) et la forme Transe (forme stable et bioactive) (Mérillon *et al*, 1997). Ils se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine (Bruneton, 2009 ; Chanforan, 2010). Ces composés sont présents dans de nombreuses familles de plantes supérieures mais les principales sources alimentaires sont le raisin (Sun *et al*, 2006).

II.6.1.5. Lignines et lignanes

II.6.1.5.1. La lignine

La lignine est localisée dans les parois cellulaires et plus spécialement dans les parois secondaires des éléments conducteurs, contribuant à la résistance mécanique et à la rigidité des tiges lignifiées, Malgré son abondance (elle n'est dépassée que par celle de la cellulose), sa structure n'est pas bien comprise. La lignine est un très grand polymère, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est donc impossible de l'extraire sans lui faire subir d'importantes dégradations. De plus les trois monomères de bases peuvent s'assembler de multiples façon formant une structure tridimensionnelle très ramifiée (Hopkins, 2003). Une structure précise pour la lignine n'est pas encore connue, mais sûrement elle est très complexe (Buchanan *et al*, 2000).

II.6.1.5.2. Les lignanes

Sont des composés dont la formation implique la condensation d'unités phénylpropaniques (C6-C3). Leur distribution botanique est large, plusieurs centaines de composés ont été isolés dans environ soixante-dix familles. Ils sont formés par dimérisation de trois types d'alcools : alcool p-coumarique, alcool coniférique et alcool sinapique, par des réactions de couplage radicalaire (Bruneton, 2009). Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques, on les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (Peterson *et al*, 2010).

II.6.1.6. Tanins

Les tanins sont des oligomères hydrosolubles, riches en groupes phénoliques, capables de se lier ou de précipiter des protéines solubles dans l'eau (Hagerman and Butler, 1989). Les tanins, communs aux plantes vasculaires, existent principalement dans les tissus ligneux, mais peuvent également être dans les feuilles, les fleurs ou les graines, Ils sont très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones (Konig *et al*, 1994) et ils sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons, dans l'alimentation humaine.

Chapitre III :

Matériel & méthodes

III. Matériel et Méthodes

Notre travail de recherche a été réalisé au sein du laboratoire de Biochimie et Microbiologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Algérie.

III. 1. Matériel végétal

III. 1.1. Récolte

Les feuilles de la plante *Eucalyptus globulus* ont été récoltées durant le mois de Mai 2022 de la région de « Achàacha » située à l'Est de la Wilaya de Mostaganem. Après avoir nettoyées et lavées, les feuilles ont été amenées au laboratoire pour l'extraction de leurs huiles essentielles.



Figure 7: Feuilles d'*Eucalyptus globulus*

Les huiles essentielles possèdent des activités antibactériennes importantes et peuvent se substituer avec succès aux antibiotiques qui montrent leurs inefficacités à l'encontre des microorganismes résistants. Ce qui nous a conduits à évaluer scientifiquement, l'activité antimicrobienne de la plante *Eucalyptus globulus* pour prouver leur efficacité contre des bactéries multi-résistantes.

III.2 Méthodes :

III.2.1 Extraction des huiles essentielles par hydrodistillation :

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des essences végétaux. En général le choix de la méthode d'extraction dépendra de la nature du matériel végétal à traiter ; la distillation reste la méthode la plus utilisée pour l'extraction des composés aromatiques très volatils qui sont facilement analysables par chromatographie en phase gazeuse (Bendjilali, 2004).

Plusieurs paramètres tels que l'état et la quantité du matériel végétal, la nature du solvant et la quantité d'eau utilisée, la durée de l'extraction, influent sur le rendement. Il a été vérifié que le rendement diminue fortement d'une part, quand la charge du matériel végétal augmente, et d'autre part, quand une quantité d'eau trop importante est utilisée (Boutedjiret, 1990).

Selon les recommandations de (Bagard, 2008), le principe de l'hydro-distillation est le suivant :

La substance contenant l'espèce volatile à extraire est mélangée avec de l'eau et l'ensemble est porté à l'ébullition.

La phase gazeuse, contenant l'espèce volatile et la vapeur d'eau, arrive en haut de la colonne de distillation, passe dans le réfrigérant pour se condenser et donner le distillat qui comporte deux phases liquides séparables par décantation (Fig. 8).

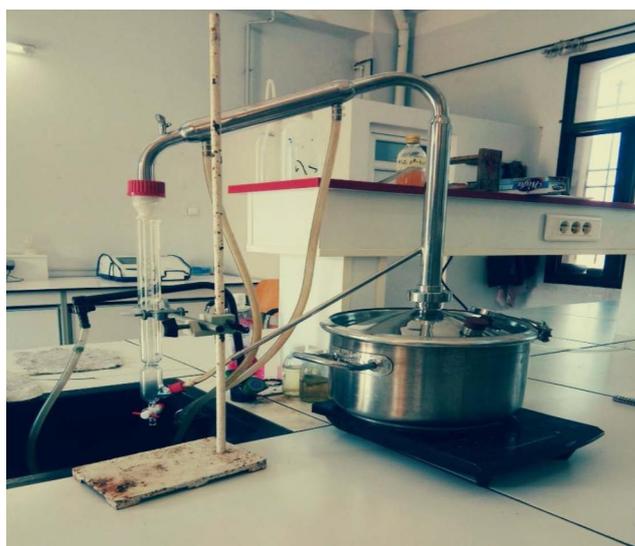


Figure 8 : Montage de l'extraction par hydro distillation

La distillation a été réalisée par ébullition de 1000g de matériel végétal pendant 2 h avec 2000 ml d'eau distillée jusqu'à l'apparition de la première goutte de distillat à la sortie du tube de condensation de la vapeur (Duru *et al.*, 2003). La vapeur d'eau et les molécules aromatiques condensées ont été récupérées dans une ampoule à décantée dans laquelle la décantation a été effectuée. L'huile essentielle obtenue a été stockée à l'obscurité à 4 °C dans un flacon en verre opaque.

III.2.2 Procédés d'étude microbiologique :

Nous avons testé la sensibilité de deux souches bactériennes : *Escherichia coli* (Gram+) et *Staphylococcus aureus* (Gram-)

III.2.2.1 Etude microscopique :

L'examen microscopique, permet d'étudier la morphologie des cellules bactérienne et leur mode d'association afin de les classer (Joffin et Leyral, 1996). Il inclut l'observation à l'état frais (examen entre lame et lamelle des bactéries vivantes) et l'observation après coloration, le plus souvent sur frottis sèches et fixes (coloration de gram). (Annexe 1).

La coloration de gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne pour distinguer et classifier les bactéries à gram positif (+) et les bactéries à gram négatif (-), non seulement d'après leur forme, mais aussi selon leur affinité pour les colorants, liée à la structure de leur paroi (Brelière *et al.*, 2009).

III.2.2.2 Préparation de l'inoculum :

La suspension est préparée à partir d'une culture jeune sur gélose nutritive de 18 à 24 heures, où quelques colonies des souches cibles ont été prélevées, diluées dans un tube à essai contenant 10 ml de bouillon nutritif stérile, puis bien homogénéisées par la suite à l'aide de vortex.

Après 18 à 24 heures, la suspension bactérienne préparée et bien homogénéisée a été par la suite standardisée à 0.5 Mc Farland (McF), soit une D.O de 0,08 à 0,10 lue à une longueur d'onde de 625 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV (JENWAY 670). Le spectrophotomètre permet d'ajuster l'inoculum. L'appareil doit être calibré contre un étalon d'échelle de McF.

III.2.2.3 Etude de la sensibilité des souches vis-à-vis des agents antibactériens :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été déterminée par la méthode de diffusion en gélose (Hazzit *et al.*, 2009). On prépare des boîtes de pétri (90 mm de

diamètre) en versant 20 ml de milieu Agar Mueller Hinton (MHA) et on laisse solidifier et sécher pendant 30 minutes.

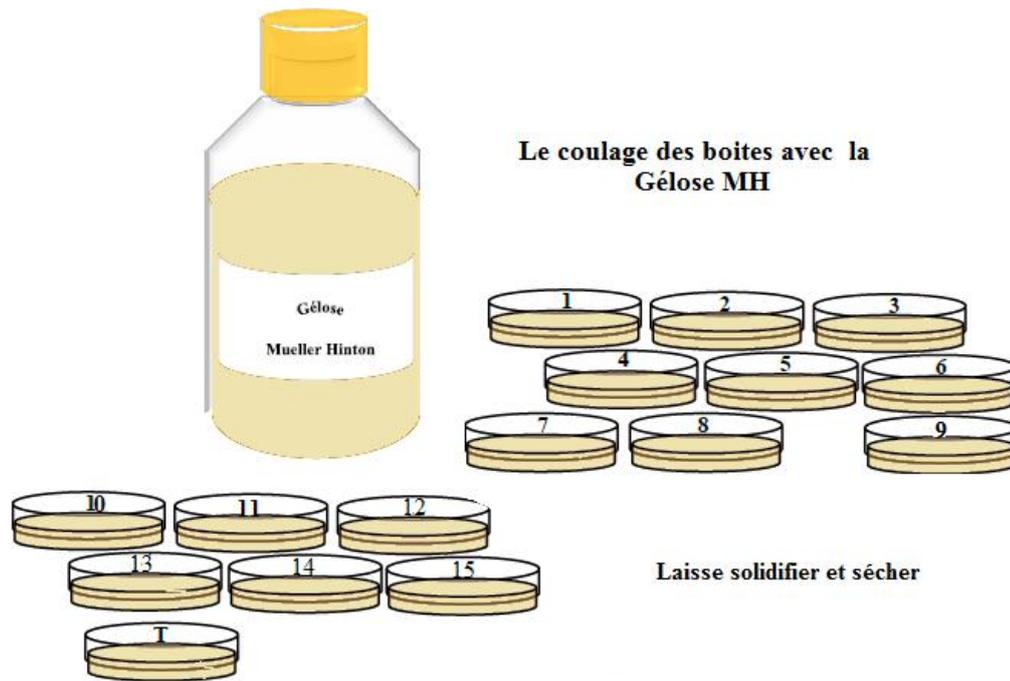


Figure 9 : Le coulage des boites avec la gélose MH.

III.2.2.4 Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

III.2.2.4.1 Technique d'Aromatogramme :

L'aromatogramme est un test de laboratoire qui permet aux phytothérapeutes d'analyser *in vitro* l'activité antibactérienne des huiles essentielles et de sélectionner plus précisément ceux qui sont capables de supprimer ou de détruire les germes pathogènes (Damian, 1995).

Il existe différents types d'aromatogrammes tout dépend des milieux utilisés : solides ou bien liquides. Alors que, dans la pratique quotidienne, le milieu solide est le plus simple et le plus facilement reproductible (Pibiri, 2005).

Entre-temps, la densité des suspensions bactériennes a été ajustée avec le bouillon nutritif stérile en utilisant un spectrophotomètre UV (Jenway 670) pour atteindre la concentration finale de 10^6 UFC/ml (Mohapatra *et al*, 2011). Un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement et étendu uniformément sur la gélose (MH) et laisser sécher pendant 5 min (Fig.10).

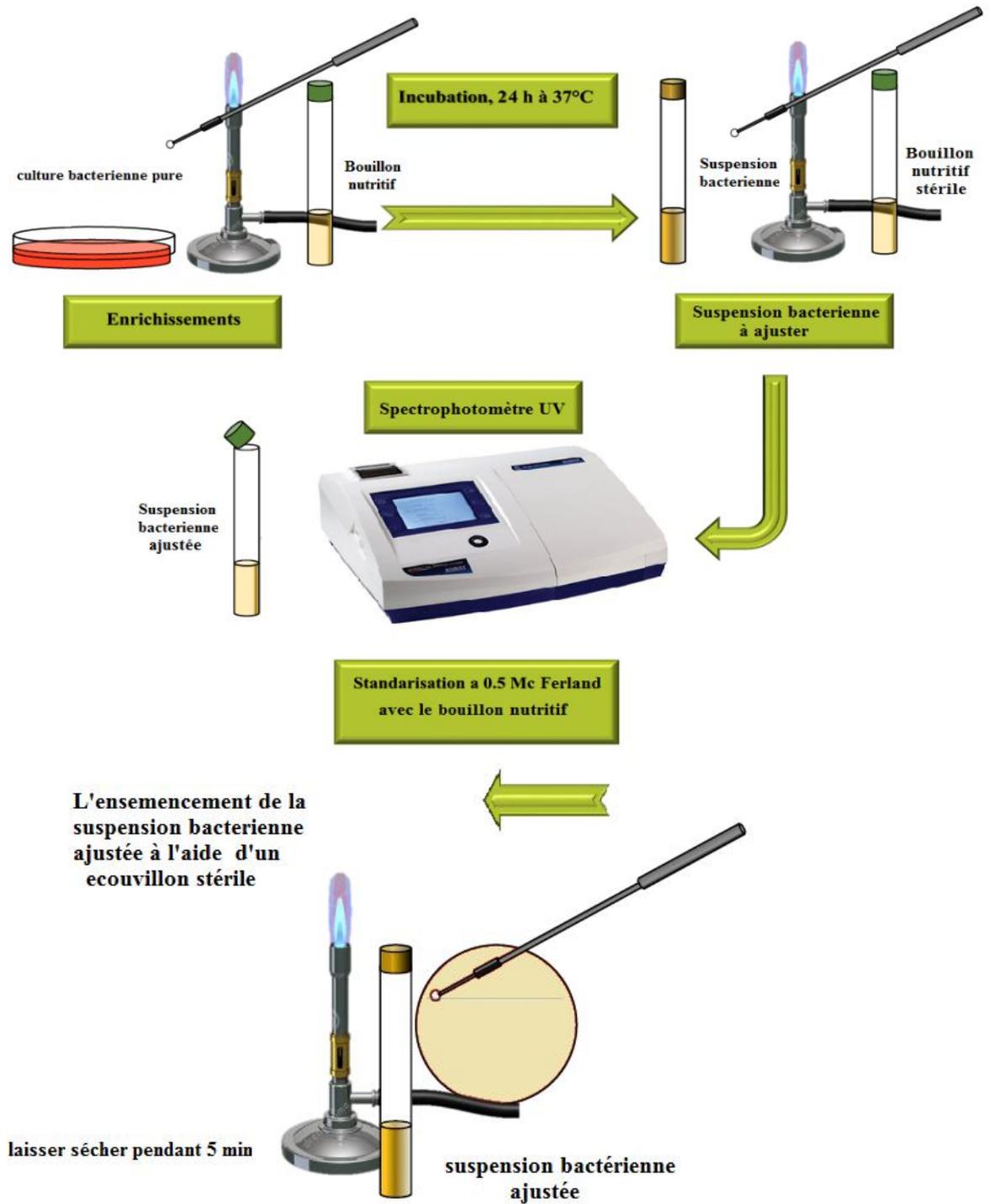


Figure 10 : Les étapes de la standardisation de la suspension bactérienne à 0.5 Mc Ferland et leur étalement sur les boîtes gélosées de MH.

III.2.2.4.2 Inoculation des géloses :

L'inoculum bactérien doit être idéalement employé dans les 15 min qui suivent sa préparation.

L'ensemencement des boîtes de pétri est réalisé à l'aide d'un écouvillon en coton stérile, un volume de suspension microbienne standardisée a été ensemencé par étalement sur un milieu de culture gélosé approprié (Mueller Hinton), tout en éliminant l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes.

L'écouvillonnage doit être effectué sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions. Cette étape est suivie par un séchage qui peut durer entre 10 à 15 min à température ambiante (Denis *et al.*, 2011).

L'huile essentielle est diluée avec le DMSO afin de disperser les composés et d'améliorer leur contact avec les microorganismes testés. Les dilutions préparées sont mentionnées dans le (Tab. 4).

Tableau 4 : Les dilutions de l'huile essentielle dans le DMSO

La concentration	quantité de HE	quantité de DMSO	Volume finale
100%	2ml	0ml	2ml
75%	1,5ml	0,5ml	2ml
50%	1ml	1ml	2ml
05%	0,1ml	1,9ml	2ml
0%	0ml	2ml	2ml

Des disques de papier Wattman stériles de 6 mm de diamètre sont déposés sur la surface des boîtes pétri qui sont préalablement coulé et inoculé avec les bactéries testées, ensuite ces disques ont été imprégnés avec 5µl d'huile essentielle de déférente concentration à l'aide d'une micropipette, sachant que la concentration exprimée avec 0 % est le contrôle négatif qui a été effectué par le dépôt de 5µl de DMSO comme boîte témoin (Annexe 3). Les boîtes sont ensuite fermées et laissées diffuser pendant 15 min à température ambiante puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Chaque essai a été réalisé en trois répétitions. Comme il est mentionné à la (Fig. 11)

Le diamètre des halos qui apparaissent autour des disques traduisant l'activité antimicrobienne a été mesuré à l'aide d'une règle. La sensibilité des bactéries testées à l'huile essentielle est classée selon les diamètres d'inhibition : bactéries résistantes ($\emptyset < 8$ mm), bactéries sensibles ($9 \text{ mm} < \emptyset < 14$ mm), bactéries très sensibles ($15 \text{ mm} < \emptyset < 19$ mm)

Chapitre IV :

Résultats & Discussion

IV.1 Huiles essentielles

IV.1.1. Rendement des huiles essentielles :

Les rendements moyens en huiles essentielles des parties aériennes d'*Eucalyptus globulus* par hydrodistillation et par entraînement à la vapeur d'eau, ont été calculés en fonction de la masse du matériel végétal traité « le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après extraction et la masse de la matière végétale utilisée ». Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE} = \frac{\text{Masse d'huile essentielle g}}{\text{Masse du matériel végétal utilisé g}} \times 100$$

RHE : Rendement en huile essentielle en (%).

Tableau 5 : Quantité d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* extraite par Hydrodistillation

Masse du matériel végétal	Volume d'eau distillée	Masse des HE
1000g	2000ml	4,62ml

$$\text{RHE} = \frac{4,62}{1000} \times 100 = 0,46\%$$

L'*Eucalyptus globulus* renferme un taux moyen de 0,46 % d'huile essentielle. Par contre notre résultat ne coïncide pas à ceux obtenus par d'autres auteurs ayant utilisés la même technique d'hydrodistillation, c'est le cas de Rabiai (2014) qui ont obtenu un rendement plus faible 0,43%. En revanche, la valeur de notre rendement est inférieure à celle rapportée par Belkhiri et Lanane (2020) soit 1,65% ainsi que celle enregistrée par Bey-ould si said (2014) avec un rendement de 2,53%.

Selon certains auteurs, la composition chimique et le rendement en HEs varient selon diverses conditions, parmi lesquels des facteurs écologiques tels que la température, l'humidité relative l'insolation et la nature du sol qui peuvent influencer la composition chimique des huiles essentielles (Oliveira *et al*, 2005). Aussi la période de la récolte des plantes peut avoir un effet sur la composition en HEs et par conséquent sur l'activité antimicrobienne (Bounatirou *et al*, 2007). Selon Naili (2013), le rendement en huiles essentielles peut être influencé par le génotype de la plante, son origine géographique, la période de récolte, le climat, les propriétés physico-chimiques du sol

ainsi que, la méthode d'extraction employée, les parties végétales utilisées et les conditions de séchage.

IV.1.2 Examen microscopique :

IV.1.2.1 Coloration de gram

Sous microscope optique et à émergence au grossissement X100, la coloration de Gram réalisée à partir des colonies distinctes, montre la présence de bactéries roses donc à coloration de Gram- de forme bacillaire et coccobacille ainsi que d'autres bactéries violettes à coloration de Gram+, de forme cocci (Fig. 12).

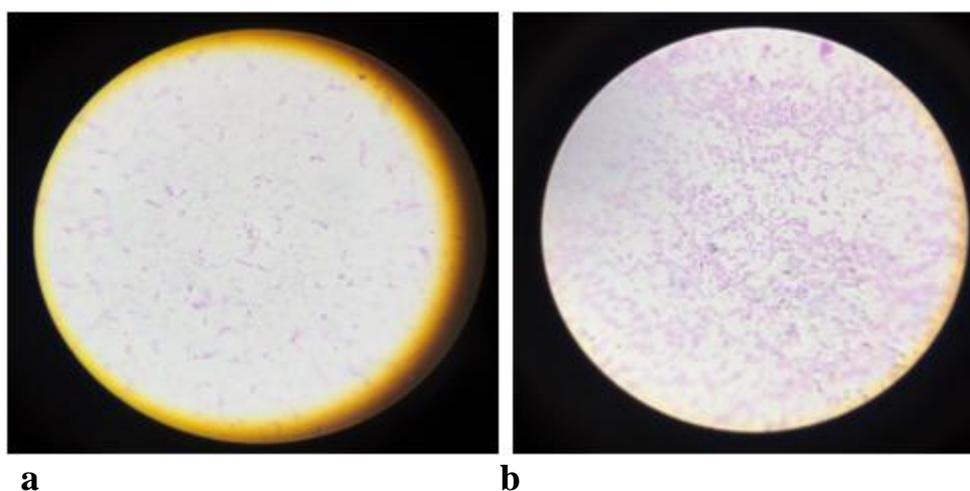


Figure 12 : Coloration de gram : a- *Escherichia coli* (Gram+) b- *Staphylococcus aureus* (Gram-)

IV.1.3 Activité antimicrobienne (Aromatogramme) :

Dans le but d'estimer le potentiel bactérien de notre huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, le choix s'est porté sur deux souches cibles, car chacune d'elle possède des structures cellulaires et un métabolisme particulier.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielles d'*Eucalyptus globulus* par la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé permet de mesurer la capacité de notre l'huile à inhiber la croissance microbienne *in vitro*. Elle est ainsi basée sur la mesure du diamètre des halos d'inhibition obtenus et mesurés avec précision. Les résultats présentés dans le tableau 6 et les figures 14 15 illustrées ci-dessous :

Tableau 6 : Résultats de l'aromatogramme exprimés par le diamètre de la zone d'inhibition en mm selon la concentration en huiles essentielles

Dilution	0%	5%	50%	75%	100%
Souche cible					
<i>Escherichia coli</i>	0	5,5	7	10,5	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	4,5	6,5	13,5	19,5

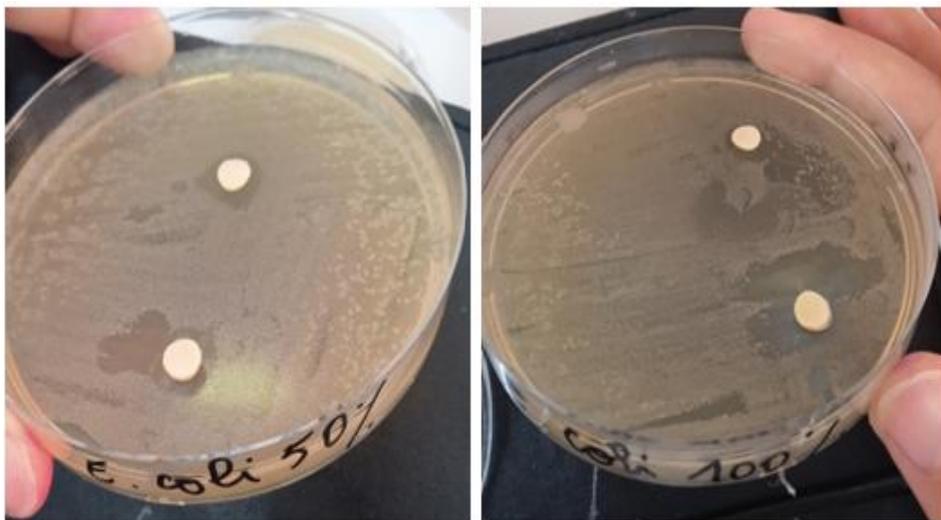


Figure 14 : Résultats de l'aromatogramme de *E.coli* (Concentration HEs 50% et 100%)



Figure 15 : Résultats de l'aromatogramme de *S. aureus* (Concentration HEs 50% et 100%)

De l'ensemble des résultats obtenus, il ressort que :

La méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis des bactéries testées.

L'action de l'antimicrobien sur les microorganismes dépend, d'une part de la structure membranaire de la cellule cible, puisqu'elles possèdent un effet inhibiteur beaucoup plus sur les bactéries à Gram+ que sur les bactéries à Gram-, et d'autre part de la composition de l'huile essentielle elles-mêmes qui leur confère un pH acide (pH= 6,40) (Mouas *et al*, 2017).

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positif que sur les bactéries à Gram négatif. Toutefois, les bactéries Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action et ceci est directement lié à la structure de leur paroi cellulaire (Guinoiseau, 2010).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'HE d'*Eucalyptus globulus* exhibent une activité contre deux souches bactériennes testées en dépit de leur morphologie et de leur Gram. En effet l'HE d'*Eucalyptus globulus* exerce une forte activité sur les bactéries à Gram positif.

Les diamètres des zones d'inhibition nous ont permis de classer les espèces bactériennes en fonction de leur sensibilité à l'huile essentielle testée (Dris, 2020). Dans le cas des bactéries à coloration de Gram positif, *Staphylococcus aureus* s'est avéré plus sensible avec un diamètre d'inhibition maximale de 19,5 mm (Fig 14). Pour les bactéries à coloration de Gram négatif, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez *Escherichia coli* soient 12 mm (Fig. 13). On a donc considéré que ces microorganismes étaient plus sensibles à l'huile. La variabilité des résultats est probablement due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les microorganismes testés et les huiles essentielles utilisées (Pattnaik *et al*, 1997).

En comparant la susceptibilité des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cette huile diffère d'une bactérie à une autre. Cependant, *Staphylococcus aureus* est la plus sensible à l'huile testée puis *Escherichia coli*. Ces résultats sont en accord avec la littérature selon lesquelles les bactéries à Gram+

montrent la plus grande sensibilité par rapport aux bactéries à Gram- (Burt, 2004 ; Souza *et al*, 2005 ; Bakkali *et al*, 2008).

Le volume des huiles essentielle influence l'activité antibactérienne, plus le volume de l'huile essentielle augmente plus les diamètres d'inhibitions est important (Emiroğlu *et al*, 2010). Cela s'applique aux résultats que nous avons obtenus par l'HEs d'*Eucalyptus globulus*.

Les diamètres des halos d'inhibition montrent que le pouvoir antimicrobien est proportionnel à la concentration. La différence dans la sensibilité des espèces microbiennes enregistrée suggère la susceptibilité des différents microorganismes aux divers composants de l'huile essentielle.

Conclusion & Perspective

Conclusion générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques. Avec la prévalence des microorganismes pathogènes résistants aux antibiotiques, on note un regain d'intérêt pour les molécules naturelles extraites à partir de ces espèces végétales.

Ce travail a été réalisé afin d'évaluer scientifiquement, l'activité antimicrobienne *in vitro* de la plante médicinale (*Eucalyptus globulus*) et pour prouver leur efficacité contre des bactéries multi-résistantes.

L'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* par hydrodistillation a révélé un bon rendement de l'ordre de 0,46%

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a permis de montrer par la méthode d'aromatogramme, une activité inhibitrice contre les deux souches testées. Pour les Gram positif, la plus sensible étant *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 19,5 mm, alors que chez les Gram négatif, les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues chez *Escherichia coli* 12mm

Le volume des huiles essentielle influence l'activité antibactérienne, plus le volume de l'huile essentielle augmente plus les diamètres d'inhibitions est important, il est clair que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* possède un pouvoir antimicrobien supérieur à celui des agents antimicrobiens standards utilisés. En effet, les diamètres des zones d'inhibitions enregistrés sont plus grands.

A partir des résultats obtenus au cours de notre étude, on peut conclure et prédire que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* pourrait servir comme base de lutte biologique contre les germes responsables des maladies infectieuses.

Dans l'ensemble, cette étude appuie d'avantage sur la vision selon laquelle *Eucalyptus globulus* est prometteuse comme source naturelle avec une activité antibactérienne et confirme ainsi ses utilisations potentielles en tant qu'un agent antimicrobien pour des applications industrielles telles que la conservation des produits pharmaceutiques, de la parfumerie et alimentaires.

Néanmoins, des études *in vivo* devraient être menées pour justifier et évaluer l'utilisation potentielle des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- AFNOR (Association Française de Normalisation), (1986). Recueil des normes françaises “huiles essentielles”. AFNOR, Paris, pages : 57.
- AFNOR (Association Française de Normalisation), (2000). Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 – Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 – Volume 1, Monographie Relative aux huiles essentielles 323 P. Tome 2 – Volume 2, Monographie Relative Aux Huiles Essentielles, pages : 663.
- Alioua M, (2015). Les *Staphylocoques* : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline. Thèse de Doctorat, Université Badji Mokhtar- Annaba (Algérie). Pages : 120.
- Axelsson, M., Sjøvall, J., Gustafsson, B.E., Setchell, K.D.(1982). Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298 : 659-660.
- Bagard S (2008). Physique-Chimie 1e S : Tout-en-un, Ed. Bréal, 432 pages
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*, 46 (2) : 446-475.
- Baliere C (2016). Les *Escherichia coli* Potentiellement Pathogènes Dans L’environnement Littoral : Cas Des STEC Et Des EPEC. Thèse de Doctorat, université de Bretagne occidentale. Pages : 23.
- Belkacem I (2017). Stratégies de lutte contre les biofilms bactériens responsables d’intoxications alimentaires : polyphénols naturels. Thèse de Doctorat, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem (Algérie). Pages : 34
- Belkhiri M et Lanane A ,(2020) .Apport de l’huile essentielle d’*Eucalyptus globulus* dans le phénomène de la résistance aux antibiotiques, Mémoire de Master , Université des frères Mentouri, Costantine, page :48
- Benbouli, 2005. Valorisation des extraits des plantes aromatiques et médicinales de *Mentha rotundifolia* et *Thymus vulgaris*’’, (Memoire de Magistere). 154P
- Benjilali B (2004). Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l’entraînement à la vapeur d’eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation. *Le pharmacien du Maghreb*. Pages :17-59.
- Bey-ould si said Z, (2014) .Activité biologique des huiles essentielles des feuilles et du fruit d’une plante médicinale *Eucalyptus globulus*, Mémoire de Magister, Université Abderrahmane Mira-Bejaia, page : 146

- Bosse J ; 2005 : Larousse des arbres, dictionnaire des arbres et des arbustes .Ed.
- Boukhatem, M.N., Ferhat, M.A., Kameli, A. et Mekarnia, M. (2017). *Eucalyptus globules* (Labill) : un arbre à essence aux mille vertus. Lavoisier SAS.
- Boullard B ; 2001 : plantes médicinales du monde. Réalités et croyances. Estem
- Bounatirou S, Smiti S, Miguel M.G, Faleiro L, Rejeb M.N, Neffati M et Pedro L.G, (2007). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff et Link. *Food chemistry*, pages : 105, 146 et 155.
- Boutedjiret C, (1990). L'huile essentielle d'*Artémisia herba-Alba* Asso d'Algérie. Approche des conditions optimales de son extraction par entraînement à la vapeur d'eau. Contribution à son étude analytique. Mémoire de magister en génie chimique, Ecole national polytechnique d'Alger.
- Brelière B, Cerrato M, Martinez A et Romoli V (2009). Microbiologie BEP : Les Savoirs En Situation (Broché), Ed. Hachette Technique, pages : 24.
- Bruneton J., 1987 : Elément de photochimie et de pharmacognosie. Paris, Technique et documents. Ed. Lavoisier. Pp : 228-584.
- Bruneton J., 2002 : pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} édition
- Bruneton J., 2009. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition Paris: Tec & Doc Lavoisier. Bruneton J. (1999), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^{ème} édition, Lavoisier. Tec et Doc, Paris, pp 1120.
- Bruneton J., 2015 . Pharmacognosie (5^o Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, Tec and Doc, Lavoisier, Paris. pp 1504.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.(2000). American Society of Plant Physiologists, 24, pp 1250-1318.
- Burt S, (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), pages : 223-253
- Capo M., Courilleau V., et Valette C., 1990. Chimie des couleurs et Desodeurs Culture et techniques, 204 p.
- Chanforan, C. (2010). Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-

- cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate (Thèse de doctorat). Université d'Avignon.
- Couderc C (2015). Impact des antibiotiques sur l'histoire naturelle de la colonisation nasale par *Staphylococcus aureus*. *Thèse de Doctorat*, Université Pierre Et Marie Curie, (France). Pages : 19.
- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents, *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564 - 582.
- Cronquist A, 1981: An integrated system of classification of flowering plants.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Edt Blackwell Publishing Ltd. (2006).
- Curir, P., Beruto, M. et Dolci, M. (1995). "*Eucalyptus* species: *in vitro* culture and production of essential oils and other secondary metabolites". Dans: Bajaj, Y.P.S. (ed.). *Medicinal and Aromatic Plants VIII*. Springer, Berlin, Heidelberg. P : 194-214.
- Daroui-Mokaddem H. (2012) . Etude phytochimique et biologique des especes *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolum olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). pp30-37.
- Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy MC, Quentin R (2011). Bactériologie Médicale : Techniques Usuelles. 2nd Edition Elsevier Masson, pages : 640.
- Deyson G ;1978 : Cours de Botanique Générale.4 série .Tome II,
- Diallo AA (2013). *Escherichia Coli* Pathogènes Et Résistantes Aux Antibiotiques Dans Les effluents d'origine Humaine et Animale : Prévalence et Caractérisation avant et après traitement epuratoire. *Thèse de Doctorat*, Université Paul Sabatier Toulouse III, France. 130 p.
- Dris I (2020). Caractérisation chimique des huiles essentielles de *Pistacia lentiscus* L. Evaluation du pouvoir antimicrobien et antioxydant. *Thèse de Doctorat*, Centre Universitaire De Tissemsilt, Algérie. 140 p.
- Fadi Z (2011) : Le romarin *Rosmarinus officinalis* le bon procédé d'extraction pour un effet thérapeutique optimal. *Thèse du doctorat* en pharmacie. Université Mohammed V Rabat, Maroc
- Gao, Z., Huang, K., Yang, X., Xu, H. 1999: Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Biochem.Biophys. Acta.*, 1472: 643-650.

- Garrity GM, Leventhal J, et Lilburn TG (2005). Taxonomic Outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, *Second Edition*, Release 6.0. ed. Springer-Verlag, New York
- Goetz, p., Ghedira, k., (2012). Phytothérapie anti-infectieuse. Ed. France, Springer Verlag, pp 382.
- Goldbeck, J.C., do Nascimento, J.E., Jacob, R.G., Fiorentini, A.M. et da Silva, W.P. (2014). Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Industrial Crops and Products*, Vol N° 60. Edition Elsevier. P: 304-309.
- Guignard J.L. ,1995. Abrégé de Botanique .Ed. Masson, 285 p.
- Guinoiseau E, (2010). Molécules Antimicrobiennes Issues d'huiles Essentielles Séparation, Identification et mode d'action. *Thèse de Doctorat* à Université de Corse, France
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., (1989). Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *J. Chem. Ecol.* 15: 1795–1810.
- Harbone J.B. (1993). The flavonoïds: advaces in research since 1986. Chapman and Hall London. pp 676.
- Holley R.A et Patel D, (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant Essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4) : 273-292 p.
- Hopkins, W. G. (2003). Physiologie végétale. De Boeck Supérieur, pp 280.
- Houel E, 2011. Etude des substances bioactives issues de la flore amazonienne.
- Huc. E, (2011). O-mycoloylation : Caractérisation d'une nouvelle modification post-traductionnelle de petites protéines d'enveloppe Chez Les Corynebacterineae. Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III, France. Pages : 12.
- Ignat I, Volf I, Popa V I., (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, *Food Chemistry*. 126:1821-1835.
- Jean-Denis J.B. (2005). Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqué dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk and Curt).
- Joffin J.N et Leyral G (1996). Microbiologie Technique. Centre régionale de documentation pédagogique d'aquitaine Bordeaux, France, Pages : 219-223.

- Konig, M., Scholz, E., Hartmann, R., Lehmann, W., Rimpler, H. (1994). Ellagi tannins and complex tannins from *Quercus patroae* bark. *Journal of Natural Product*. 57: 1411-15.
- Koziol, N. (2015). Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora*: qualité, efficacité et toxicité. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université de Lorraine, Lausanne. 171p.
- Loukiadis E (2007). Facteurs de virulence et dissémination dans l'environnement via les effluents d'abattoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entéro hémorragiques (EHEC). Thèse de Doctorat, Université Toulouse III (France). 170 p.
- Lucchesi, M.-E., Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. 2005. *Thèse de Doctorat*, Université de la Réunion.
- Luís, A., Duarte, A., Gominho, J., Domingues, F. et Duarte, A.P. (2015). Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*, Vol 79. Edition Elsevier. Pp. 274-282.
- Mérillon J.M., Fauconneau B., Waffo Teguo P., Barrier L., Vercauteren J and Huguet F. (1997). Antioxidant activity of the stilbene Astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clinical chemistry*. 43: 1092-1093.
- Mouas Y, Benrebiha F. Z, et Chaouia C, (2017). Évaluation de L'activité Antibacterienne de L'huile essentielle et de L'extrait méthanolique du *Rosmarinus Officinalis* L., 7(1), pages : 363-370.
- Oliveira M.J, Iani F.P.C, Oliveira C.B.A, Santos M.R, Souza P.S, Santos S.C, Seraphin J.C, et Ferri P.H, (2005). Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics And Ecology*, 33, pages :275-285
- Pibiri M C, (2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huile essentielle. Thèse de doctorat. Polytechniques Fédérale de Lausanne. France.
- Pattnaik S, Subramanyam V.R, Bapaji M & Kole C.R, (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89, pages : 39-46.

- Pauline Erau.(2019). L'Eucalyptus : botanique , composition chimique , utilisation thérapeutique et conseil a l'Officine. these de Docteur en Pharmacie. Univ de Marseille pp 40-77.
- Pénicaud, C. (2009).Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation.
- Peterson, J., Dwyer, J., Adlercreutz, H., Scalbert, A., Jacques, P. & McCullough, M. L. (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr.Rev.* 68 10):571–603.
- Pibiri M.C., (2006) : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de plantes. Maloine S.A. éditeur. Paris, 544 p.
- Rabiai M,(2014).2Etude physicochimique et évaluation de l'activité biologique d'une huile essentielle et l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus* de la région M'sila, Mémoire de master ,université de M'sila ,page :39
- Saidi Imene.(2019).Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des fabaceae: *Gleditsia triacanthos* de la région de Sidi Bel Abbès : Extraction des substances bioactives. These de Doctorat en Sciences Biologiques. Université Djillali Liabès Sidi Bel Abbés .170 p.
- Salehi, B., Upadhyay, S., Orhan, I.E., Jugran, A.K., Jayaweera, S.L.D., Dias, D.A., Sharopov, F., Taheri, Y., Martins, N., Baghalpour, N., Cho, W.C. et Sharifi-Rad, J. (2019). Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature. *Biomolecules*, Vol 9. pp : 1-34
- Šaponjac V T, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G, Djilas S .Chapter 6: Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In: Nedovic, Emerging and Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy product saccording to production and technological criteria. *Food Microbiology*. 2004, p 715–725. Ed. Maloine. Paris.
- Souza E.L.d, Stamford T.L.M, Lima E.d.O, Trajano V.N, et Barbosa Filho J. M, (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(4), pp : 549-558..
- Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P. & Spranger, M. I. (2006). Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Analytica Chimica Acta* .563 : 382–390.

- Teuscher, E ; Anton, R ; & Lobstein, A. (2005) : Plantes aromatiques : Epices, Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. Food Engineering Series. Springer International Publishing, Switzerland.
- Valnet J. (1984) : Aromathérapie: Traitement des maladies par les essences des ventilations au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat .
- Wichtl, M. et Anton, R. (2003). Plantes thérapeutiques. 2^{ème} édition. Edition Tec & Doc, Edition médicales internationales. Lavoisier.
- Williams, C.A., Grayer, R.J., (2004). Anthocyanins and other flavonoids. Nat. Prod. 21: 539–573.