

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

Université Ibn Khaldoun de Tiaret.

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Département des Sciences de la Nature et de la Vie.



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

Domaine: "Sciences de la Nature et de la Vie"

Filière: "Agronomie"

Spécialité: "Agro biotechnologie "

THEME:

**L'effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*
sur le développement des bactéries isolées du lait mammiteux**

Members de JURY:

Présenté et soutenu publiquement par:

Président : M^{me} MEDJBAR Nacera

- AIDET Khaldia

Promoteur : M^{me} GHAZI Kheira

- FILALI Faiza

Co-promoteur: M^{me} BOUBAKEUR Badra

Examineur : M^{me} KHADEM Hafida

Année universitaire: 2014–2015



Remerciements

« Celui qui ne remercie pas les agents, ne remercie pas le Dieu »

Nos remerciements tout d'abord Allah, le tout puissant, qui nous guide dans le bon chemin ; le chemin du savoir.

Nos remerciements les plus chaleureux et les plus vifs s'adressent d'abord à notre promotrice, **Dr .Ghazi Khiera** Maître de conférence **A** à l'institut des sciences vétérinaires d'avoir accepté de nous encadrer ainsi que pour ses encouragements, ses orientations et son entière disponibilité ainsi que ses grandes aides, pour ses remarques, son suivie conseils et que sans lui, le présent travail ne serait jamais abouti.

Nous adressons aussi nos remerciements les plus chaleureux et nos parfaite gratitude à notre Co-promotrice **M^{eme} Boubkeur .Badra** pour ses encouragements, la réalisation de l'étude statistique ses orientations et pour sa patience et ses précieux conseils.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance qui m'a donné la chance de travailler sous sa direction, dont les encouragements et les conseils m'ont permis de réaliser ce travail.

Nous le remercie également **M^{eme} Ait Abderahim .L** pour ses corrections. Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude et ma très sincère reconnaissance.

Nos profonds remerciements s'adressent aussi à **M^{eme} . Medjbar** , pour l'honneur qu'elle nous a fait de présider ce jury.

Nous adressons aussi nos plus vifs remerciements à **M^{eme} . Khadem Hafida**. D'avoir bien voulu s'intéresser à ce travail et d'accepter de l'examiner, nous sommes très honorés de sa présence dans ce jury.

Un grand merci à **M^r .Nadjari , M^r Chadli** pour sons aide bénéfique et ses conseils précieux.

Enfin nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés de près et de loin pour la réalisation de ce travail.

Dedicaces

A vous prunelles de mes yeux

*Mes chers parents vous êtes merveilleux
M'ERCI Maman, M'ERCI Papa pour vos
encouragements, conseils et vôtres amour si
précieux et merci d'avoir fait de moi la princesse
de vôtres royaume*

*Mes très chers frères et sœurs: Mohamed, Fatima,
Abdelkrim, Badra.*

*Mes très chers ami(e)s: Amina, Ibtisseem,
Samira, Karima, Imane, Rachida, Sara, Yahia,
Maamar, Mohamed, Kaltoum, Imi et mon collègue
de travail Khaldia et tous mes ami(e)s.*

Faiza

Grace au bon dieu qui m'a donné la chance de vivre et volonté de réaliser ce mémoire de fin d'étude, je le dédie à :

A la plus belle femme du monde ma mère **Embaraka**, qui a veillé sur moi jour et nuit depuis mon enfance qui m'a donné l'amour la gentillesse le respect à moi-même c'est la reine de mon cœur que dieu la surveille et lui accorde santé, longue vie et bonheur.

A le plus adorable père **Saad**

A l'homme de ma vie, mon âme sœur et la lumière de mon chemin, mon mari
Kadi.

Qui a supporté mes humeurs au gré de cette thèse, qui m'a encouragée jusqu'au bout, qui a été mon appui tout simplement

Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égal, m'ont permis de réussir mes études.

Sans ton aide, tes conseils ce travail n'aurait vu le jour.

Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.

A mon père **Djillali** et ma belle mère **Khadija**

Vous avez toujours été là pour moi, m'entourant de votre bienveillance usant de tous les sacrifices possibles.

Tous les mots que je pourrais utiliser seraient insuffisants pour vous témoigner l'amour que je vous porter.

J'espère être à la hauteur de votre attente; Que dieu vous préserve et vous prête longue vie de joie.

A mes frères **benaiissa** et **Mouetz**.

Je vous remercie tous les deux pour votre gentillesse, dans les moments les plus difficiles.

A mes sœurs, **Amina**, **Nacéra**, **Nabila**, **feriel** et **Manel**.

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter. En reconnaissances de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

A mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidée; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

A ma binôme **Faiza** qui a partagé avec moi les moments difficiles de ce travail et à sa famille.

Khadija

Liste des abréviations

AOAC: Association of Official Analytical Chemists (Association Officielle des chimistes analytiques)

BN : Bouillon Nutritif

BP : Baird Parker

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DO : densité optique

DZI: Diamètre Minimale d'Inhibition

GN : Gélose Nutritive

H.b: Huile brute

HE : Huile Essentielle

Liste des Tableaux

Pages

Tableau n°1: Germes responsables des mammites	4
Tableau n°2: Risques des microorganismes impliquent dans la mammite pour l'homme ...	5
Tableau n°3: Antibiotiques bactériostatiques et bactéricides	6
Tableau n°4: Classification taxonomique du genre eucalyptus	9
Tableau n°5: Propriétés biologiques des huiles essentielles.....	12
Tableau n°6: Informations relatives aux souches testées	15
Tableau n°7: Verreries et appareillage utilisés.....	16
Tableau n°8: Produits et milieux de culture utilisés	17
Tableau n°9: Résultats des analyses physicochimiques des feuilles <i>d'Eucalyptus</i>	33
Tableau n°10: Résultats de rendement en H.E <i>d'eucalyptus</i> par la méthode d'Hydrodistillation	36
Tableau n°11: Propriétés organoleptiques des H.Es des feuilles <i>d'eucalyptus</i> obtenues par Hydrodistillation.....	38
Tableau n°12 : Résultats des indices physicochimiques des feuilles étudiées	38
Tableau n°13: Résultats de la pré-identification	40
Tableau n°14: Résultats des antibiotiques sur les deux souches testées.....	40
Tableau n°15: Diamètres des zones d'inhibition obtenus des différentes dilutions d'HE <i>d'E.globulus</i> selon la gamme 1(1/2, 1/4 et 1/8) vis-à-vis <i>S.aureus,E.coli</i>	41

Tableau n°16 : Diamètres des zones d'inhibitions des différentes dilutions (10% ,
20%,80%)sur *S.aureus*, *E. coli*43

Tableau n°17: La concentration minimale inhibitrice d' H.E d'*E.globulussur* les bactéries
testées 45

Liste des Figures

	Pages
Figure n°01 : Dessin des feuilles, fleurs et fruits d' <i>Eucalyptus</i>	9
Figure n°02 : <i>Eucalyptus globulus</i>	10
Figure n°03 : les feuilles d' <i>Eucalyptus globulus</i>	14
Figure n°04 : Carte géographique présentant la région de récolte des feuilles étudiées....	14
Figure n°05 : Photos des feuilles découpées après séchage.....	15
Figure n°06 : Schéma représentatif des démarches expérimentales réalisées.....	18
Figure n°07 : Photo du montage d'Hydro distillateur	23
Figure n°08 : Préparation de la gamme des dilutions de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i>	32
Figure n°09 : coloration de Gramme.....	61
Figure n°10 : H.E des d' <i>Eucalyptus globulus</i> obtenus par l'Hydrodistillation.....	36
Figure n°11 : Diamètres des zones d'inhibitions obtenues par l'antibiogramme sur <i>S.aureus</i> et <i>E.coli</i> (mm).....	40
Figure n°12 : Diamètres zones d'inhibition d' H.E des feuilles étudiées sur les souches Testées (gamme 1)	41
Figure n°13 : Diamètres des zones d'inhibitions obtenues sur <i>S.aureus</i> et <i>E.coli</i> (gamme2)	43

Listes des annexes

	Pages
Annexe n°1: H.E des <i>Eucalyptus globulus</i> obtenus par l'Hydrodistillation	63
Annexe n°2: Coloration de Gram	63
Annexe n°3: Les DZI d' H.E d' <i>eucalyptus globulus</i> sur les deux bactéries	64
Annexe n°4: Antibiogramme et laCMI	64
Annexes n° 5: Les témoins négatifs	65
Annexes n° 5: La composition des milieux de la culture utilisés.....	66
Annexes n° 6: Matériels utilisés	66

Introduction

Le lait, destiné à l'alimentation humaine, est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Contaminé, il peut être un vecteur de transmission de germes pathogènes à l'homme et peut présenter un risque pour la santé humaine (**Ghazi et Niar, 2011**)

Les mammites constituent une pathologie majeure de l'élevage laitier elles sont à l'origine de la mauvaise qualité physique, biochimique et microbiologique du lait. Leur importance économique et sanitaire n'est guère négligeable (**Ghazi et Niar, 2011**).

La conséquence de telle situation est, le besoin de plus en plus croissant aux méthodes de prévention, ainsi qu'aux moyens de traitement. La thérapeutique antibiotique ou antibiothérapie constitue un des moyens les plus souvent mis en œuvre (**Amarti et al., 2010**).

Actuellement et avec le développement de la résistance microbienne l'utilisation de l'antibiotique n'est pas toujours la solution idéale outre les problèmes qu'elles engendrent au niveau de lait (retrait, contamination par les résidus d'antibiotiques).

A côté des antibiotiques connus, différentes plantes aromatiques sont caractérisées par la synthèse de molécules odorantes qui constituent ce qu'on appelle les huiles essentielles ou essences connues depuis longtemps pour leur activité antiseptique et leur activité thérapeutique dans la médecine populaire (**Siddiqui et al., 2003**).

L'Algérie de part sa situation géographique et son climat exceptionnel, abrite un grand nombre de plantes médicinales et aromatiques dont la plupart est exploitée dans des conditions artisanales et marginales par rapport aux modalités modernes de production et de valorisation.

Dans ce contexte et notamment dans le cadre du programme de recherche lancé par notre laboratoire sur les plantes médicinales, notre choix s'est porté sur : *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). L'Eucalyptus est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde (**Boubrît et Boussad, 2007**).

D'un autre côté, l'usage extensif des agents antibactériens chimiques dans la médication humaine ainsi que dans les élevages animaux conduit à la de souches bactériennes résistantes (**Boubrît et Boussad, 2007**). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à étudier les feuilles d'*eucalyptus globulus* de la région de Tiaret.

Ce travail vise les objectifs suivants :

- ✚ Valorisation des feuilles d'*Eucalyptus* par extraction des huiles essentielles en utilisant la méthode d'Hydrodistillation.
- ✚ Détermination des indices physicochimiques des huiles essentielles obtenues ;
- ✚ L'effet antibactérien de l'huile essentielle extraite ;
- ✚ Comparaison entre l'antibiogramme et l'aromatogramme.

Partie bibliographique

Chapitre I

Les mammites et les antibiotiques

I. 1. Les mammites

I.1.1. définition

La mammite est une inflammation de la glande mammaire se traduisant par la présence dans le lait de germes pathogènes et des cellules d'origine sanguine ou mammaire, ainsi que par des modifications physiques, chimiques et biochimiques du lait (Marcel, 2007).

I.1.2. Classification des mammites

D'après (Gabli, 2005), on distingue deux types de mammite :

I.1.2.1.Mammites cliniques

La mammite clinique est définie comme une glande mammaire ayant des sécrétions lactées modifiées. Elle est considérée aiguë ou suraiguë dans la situation de changements soudains, et chronique lorsque la situation est récurrente ou continue. Elle peut aussi être qualifiée de mammite clinique bénigne (sécrétions lactées modifiées sans inflammation du pis) ou modérée (sécrétion lactées modifiées avec inflammation du pis). Lorsque la mammite cause des signes cliniques en dehors de la glande mammaire (tels que la fièvre, une déshydratation de l'animal, une baisse ou un arrêt de l'appétit, de la faiblesse, etc.), ces symptômes sont généralement considérés comme une mammite clinique aiguë ou suraiguë sévère et toxique (Erskine, 2004).

I.1.2.2.Mammites sub- cliniques

Les mammites sub-cliniques sont plus fréquentes que les mammites cliniques ; elles représentent 15-40 cas pour un cas de mammite clinique (Laadjama et coll, 2011), soit 95-98% des infections (Medefouni et Bendib, 2006). La mammite sub-clinique est pratiquement "invisible" et elle est donc difficile à détecter. Il n'y a pas de signes apparents : la vache apparaît en bonne santé, le pis et le lait ne présentent aucune modification macroscopique. Le seul signe d'infection est la présence dans le lait d'un nombre élevé de micro-organismes et de cellules blanches du sang (cellules somatiques). Les numérations cellulaires peuvent être supérieures à 200.000 cellules/ ml dans le lait (Bergonier et coll., 2006). Ce type de mammite résulte de l'évolution des foyers infectés au sein du parenchyme, créés par des germes dont l'organisme n'arrive pas à s'en débarrasser. (Heleili, 2003).

I.1.3. Microorganismes responsables des mammites

Les espèces bactériennes impliquées dans les infections mammaires de la vache sont présentes sur et chez l'animal lui-même ou dans son environnement. Par ailleurs, Les bactéries responsables de mammites sont toutes capables de se multiplier dans le lait qui est un milieu nutritif suffisamment riche pour assurer leur développement (**Descoteaux et Roy, 2004**). Le tableau n° 1 présente les germes majeurs, mineurs, environnementaux et contagieux impliqués dans la mammite clinique et subclinique.

Tableau n°1 : Germes responsables des mammites (Descoteaux et Roy, 2004; Gabli, 2005).

Type de mammite	Germes majeurs	Germes mineurs	Germes environnementaux
Clinique	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylocoques à coagulase négative</i>	<i>Escherichia Coli</i>
	<i>Streptocoque</i>		
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Pasteurella hemolytica</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Mycoplasmabovis</i>		
Sub- clinique	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>staphylocoques à coagulase négative</i>	<i>Escherichia Coli</i>
	<i>Streptocoque</i>		
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Corynébactériumbovis</i>	<i>Streptococcus uberis</i>
	<i>Bacillus cereus</i>		

I.1.4. Incidence des mammites sur la qualité du lait

I.1.4.1. au niveau du transformateur

La mammite induit une diminution d'environ 1 % des substances sèches du lait par changement de sa composition (les graisses, la caséine et le lactose) et une augmentation du taux des protéines et chlorures ainsi que le pH. Ces changements résultent en la perturbation des fermentations bactériennes utilisées pour la fabrication de produits laitiers fermentés. (**Medefouni et Bendib, 2006**).

I.1.4.2. au niveau du consommateur

Certains germes, qui sont à l'origine de mammites, peuvent également être pathogènes pour l'homme (**Medefouni et Bendib, 2006**) (voir **Tableau n°2**).

Tableau n°2 : Risques des microorganismes impliqués dans la mammité pour l'homme (Gabli, 2005).

Microorganisme impliqué dans la mammité	Risques pour l'homme
Mycobacterium bovis	Tuberculose
Brucella sp	Brucellose
Coxiella burnetii.	Fièvre Q
Staphylococcus aureus	Toxi-infections
Listéria monocytogène	Listériose
Escherichia coli	Troubles digestifs
Campylobacter jejuni	
Cryptococcus neoformans	Cryptococcose
Streptococcus agalactiae	Endocardite et de méningite

I.2. Antibiothérapie des mammites

Antibiothérapie ou thérapeutique-antibiotique, consiste en l'administration d'un principe actif (antibiotique) à un organisme dont l'état sanitaire a été affecté, suite à une infection par un ou plusieurs agents bactériens (Duval et Soussy, 1990).

Les antibiotiques sont des molécules à activité antibactérienne. Ils sont soit d'origine biologique (lactamines, aminosides, macrolides, polypeptides), semi synthétique ou synthétique (sulfamides, quinolones) (Seghier et al., 2009).

I.2.1. Classification

D'après Yala et al., (2001), les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action.

Les grandes familles des antibiotiques, selon la classification de Cohen (1997) ; François et al., (2003), sont :

- **Bétalactamine** : Pénicilline et céphalosporine ;
- **Aminosides** : Streptomycine, gentamycine ;
- **Chloramphénicol et thiamphenicol** : Cycline, Tétracycline, dexcycline,.....etc ;
- **Macrolides et apparentes** : Erythromycine, oléandomycine ;

- **Polypeptides cyclines** : polymyxine ;
- **Rifamycines** : rifampicine et antibiotiques divers.

I.2.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques ont pour rôle d'empêcher la multiplication des bactéries (bactériostase) ou d'entraîner leur destruction (bactéricide) par une action au niveau d'une ou plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (**Houssniet al., 2011**).

Tableau n°3 : Antibiotiques bactériostatiques et bactéricides (**Van Bambekeet al., 2007**).

Antibiotiques bactériostatiques	Antibiotiques bactéricides
Macrolides	β -lactames
sulfamidés	fluoroquinolones
tétracyclines	aminoglycosides
lincosamides	nitroimidazoles
nitrofuranes	glycopeptides (bactéricidie lente)
phénicolés	polymyxines
ethambutol	synergistines
cyclosérine	ansamycines
	acide fusidique
	isoniazide

- **Bactériostase** : consiste en un ralentissement de la croissance de la population bactérienne pouvant aller jusqu'à une absence de croissance. L'effet (ou activité) bactériostatique d'un antibiotique sur la population d'une souche bactérienne est indiquée par la détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice) (**Seghieret al., 2009**).
- **CMI** : C'est la plus faible concentration d'antibiotique donné, pouvant arrêter dans un milieu, et à des concentrations déterminées, toute croissance visible d'une souche bactérienne donnée (**Delarras, 2010**).

I.2.3. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

La sensibilité bactérienne se définit comme étant la réaction d'une bactérie vis à vis d'un antibiotique donné. Pour l'étudier nous disposons de technique appelée antibiogramme.

Celle-ci a pour but de prédire la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques, grâce à la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (**Khadidjatou, 2008**).

I.2. 4. Résistance des bactéries aux antibiotiques

Une quantité grandissante d'antibiotiques perdent leur efficacité à cause de la résistance que leur montre les bactéries. Par exemple, 95% des staphylocoques sont, depuis la découverte de la pénicilline en 1929, devenus résistants à cette dernière (**Campbellet Reece, 2007**).

Un micro-organisme est considéré « résistant » lorsque sa concentration minimale inhibitrice (CMI) est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (**Sylvie, 2009**).

I.2. 4.1. Résistance naturelle

C'est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (**Perez-Trallero et al., 2001**), il s'agit d'un caractère chromosomique pouvant être retenu comme critère d'identification (phénotype de résistance) (**Maurinet et al., 1995**). Elle est censée préexister à l'usage des antibiotiques. Elle constitue donc, une caractéristique propre à l'espèce et délimite en fait le spectre d'activité des antibiotiques (**Mesaros et al., 2005**).

I.2. 4.2. Résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes (**Singh et Barrett, 2006**), c'est le résultat de modifications génétiques, soit sur le noyau de la cellule (résistance acquise chromosomique), soit apportées par un plasmide (résistance acquise plasmidique) (**Ljunghet et al., 1985**).

➤ Mécanismes de résistance bactérienne

D'après **Schaechter et al. (1999)**, les mécanismes de résistance sont les suivants :

- Suppression de l'accès au site d'action par inhibition de la captation de l'antibiotique ou augmentation de son excrétion ;
- Modification de la cible ;
- Réduction de l'importance physiologique de la cible ;
- Liaison compétitive de l'antibiotique ;
- Synthèse d'une enzyme qui inactive l'antibiotique (c'est le plus répandu).

• Modification de cible

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance. Elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance, par conjugaison, transduction ou transformation.

Les changements occasionnés doivent inhiber l'action des antibiotiques tout en maintenant la fonction cellulaire de la cible. La modification peut toucher la structure de la cible mais aussi sa concentration (**Singh et Barrett, 2006**).

- **Résistance par diminution de la pénétration ou par augmentation de l'excrétion d'un antibiotique**

La diminution de la pénétration de l'antibiotique peut être la conséquence de différentes « stratégies » bactériennes. Certaines bactéries sont capsulées (*Klebsiella*, *Streptocoques*...) ou peuvent sécréter une zooglyce qui les protège de l'action des antibiotiques par effet de barrière ou par modification de leur charge externe. Le passage à travers la membrane cytoplasmique nécessite parfois des enzymes appelées perméases « énergie-dépendantes ». Si le potentiel de membrane et/ou le transfert d'électron sont trop faibles, alors ces perméases, ne sont pas fonctionnelles, et l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie (**Koterbaet al., 1986**).

- **La multi résistance**

Les bactéries sont dites multi résistantes (BMR) aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques. Elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (**Delière-Baronet al., 1996**).

Chapitre II
Eucalyptus et les huiles essentielles

II.1. Les Eucalyptus

II.1. 1. Historique

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 » (Bigendako, 2004).

Son introduction en Algérie fut par les française en 1860. L'espèce pionnière semble être l'*E.camaldulensis*, 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 ». Pendant les années 60 et 70, les reboisements à base d'eucalyptus ont concernés notamment l'Est (El-Kala, Annaba, Skikda), le centre (Tizi-Ouzou, Bainem) et l'Ouest (Mostaganem) et ceci afin de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et papetiers (La forêt algérienne, 1996).

II.1. 2. Classification

Le genre eucalyptus a permis de déterminer la systématique figurant sur le tableau n°4 (Guignard, 2001).

Tableau n°4 : Classification taxonomique du genre eucalyptus (Guignard, 2001).

Classification	Espèce
Règne	Végétales
Embranchement	Phanérogames
S /Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
S/Classe	Dialypétales
Série	Calicifores
S/Série	Diplo-mérist émones
Ordre	Mytales
Famille	Myrtacées
Tribu	Leptospermées
Genre	<i>Eucalyptus</i>



Figure n°01 : Dessin des feuilles, fleurs et fruits d'*Eucalyptus* (D'après Guignard, 2001).

II.1. 3. Caractères généraux

Les eucalyptus présentent souvent un dimorphisme foliaire. Chez l'E. Globules le très jeune pied à une tige verte, quadrangulaire, portant des feuilles dépourvues de pétiole (Becker et al., 1983).

Opposées. A limbe droit, horizontal. Le parenchyme palissadique se localise uniquement sous l'épiderme supérieur. Sur les pieds plus âgés, les feuilles sont alternes, pétiolées et à limbe plus ou moins falciforme. Pendant virginalement, les deux faces sont par suite toutes deux pourvues de tissu plastique. Chez les eucalyptus, les fleurs 4-5 sépales très réduits, presque inexistantes par fois 4-5 pétales soudés en un capiton caduque protégeant les jeunes étamines. L'ovaire triloculaire ou quadri loculaire se transforme en une capsule, déhiscente au sommet (Crete, 1965). Fruit : capsule lignifiée qui s'ouvre au sommet et libéré des graines petites et nombreuses (Becker et al., 1983).



Figure n°02 : *Eucalyptus globulus* (D'après Guignard, 2001).

II.1. 4. Domaines d'utilisations

La vocation de la quasi-totalité de ces plantations est la production de bois. Le bois d'eucalyptus présente des caractéristiques technologiques intéressantes pour la production de pâte à papier (fibres courtes) qui constitue la débouché principal de la majorité de reboisements industriels dans le monde (Campinhos, 1999). Il est également apprécié pour la production de panneaux de particules (MDF) ou de viscosité. Ils utilisaient également les feuilles pour aider à soulager la fièvre et divers autres maux. Les pharmacopées chinoise, indienne et gréco-européenne ont rapidement intégré les usages médicaux des feuilles d'eucalyptus. Au XIXe siècle, on utilisait l'huile essentielle pour désinfecter les cathéters urinaux dans les hôpitaux anglais. De nos jours, elle entre dans la fabrication de rince-bouche

et de dentifrices, de nombreuses préparations destinées à apaiser les voies respiratoires et dans des produits d'entretien, notamment comme dégraissant industriel (Bouvet, 1999).

II.1.5. Composition chimique d' H.E d'*Eucalyptus globulus*

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est 100% naturelle et non diluée. D'une couleur claire, elle dégage une odeur forte et camphrée. Ses principaux composants sont les Monoterpènes (limonène, para-cymène, alpha-pinène, et bêta-pinène), l'Oxyde terpénique (1,8-cinéole), les Monoterpénols (alpha-terpinéol) et les sesquiterpènes (aromadendrène). Elle se révèle efficace pour l'hygiène buccale. Cette essence s'utilise pour les bains, dans la cuisine, en inhalation, pour un massage mais aussi pour un soin. Elle sert également à parfumer les produits de nettoyage (Guignard, 2001).

Cette huile possède un effet rafraîchissant indéniable sur la température du corps. C'est un fébrifuge. Elle facilite la dissolution et l'élimination des glaires bronchiques (balsamique, fluidifiant, expectorant), anti-infectieux vis-à-vis des bactéries et virus ; En outre, c'est un excellent antibiotique naturel (Guignard, 2001).

II.2. les huiles essentielles

II.2.1. Définition

Les huiles essentielles, ou essences aromatiques végétales, sont des substances odorantes, volatiles, huileuses donc de nature hydrophobe, et totalement solubles dans les alcools (l'éther) et dans les huiles végétales et minérales. Lorsqu'elles sont pures, elles ne contiennent aucun corps gras : elles sont uniquement constituées de molécules aromatiques volatiles (Bachelot *et al*, 2006).

Ces essences peuvent être regroupées en cinq classes : les alcools, les esters, les aldéhydes, les cétones et les lactones oxydes. Elles sont souvent colorées : du jaune pâle au rouge foncé voire brun, ou encore bleu. Les huiles essentielles sont obtenues par différentes techniques d'extraction (Bachelot *et al*, 2006).

II.2.2. Propriétés biologiques

Les principales propriétés biologiques des huiles essentielles sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau n°5 : propriétés biologiques des huiles essentielles.

Activité antiseptiques	Pour les poumons (<i>eucalyptus</i>), dépuratives ou cicatrisantes (lavande) (Cremieux , 1990).
Activité antiparasitaire	Les terpènes ou terpénoïdes ont des effets contre les bactéries, les mycètes, les virus et les protozoaires .le mécanisme de l'action des terpènes n'est pas entièrement compris mais on pense qu'il s'agit de la rupture de la membrane par les composés lipophiles (Cowan ,1999).
Activité antifongique	Le carvacrol, le thymol possède une activité antifongique contre les mycètes phytopathogènes(Schwammleet al .,2001).
Activité antioxydant	La capacité antioxydant de l'huile volatile est étroitement liée à tout le contenu phénol (Jiaet al .,2010). Le carvacrol est un des composants principaux des huiles essentielles de certaines labiaceae, comme l'origan, thym dont la teneur peut atteindre jusqu'à 86%.l'activité antioxydant de ces herbes est dû au carvacrol, thymol et un autre phénol ; ceci a été confirmé par un certain nombre de travaux Jiaet al (2010) ont montré dans une étude portant sur l'H.E de Thymus (<i>Thymus vulgarae</i> L) que les chemotypes phénoliques (thymol et carvacrol) et non phénoliques (linalool) sont capables de réduire le radical 2,2-dyphenyl-1-picrylhydrazyl , avec un effet plus élevé enregistré pour les chemotypesphénolyques.

II. 2.3. Activité antibactérienne

LesHEs les plus étudiées pour leurs propriétés antibactériennes appartiennent aux *Labiatae* : origan, thym, sauge, romarin, clou de girofle qui est d'autant de plantes aromatiques à HEs riches en composés phénoliques comme l'eugénol, le thymol et le carvacrol. Ces composés ont un effet antimicrobien contre un large spectre de bactéries: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocyogenes*et. *Clostridium Spp* (Pauli, 2001).

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériels et méthodes

III.1. Objectifs du travail

Le but de notre étude est :

- L'extraction des HE des feuilles d'*Eucalyptus globulus* par la méthode d'hydro distillation et l'évaluation "in vitro" de son activité antibactérienne vis-à-vis des souches impliquées dans les infections mammaire (*S.aureus* et *E.coli*).
- Etude comparative entre l'aromatogramme et l'antibiogramme.

Pour ce faire plusieurs objectifs sont fixés :

- ✚ Extraction des huiles essentielles à partir des feuilles d'*Eucalyptus globulus* en utilisant la méthode de l'Hydrodistillation.
- ✚ Caractérisation des paramètres physico-chimique de l'huile extraite (Indice de réfraction, indice d'acide et indice d'ester).
- ✚ Evaluation "in vitro" de l'activité antibactérienne d'huile extraite d'*Eucalyptus globulus* sur gélose vis-à-vis des souches impliquées dans les infections mammaires (*S.aureus* et *E. coli*).

III.2. Lieu et période d'étude

Notre étude expérimentale a été réalisée dans les laboratoires de « Technologie Alimentaire », « laboratoire de Biochimie » et « laboratoire de Microbiologie », au niveau de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et « laboratoire d'hygiène et pathologie animale » Utma –Institut des sciences vétérinaires – Tiaret, durant une période qui s'étale du 01 Janvier au 09 Mars 2015.

III.3. Matériel

III.3.1. Matière Végétale

Dans notre étude, nous avons utilisé les feuilles d'*Eucalyptus globulus* (voir **Figure n°03**) qui ont été récoltées dans la région de Tiaret (Voir **Figure n°04**) au mois de Janvier 2015, et son identification a été effectuée par Mr Ait Hammou, au niveau du laboratoire d'écologie végétale de l'université d'Ibn Khaldoun de Tiaret.



Figure n°03 : les feuilles d'*Eucalyptus globulus*.

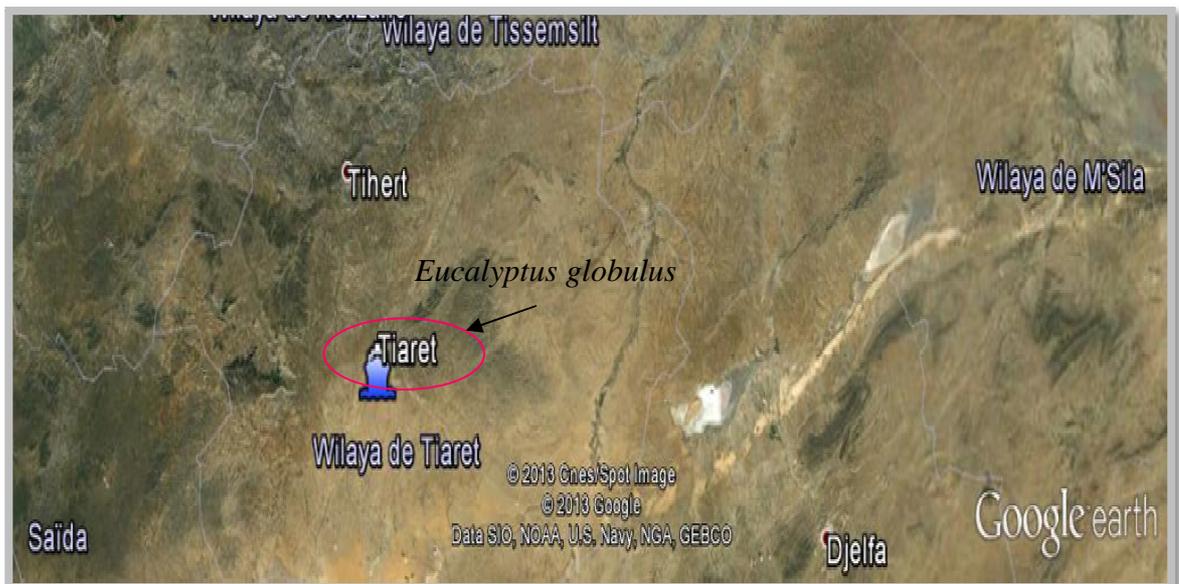


Figure n°04: Carte géographique présentant la région de récolte des feuilles étudiées

(www.Google.earth.com).

Les feuilles fraîchement récoltés au hasard, sont nettoyées, lavées, triées et essuyées avec des serviettes propres.

Les feuilles ont été découpées en petits morceaux. Une partie a été utilisée pour déterminer ses caractéristiques physicochimiques, et l'autre a été séchée à l'air libre et à l'obscurité (à l'abri de la lumière) (voir **Figure n°05**).



Figure n°05 : Photos des feuilles découpées après séchage.

III.3.2. Souches bactériennes testées

Le choix des bactéries a été porté sur deux souches isolées de lait mammitieux et qui sont fréquentes en pathologies animale et humaines, ces espèces sont souvent connues par leurs résistances naturelles à divers agents antimicrobiens. Nous avons sélectionné deux groupes de bactéries (Tableau n°6) :

- Des bactéries Gram négatif : *Escherichia coli*
- Des bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus*.

Tableau n° 6: Informations relatives aux souches testées.

Souches	Provenance	Forme	Milieu de culture
<i>E. coli</i>	(isolé de lait mammitieux)	suspension	Hecktoen
<i>S. aureus</i>	(isolé de lait mammitieux)	suspension	BP

III. 3.3. Matériels du laboratoire

III.3.3.1. Verreries et appareillages

Les différents verreries et appareillages utilisés sont mentionnés dans le Tableau n° 7:

Tableau n° 7: Verreries et appareillages utilisés.

Appareillages	Verreries et autres
Autoclave (SAMO Clave)	Ballons
Agitateur (RTC Basic)	Béchers
Bain marie (MEMMERT)	Boîtes de Pétri
Balance (SARTORIUS Basic)	Burettes
Centrifugeuse (SIGMA Laborzentrifigen)	Capsules
Conductimètre (PHYWE)	Creusets
Etuve (MEMMERT)	Eprouvettes
Four à moufle (HERAEUS instruments)	Erlenmeyers
Four Pasteur (MEMMERT)	Fioles jaugées
Incubateur (MEMMERT)	Micropipette (1000 µl)
Moulinex	Pipettes
Microscope optique (B-350 Optika)	Pipettes Pasteur
pH- mètre (SCHOTT GERATE CG-822)	Tubes à essai
Refractomètre (ABBE)	Réfrigérants
Spectrophotomètre (SHIMADZU UV-1202)	Dessiccateurs
	Entonnoirs
	Barreaux magnétiques

III.3.3.2. Produits et milieux de culture

Les produits et les milieux de culture utilisés sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau n°8: Produits et milieux de culture utilisés.

Produits	Milieux de culture
Acide sulfurique (H_2SO_4)	
Chlorure de sodium (NaCl) (0,1N)	Baird parker;
DMSO (0,5%),	Hecktoen;
Eau distillée (H_2O)	Gélose nutritive;
Eau oxygénée (H_2O_2)	Mueller Hinton;
Eau physiologique	Bouillon nutritif ;
Ethanol (C_2H_5OH) (95%)	TSI ;
Fuschine ($C_{20}H_{20}ClN_3$)	Mannitol-Mobilité
Hydroxyde de potassium (KOH) (0.1N)	
Hydroxyde de sodium (NaOH) (0.1N)	
Méthanol (CH_3OH) (95%)	
Phénol phtaléine ($C_{20}H_{14}O_4$) (0,2%)	
Violet de gentiane ($C_{25}H_{30}ClN_3$)	
Dihydrate de chlore de baryum ($BaCl_2$) (1.175%)	

NB : La composition des milieux de culture est donnée dans l'**annexe n°6**.

III.4. Méthodes

III.4.1. Protocole expérimental

Les étapes de réalisation de ce travail sont décrites dans le protocole expérimental présenté dans la **figure n°06**.

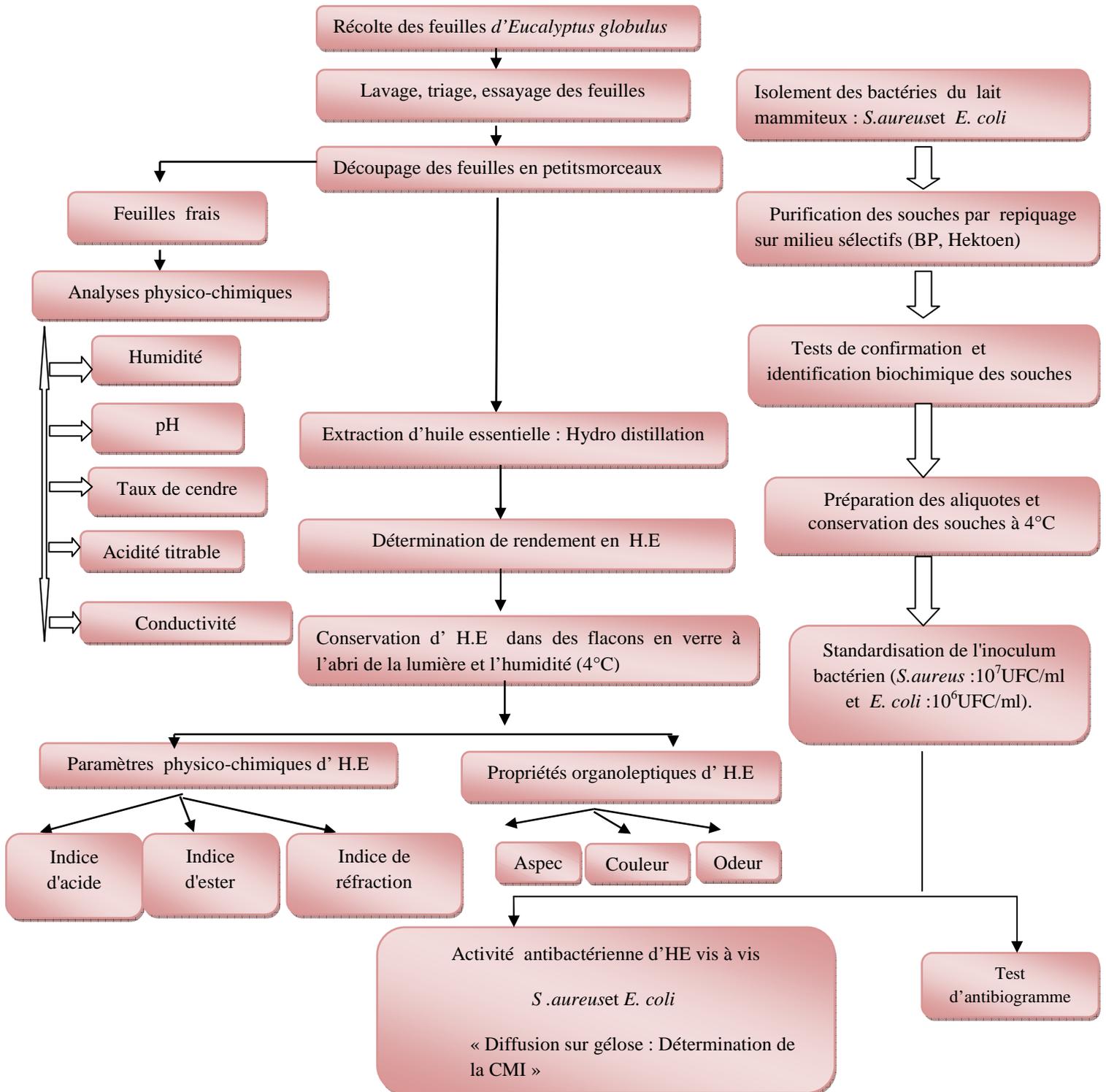


Figure n°06 : Schéma représentatif des démarches expérimentales réalisées.

III.4.1.1. Analyses physicochimiques des feuilles d'*Eucalyptus*.

a. Détermination de la teneur en eau

➤ Principe

La teneur en eau est mesurée en déterminant la perte de poids de l'échantillon après son séchage dans l'étuve (Andigie *et al.*, 1978).

➤ Mode opératoire

Dans des creusets préalablement pesés et tarés, 5g du zeste du fruit frais découpés en petits morceaux ont été ajoutés puis ces creusets ont été placés dans l'étuve à 105 °C. Après 3 heures de séchage, les creusets ont été retirés, placés dans un dessiccateur et pesés après refroidissement. L'opération a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un poids constant (AOAC, 2000).

➤ Expression des résultats

La teneur en eau est calculée selon la formule suivante (AOAC, 2000) :

$$TE = [P_1 - P_2 / P_0] \times 100$$

Dont :

TE: Teneur en eau (%) ;

P₀ : Poids de la prise d'essai (g);

P₁ : Masse avant étuvage (g) ;

P₂ : Masse après étuvage (g).

b. Détermination du taux de cendres

➤ Principe

Les cendres sont le résidu de composés organiques après incinération d'un produit dans four à moufle à 600 C° jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres (Linden, 1981).

➤ Mode opératoire

Dans des capsules en porcelaine, 10 g d'échantillon frais découpés en petits morceaux ont été pesés et placés dans un four à moufle à 600°C pendant 5 heures. Jusqu'à l'obtention d'une couleur grise, claire ou blanchâtre. Juste après calcination, les prises d'essais ont été placées dans un dessiccateur avant la pesée (AOAC, 2000).

➤ **Expression des résultats**

Le taux de cendres est calculé par la différence de poids avant et après incinération par la formule suivante (AOAC, 2000) :

$$TC = [P_2 - P_1 / P_0] \times 100$$

Dont :

TC : Taux de cendres (%) ;

P₀ : Poids de la prise d'essai (g) ;

P₁ : Poids des creusets vides (g) ;

P₂ : Poids des échantillons après incinération avec creusets (g).

c. Détermination du pH

➤ **Principe**

Le pH est mesuré par un pH-mètre dont sa valeur est en fonction de la concentration des ions hydronium présents dans la solution (Geoffrey, 2011).

➤ **Mode opératoire**

❖ **Préparation de la solution à analyser**

Pour la préparation de la solution à analyser, 100 ml d'eau distillée ont été ajoutés à 10 g d'échantillon frais découpés en petits morceaux. Le tout a été agité pendant 5 minutes (AOAC, 2002).

❖ **Mesure du pH**

La mesure a été réalisée en plongeant l'électrode du pH mètre dans la solution à tester (AOAC, 2002).

➤ **Expression des résultats**

Pour déterminer la valeur moyenne du pH, plusieurs lectures ont été réalisées.

d. Détermination de l'acidité titrable

➤ **Principe**

L'acidité titrable est déterminée par neutralisation de l'acide présent dans une quantité connue (poids ou volume) d'échantillon en utilisant une base (NaOH).

L'évaluation se fait par titrage en utilisant un indicateur de couleur phénol phtaléine (Nielsen, 2010).

Le volume du titrant ainsi que la normalité de la base et le volume ou le poids de l'échantillon sont utilisés pour calculer l'acidité titrable exprimé par l'acide organique prédominant (Nielsen, 2010).

➤ Mode opératoire

❖ Préparation de la solution à analyser

La solution obtenue préalablement pour le dosage du pH a été utilisée pour le dosage de l'acidité titrable.

❖ Mesure de l'acidité

L'acidité a été mesurée par neutralisation de l'acidité totale libre contenue dans 25 ml d'extrait obtenu précédemment avec une solution de NaOH (0.1 N) jusqu'à atteindre un pH de 8,1 en présence de phénol phtaléine comme indicateur de couleur (AOAC, 2002).

➤ Expression des résultats

L'acidité titrable exprimée par rapport à la teneur en acide gallique est calculée selon la formule suivante (Moufida et Marzouk, 2003) :

$$\text{Acidité titrable (g / l)} = N_b \times V_b \times M / V_a \times P$$

Dont :

N_b : Normalité de l'hydroxyde de sodium ;

V_b : Volume de Na OH (chute de burette) (ml).

M : Masse moléculaire de l'acide.

V_a : Volume d'échantillon utilisé (ml).

P : Nombre de protons portés par l'acide.

e. Détermination de la conductivité électrique

➤ Principe

La conductivité électrique exprime l'aptitude de la solution aqueuse électrique à conduire un courant électrique. Elle est en corrélation avec la teneur en sels solubles (Rodier, 1997).

➤ **Mode opératoire**

L'électrode de conductimètre a été plongée dans une solution à 20 % de matière sèche (Amellal, 2008).

➤ **Expression des résultats**

La lecture de la conductivité a été faite directement sur l'afficheur du conductimètre (Amellal, 2008).

III.4.1.2.Extraction d'huile essentielle (H. E)

L'extraction de l'H.E est effectuée selon la technique de **Bachelot et al (2006)** ; 100 g de feuilles d'*Eucalyptus* broyées sont introduits dans un ballon contenant 500 ml d'eau distillée. L'ensemble est porté à l'ébullition pendant 3 à 4 heures (Voir **Figure n°07**), les vapeurs chargées de substances volatiles traversent le réfrigérant, se condensent puis elles sont récupérées dans une ampoule à décanter, l'eau et l'HE se séparent par différence de densité.

L'HE extraite est conservée à une température voisine de 4 C° dans des flacons en verre opaques, fermés hermétiquement pour les préserver de l'air, de la lumière et des variations de température qui sont les principaux agents de dégradation.

Rendement en huile essentielle est estimé par le rapport entre le poids d'HE extraite et le poids de la biomasse végétale à traiter. Le résultat est exprimé en pourcentage (%) massique et calculé par la formule suivante (**Bachelot et al, 2006**)

$$R = (P_h / p_v) \times 100$$

R: Rendement en huile essentielle (%).

P_h: Poids d'huile essentielle (g).

P_v: Poids de la biomasse végétale (g).



Figure n° 07: Photo du montage d'Hydro distillateur.

III.4.1.3. Estimation des paramètres physicochimiques d'huile essentielle des feuilles d'*Eucalyptus globulus*.

a. Indice de réfraction

➤ Principe

C'est la mesure de rapport entre le sinus de l'angle d'incidence de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante (AFNOR, 2000).

➤ Mode opératoire

L'indice de réfraction a été déterminé par un réfractomètre ABBE à une température fixée à 20°C, selon la méthode AFNOR (1986), qui consiste à :

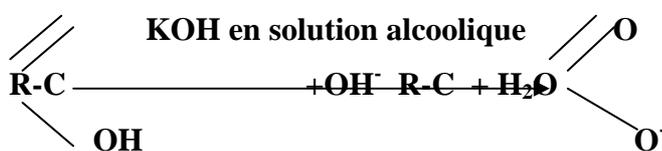
- Etalonner le réfractomètre avec l'eau distillée dont son indice de réfraction est égale à 1,333 ;
- Déposer entre les deux prismes de l'appareil quelques gouttes d'huile, ensuite ajuster les deux zones claire et sombre et lire directement l'indice de réfraction et le % en matière sèche de l'huile à l'aide de deux échelles.

b. Indice d'acide

➤ Principe

Indice d'acide d'un corps gras est la quantité de potasse en milligrammes, nécessaire pour neutraliser l'acidité contenue dans un gramme de corps gras (Gavrilovic *et al*, 1996).

La teneur en acides libres des corps gras (graisses, beurre, huiles) augmente avec le temps. L'indice d'acide est déterminé par le dosage direct ou indirect, à l'aide de potasse alcoolique de concentration connue, le corps gras étant mis en solution dans un solvant organique à une concentration voisine de $40\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Gavrilovic *et al*, 1996).



Acide gras

Ion carboxylate

Le dosage direct a lieu en présence de phénolphthaléine : virage de l'incolore vers le rose. Lors d'un dosage indirect, le corps gras est dissous dans un excès précis de potasse alcoolique, l'excès est dosé par une solution d'acide chlorhydrique à concentration connue, en présence de phénolphthaléine : virage du rose à l'incolore (Gavrilovic *et al*, 1996).

➤ Mode opératoire

Dans un ballon ou une fiole, on introduit la prise d'essai ($2\text{g}\pm 0,05$), puis on ajoute 5ml d'éthanol (95%) et 5 gouttes de solution de phénolphthaléine (0,2%); le liquide est neutralisé avec la solution éthanolique d'hydroxyde de potassium (0,1N) contenue dans une burette, jusqu'à obtention d'une couleur rose; on peut réserver éventuellement le ballon et son contenu pour la détermination de l'indice d'ester (AFNOR, 1986).

➤ Expression des résultats:

L'indice est donc donné par la formule suivante:

$$\text{IA} = 5,61 \text{ V/m}$$

Dont :

IA : Indice d'acidité.

V : Le volume de la solution d'hydroxyde de potassium (ml),

m : La masse de la prise d'essai (g).

c. Indice d'ester

➤ Principe

L'indice d'ester est le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters dans 1 g d'huile essentielle (Coutouly *et al.*, 2006).

➤ Mode opératoire

Dans un ballon contenant la solution utilisée pour la mesure d'indice d'acide, 25ml d'une solution d'hydroxyde de potassium à 0,5 N ont été ajoutés, puis le réfrigérant a été adapté et placé sur le chauffe ballon. On laisse chauffer pendant une heure, on laisse refroidir, puis on démonte le réfrigérant. Après, 20 ml d'eau ont été ajoutés avec 5 gouttes de la solution de phénolphaléine à 20%. L'excès d'hydroxyde de potassium a été titré avec la solution d'acide chlorhydrique (0,5ml); parallèlement, un essai à blanc a été effectué dans les mêmes conditions, en remplaçant la solution provenant de l'indice d'acide par 5ml d'éthanol (AFNOR, 1986).

➤ Expression des résultats:

L'indice d'ester est calculé par la formule:

$$I_E = 28,05/m (V_0 - V_1)$$

Dont :

I_E : Indice d'ester.

V₀ : Le volume de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour l'essai à blanc (ml).

V₁ : Le volume de la solution d'acide chlorhydrique utilisé (ml).

m : La masse de la prise d'essai (g).

III.4.1.4. Activité antibactérienne des feuilles d'*Eucalyptus globulus*

III.4.1.4.1. Identification et confirmation des souches

Une suspension bactérienne d'*E. coli* et de *S. aureus* et quelques colonies ont été ensemencés séparément dans des boîtes de Pétris contenant leurs milieux sélectifs (Hecktoen, Bp). Les boîtes ont été par la suite incubées à 37°C pendant 24 h.

Nous avons tenu de vérifier la pureté des souches par des caractéristiques morphologique, et quelques tests biochimiques.

Après ensemencement des bactéries sur leurs milieux sélectifs, elles sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

L'étude des caractères morphologiques sont recherchés par la coloration de Gram et l'examen microscopique.

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de diviser les bactéries en deux classes : Gram négatif et Gram positif. Elle permet l'observation du mode de regroupement, la forme des cellules bactériennes, et le type de paroi (Hellal, 2011).

La coloration de Gram est réalisée selon la méthode décrite par Delarras, (2007) (Annexe n°02).

Des tests biochimiques complémentaires ont été réalisés pour la confirmation des souches étudiées:

➤ Test de catalase

En présence d'oxygène moléculaire, certaines réactions métaboliques conduisent à la formation d'eau oxygénée. La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et oxygène.

Cette activité a été réalisée selon le protocole expérimental décrit par Prescott *et al*(2003). Ce test consiste à mettre une colonie prélevée du milieu gélosé à l'aide d'une anse stérile sur une lame de verre contenant une ou deux gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes.

Le dégagement de bulles de gaz (d'oxygène) signifie qu'il y a production de l'enzyme catalase et que le test est positif.

➤ *Test de l'oxydase*

a. Principe

Le cytochrome oxydase assure la fixation de l'oxygène moléculaire sur le cytochrome réduit. La recherche de cette enzyme est faite en utilisant des disques commercialisés (ox), imprégnés d'oxalate de N-diméthylparaphénylène diamine, oxydé par le cytochrome C, se transforme en composé violet foncé (**Delarras, 2007**).

b. Technique

Le disque (ox) a été déposé sur une lame propre et imbibé avec une goutte d'eau distillée stérile. Une colonie a été prélevée à partir du milieu à l'aide d'une anse de platine puis déposée sur le disque (**Delarras, 2007**).

c. Lecture

En présence de l'oxydase (dans le cas d'une bactérie oxydase positive), la coloration violet foncé apparaît immédiatement ou en quelques secondes (**Delarras, 2007**).

➤ *Test du milieu TSI*

La gélose TSI (Triple SugarIron) permet la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène. Après ensemencement de culot par piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées, l'incubation est réalisée à 37 °C pendant 24h (**Marchal et Bourdon, 1973**).

a. Lecture :

- Fermentation du glucose : Glucose+ : culot jaune
Glucose- : culot rouge
- Fermentation du lactose : pente rouge (Lac, Sac-)
Pente jaune (Lac, Sac+)
- Fermentation de H₂S : production d'une coloration noire entre le culot et la pente (**Marchal et Bourdon, 1973**).

➤ Mannitol-mobilité

a. Principe

Ce test est vérifié dans le milieu mannitol-mobilité, qui permet la recherche de la mobilité et la fermentation du D-mannose par les bactéries, qui conduit à la formation d'acides à chaînes très courtes (acide acétique, acide formique) (Marchal *et al.*, 1982).

b. Technique

Un ensemencement a été effectué par piqure centrale, à partir de culture en milieu semi-solide puis un étuvage a été réalisé à 37°C pendant 24 heures (Marchal *et al.*, 1982).

c. Lecture

Si la bactérie est mannitol (+), et mobilité est (+), on observe le jaunissement du milieu (Marchal *et al.*, 1982).

➤ Test de l'ONPG

a. Principe

Ce test prouve l'existence d'une galactosidase chez la souche, donc la possibilité de la fermentation du lactose (Djalouat, 1990).

b. Technique

On prépare une suspension bactérienne, on ajoute un disque d'un galactoside artificiel d'ONPG. On incube jusqu'à 24h à 37°C (Benslimani, 2006).

c. Lecture

Test+ : production d'ONPG de couleur jaune (Benslimani, 2006).

III.4.1.4.2. Préparation des aliquotes et conservation

A partir des souches identifiées, nous avons fait des ensemencement dans des boîtes de Pétri contenant la gélose nutritive, ces dernières ont subi une incubation à 37°C pendant 24 heures.

Les boîtes de pétri ensemencées seront conservées à 4 °C et les repiquages se feront tous les 15 jours.

III.4.1.4.3. Standardisation de l'inoculum

La standardisation de l'inoculum se réalise selon la Méthode décrite par Benzeggouta, (2005) et Bougandoura, (2011).

- A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement (ayant au maximum 24h), l'aide d'une anse de platine ou d'une pipette pasteur scellée, quelques colonies bien

isolées et parfaitement identiques ont été prélevées et mise en culture dans 10 ml de bouillon nutritif pendant 18 heures à 37 °C.

- Nous avons effectué des dilutions de la suspension dans l'eau physiologique afin de standardiser l'inoculum .ce dernier doit être ajusté a une densité optique entre 0,08-0,1 à 625 nm, Qui équivalente à 0,5McFarland. Cet étalon se prépare en versant 0,5 ml d'une solution de BaCl₂dihydraté à 1 % dans une éprouvette, et compléter à 100 ml avec du H₂SO₄à 1% ainsi l'étalon doit présenter un DO de 0,08 a 0,1 lue à 625 nm.
- Ajuster l'inoculum, soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou l'eau physiologique stérile, s'il est trop fort.
- L'inoculum a environ 10⁸ UFC/ml. Les dilutions de 1/10 pour *S. aureus* et *E. coli* ont été réalisées dans l'eau physiologique stérile pour obtenir successivement 10⁷ UFC/ml et 10⁶UFC/ml.
- L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculumstandardiser les suspensions bactériennes à 10⁶germes / ml (**Duraffourdet al, 1990**).

III.4.1.4.4. Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite d'*Eucalyptus globulus*

L'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* est estimée en adoptant la technique de diffusion sur disques ; Elle consiste à déposer des disques imprégnés d'huile dans une gélose préalablement ensemencé par le germe testé (*S. aureus* ou *E. coli*).

III.4.1.4.4.1.Préparation des dilutions des huiles essentielles

Différentes dilutions d'huile essentielle étudié(1/2, 1/4, 1/8) ont été préparées avec le méthanol. Ces dilutions d'huile essentielle et l'huile brute ont été testées sur les 02 souches bactériennes citées précédemment.

III.4.1.4. 4. 2.Réalisation de la méthode de diffusion sur disques

L'effet de l'huile sur les souches testés est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition et en fonction du diamètre d'inhibition, la souche sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou résistante, due à la présence d'une compétition entre la croissance de la souche et la diffusion du produit à tester (**Sqalli et al.,2007 et Zerroug et al., 2011**).

L'ensemencement d'un inoculum de 1 ml (10^6 UFC/ml) à partir d'une culture jeune (18h) est réalisé en surface du milieu solide (Mueller Hinton) préalablement coulé dans des boîtes de Pétri.

Après avoir éliminé l'excès de l'inoculum, des disques stériles (6 mm de diamètre) imprégnés d'une quantité de 5 μ l d'échantillon (HE et ses dilutions) sont déposés. Les boîtes sont ensuite fermées pour permettre la diffusion de l'huile pendant 30 min à une température ambiante. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 h (**Benzegouta, 2005 ; Pibiri, 2006**). Des boîtes témoins ont été préparées avec le même mode opératoire et le disque est imprégné du méthanol (**Benzegouta, 2005 ; Pibiri, 2006 ; Sqalli *et al.*, 2007 ; Hellal, 2011**).

Après incubation, l'apparition d'un halo translucide autour de disque de même couleur que la gélose stérile et dont le diamètre est mesuré en mm cela veut dire l'absence de croissance bactérienne exprimant une activité antibactérienne positive. La sensibilité des différentes souches vis-à-vis d' H.E étudiée est classée selon le diamètre d'inhibition (**Benzegouta, 2005 ; Pibiri, 2006**). La lecture se fait par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'une règle (mm) et l'estimation du coefficient d'inhibition en appliquant la formule suivante :

Non sensible (-) ou résistante : $\emptyset < 8$ mm ;

Sensible (+) : $9 < \emptyset < 14$ mm ;

Très sensible (++) : $15 < \emptyset < 19$ mm ;

Extrêmement sensible (+++) : $\emptyset > 20$ mm ;

Des disques d'antibiotiques de Métronidazole, de Colistin, de Ceftazidime et de Streptomycine ont été utilisés pour l'évaluation de la sensibilité des microorganismes testés dans ce travail. Cet examen se fait de la même manière avec la méthode de diffusion des disques sur milieu gélosé, où l'huile est remplacé par les antibiotiques (**Leclec *et al.*, 1983 ; Prescott *et al.*, 2007**).

III.4.1.5. Détermination de Concentration Minimale Inhibitrice

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la concentration nécessaire, pour inhiber totalement la croissance d'un nombre déterminée de germes, Après un temps d'incubation donné (**Hulin *et al.*, 1998 et Guinoiseau, 2010**). La détermination de la CMI est réalisée par le mode opératoire décrit par **Mebarki (2010)**.

III.4.1.5.1. Préparation de la gamme des dilutions de l'HE d'*Eucalyptus globulus*

La figure n°08 présente la gamme de 7 dilutions (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.06 et 0.03%) a été préparée pour l'HE des feuilles d'*Eucalyptus globulus*.

✓ Mode opératoire

A l'aide d'une pipette prélevé un volume de 0,5 ml de DMSO (0,5%), verse dans une éprouvette en verre et ajouter 1ml de l'HE d'eucalyptus , puis complète par le Mueller Hinton (M H) jusqu'à 50ml, cette quantité est divisé en deux, donc 25ml est coulée dans les boites de 2% et la quantité qui reste (25ml) complète avec M H jusqu'à 50ml puis divisé cette quantité en deux, 25ml est coulée dans les boites de 1% et la quantité qui reste (25ml) complète avec 50ml de M H, devise cette quantité en deux ,25ml (0,5%) coulée dans les boites et la partie qui est resté on fait les mêmes étapes pour obtenir les autres dilutions des HE.

Un témoin négatif (DMSO) et réalisé. Incubation des boites de Pétri se fait à 37 C° /24h.

La lecture des résultats s'effectue visuellement par observation de la croissance ou l'inhibition de la croissance des microorganismes par rapport à leur développement sur les boites témoin.

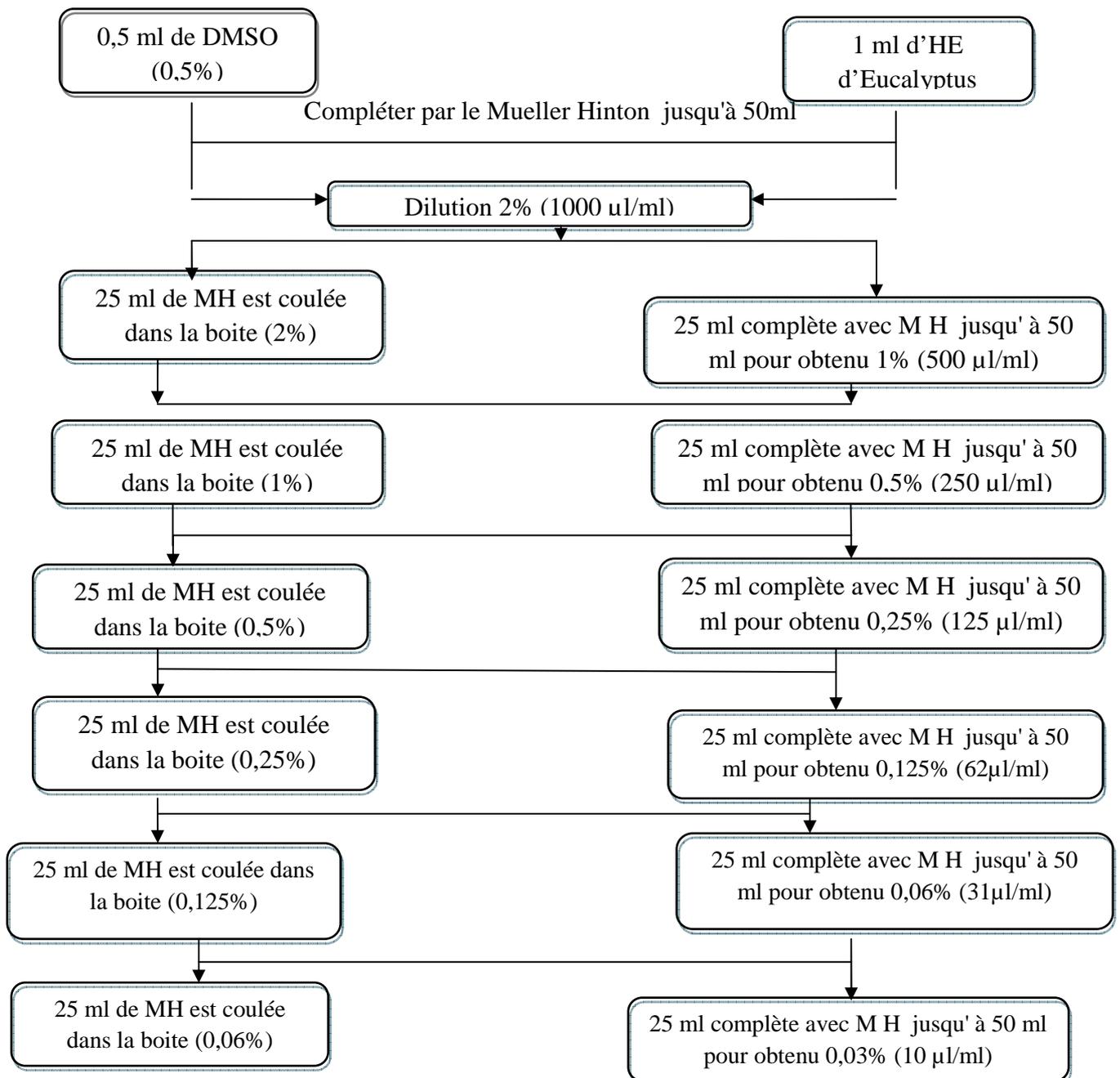


Figure n°08: Préparation de la gamme des dilutions de l'HE *d'Eucalyptus globulus*.

Chapitre IV

Résultats et discussions

IV.1. Résultats des analyses physico-chimiques des feuilles d'*Eucalyptus* étudiées

Les résultats des paramètres physico-chimiques (teneur en eau, acidité titrable, pH, la conductivité électrique) des feuilles d'*Eucalyptus globulus* sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau n°9: Résultats des analyses physico-chimiques des feuilles d'*Eucalyptus*.

Paramètres	Résultats
	<i>Eucalyptus globulus</i>
Teneur en eau (%)	57,20 ±0,92
Cendres (%)	3,04 ± 0,15
pH	6,03±0,049
Acidité titrable (g/l)	0.60±0,013
Conductivité électrique (mS/cm)	13,08±0,22

IV.1.1. Teneur en Eau

Les végétaux sont connus par leur richesse en eau, elle présente une partie majoritaire de leur composition **Mohammedi(2006)**. Les analyses des feuilles d'*eucalyptus globulus* ont révélé un taux d'humidité important (57.20±0,92%) (**Tableau n°9**), cela signifie que plus de la moitié du poids des feuilles d'*eucalyptus* est constituée par l'eau et le reste représente la matière sèche **Valent (2001)**.

Notre étude a révélé un taux d'humidité 57.20%, cette valeur est inférieure par rapport à celle trouvée par **(David et Christopher, 2004)** sur *Eucalyptus globulus* d'Australie avec une teneur moyenne 86 %.

Carvalho et al., (2005), ont déterminé le taux moyen d'humidité des feuilles de romarin, il est de 9,33%. Cette valeur est largement inférieure à celle obtenue dans notre étude.

En effet **Benarab (2006)** a trouvé que le taux d'humidité de *Myrtuscommunis* est 43,72% cette valeur est inférieure à nos résultats.

La variation de la teneur en eau est due aux différentes conditions telles que : diversité des espèces, expositions aux différentes conditions pédoclimatiques, stade de maturation et répartition géographique **(Boudjellal, 2009)**.

D'après **Athamena (2009)**, les facteurs qui peuvent influencer sur la teneur en eau sont : l'âge de la plante, la période du cycle végétatif, ou même des facteurs génétiques.

IV.1.2. Taux de cendres

La teneur en cendres est un indicateur de pourcentage de la teneur minérale **valnet (2001)**.

D'après les résultats présentés dans le **tableau n° 9**, le contenu minéral des feuilles étudiées est $3,04 \pm 0,15\%$.

Le taux de cendres obtenu dans *E.globulus* est largement supérieur à celui trouvé par **(Del Rio et al.,2005)** qui est 0,5% pour l'*E.globulus* de l'Espagne .

On comparant la teneur en cendre de notre étude avec *E. grandis* avec une teneur moyenne 2.97(**Dharm et Tyagi, 2011**), nous constatons que cette dernière est presque similaire à notre valeur.

En effet **(Goel et al.,2008)** a trouvé que le taux de cendre de *T. triangulaire* est $14,20 \pm 0,58\%$ cette valeur est supérieur a nos résultats.

La variation de taux de cendre dans les plantes est fortement liée avec le type de sol, le climat, le stade de la maturité et la saison de la récolte **(Lawrence et al.,2000)**.

IV.1.3.pH

La détermination du pH, nous informe sur l'évolution de l'acidité du milieu **(Ould el hadj et al.,2001)**.

La physico-chimie des solutions permet souvent d'atteindre des grandeurs significatives sans avoir à connaître la composition détaillée du milieu. C'est le cas du pH qui est déterminé sans connaître les concentrations soit des acides et des bases qui conditionnent sa valeur **(Ribereau-Gayon,1968)**.

Le pH des feuilles d'eucalyptus globulus est de $6,03 \pm 0,049$ présenté dans le **tableau n°9**.

Selon **Kesbi (2011)**, le pH d'*eucalyptus globulus* de la région d'Ouargla est 4.86. Cette valeur est pratiquement inférieure à celle de nos échantillons.

On comparant le pH de notre étude avec *Eucalyptus saligna* avec une teneur moyenne 5.18 **(Rhoades et Binkley , 1995)** nous constatons que cette dernière est inférieure par rapport à notre étude.

En effet **(Baber et al., 2006)** a trouvé que le pH d'*Eucalyptus camaldulensis* est 8.39 cette valeur est supérieure à nos résultats.

D'après **Messaïd (2008)**, les différences notés sont tributaires d'un grand nombre de facteurs parmi lesquels le climat, les conditions de travail, les erreurs de manipulation, la variété utilisée.

IV.1.4. Acidité titrable

L'acidité titrable nous renseigne sur la quantité en acides organiques présents dans l'échantillon (**Ferhoum, 2010**). Une forte acidité est souvent associée à une mauvaise qualité de la matière première. Comme il a été rapporté par **Booij et al, (1992)**.

Les feuilles étudiées présentent une acidité de $0.60 \pm 0,013 \text{g/l}$ (**tableau n°9**).

On comparant la teneur de l'acidité de notre étude avec *Eucalyptus saligna* avec une teneur moyenne $0,49 \pm 0,02 \%$ (**Rhoades et Binkley, 1995**) nous constatons que cette dernière est inférieure par rapport à nos résultats.

La comparaison de l'acidité titrable des feuilles *Aloevera* qui est égale à $0,0723 \pm 0,001\%$ (**Thurre, 2007**) à nos résultats reflète une différence appréciable.

La variation de l'acidité est due à la différence des conditions agro-climatiques (**Iqbal et al., 2010**).

IV.1.5. Conductivité électrique

La conductivité électrique exprime l'aptitude de la solution aqueuse à conduire un courant électrique. Elle est en corrélation positive avec la teneur en sels solubles. La teneur de ces derniers dans les solutions diluées, est proportionnelle à la conductivité (**Amellal, 2008**).

La conductivité électrique des feuilles étudiées est $13,08 \pm 0,22 \text{mS /cm}$ (**Tableau n°9**).

En comparant la valeur de la conductivité électrique des feuilles étudiées avec *Rubiatinctorium L.* ($84,10 \text{ mS /cm}$) nous constatons que cette dernière est largement supérieure à celle de nos échantillons (**Mastelic, 2001**).

Selon **Karim et al (1977)**, la conductivité électrique de *Carum carvi Lest* 53 mS /cm . Cette valeur est pratiquement supérieure à nos résultats.

Selon **Rodier (1997)**, la conductivité électrique est influencée par le pH de la solution, la valence des ions et le degré d'ionisation.

IV.2. Rendement en huile essentielle des feuilles d'*eucalyptus*

Les résultats des rendements en H.E d'*eucalyptus* par la méthode d'hydro distillation sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n°10 : Résultats de rendement en H.E *d'eucalyptus* par la méthode d'Hydrodistillation.

Paramètres	Résultats
	<i>Eucalyptus globulus</i>
Rendement en HE(%) (Hydrodistillation)	1.48±0.84

L'hydrodistillation est réalisée sur les feuilles *d'eucalyptus globulus* placées dans un distillateur.

Le rendement moyen des feuilles étudiées est (1.48±0.84%) (**Voir tableau n°10**) .on résultants que le rendement *d'Eucalyptus globulus* obtenue par la méthode d'Hydrodistillation à l'échelle du laboratoire pendant 4 heures (**Figure n°10**) est supérieur à celui trouvé par (**Kesbi, 2011**) qui est 0.51% pour la même espèce.

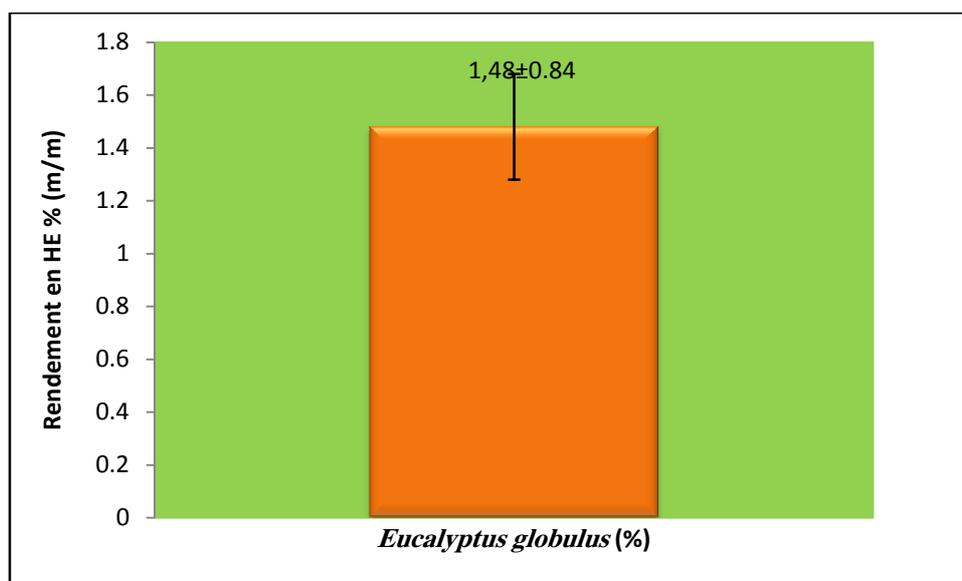


Figure n°10:Rendement d'H.E des feuilles étudiées obtenu par l'Hydrodistillation.

Hmiri et al.(2011) a obtenu un rendement en HE de *M.pulegium* qui est 3.3%, ce résultat est nettement supérieur à celui trouvé dans notre étude.

Emami et al. (2007) ont observés un rendement de 0,23 ± 0,02 % pour les feuilles de *Juniperus communis*. Ce taux est nettement inférieur à celui trouvé dans notre étude.

En comparant nos résultats avec celui obtenue par **Mohammedi (2006)** sur les feuilles de *Lavandula steochas* de la région Oum Alo qui est 2%. En constatons que cette dernière est supérieure par rapport à notre étude.

Pour optimiser le rendement en HE, plusieurs études ont été réalisées sur des parties végétales fraîches et la concentration en eau du matériel végétal à été prise comme facteur de variation. Les résultats obtenus ont démontré que les rendements obtenus sont très inférieurs chez les parties végétales fraîches. Ceci pourrait expliquer par une grande teneur en eau.

Néanmoins, les rendements ont été optimisés pour les parties végétales qui ont été préalablement séchées pendant 15 jours. Toutes les extractions qui ont été réalisées pour les parties végétales séchées au-delà de cette période ont engendré des rendements significativement inférieurs. Ce problème est lié à l'évaporation des composés volatils lors d'un séchage prolongé (**Bendimerad et al., 2005**).

Le rendement d'extraction en HE semble varier éventuellement au sein de la même espèce et d'un milieu à un autre et elle est sujette à de nombreuses variations ; plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de ces variations: l'âge des feuilles, celui de l'arbre, la partie de la plante soumise à l'extraction, le degré de séchage du matériel végétal avant distillation et la période de récolte, la nature du sol et du climat, l'influence de ce dernier facteur a été observée dans le cas de plusieurs espèces(**Bendimerad et al., 2005**).

De plus, cette différence de teneur en HE peut être liée à plusieurs facteurs tels que le stade de développement et la saison. La méthode d'extraction, le temps d'extraction et la nature des solvants utilisés pour l'extraction, peuvent avoir une influence sur le rendement d'extraction en HE (**Khenaka, 2011**).

IV. 2.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractères organoleptiques des H.Es des feuilles d'*eucalyptus* obtenu par l'Hydrodistillation sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n°11: Propriétés organoleptiques des H.Es des feuilles d'*Eucalyptus* obtenues par l'hydrodistillation.

Méthode	Hydrodistillation		
	Aspect	Couleur	Odeur
Espèces <i>Eucalyptus globulus</i>	Liquide, limpide, fluide et mobile	Transparent, jaune très pale	fraîche et épicée

D'après le **Tableau n°11**, on remarque que l'huile essentielle que nous avons extraite d'eucalyptus représente des caractéristiques organoleptiques comparables à celles signalées dans le recueil de normes françaises (**AFNOR ,2000**).

Les caractères organoleptiques de l'HE d'*eucalyptus*, sont identiques à ceux obtenues par **Kesbi (2011)**.

IV.3. Indices physicochimiques des huiles essentielles

Les résultats d'indice de réfraction, Indice d'ester, Indice d'acide sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau n°12 : Résultats des indices physico-chimiques des huiles essentielles des feuilles étudiées.

Paramètres	Résultats
	<i>E.globulus</i>
Indice réfraction	1,472±0.28
Indice d'ester	14.025±0.5
Indice d'acide	8.69±0.9

IV.3.1. Indice de réfraction

➤ Indice de réfraction

L'indice de réfraction c'est le rapport entre la célérité de la lumière dans le vide et la célérité de la lumière dans le milieu considéré. Ce rapport indique la capacité des H.Es à réfléchir la lumière. La valeur de L'indice de réfraction d'*Eucalyptus* correspondent aux

normes d'AFNOR (1,4700-1,4780). par contre elle est inférieure à celle obtenue par **Kesbi (2011)** qui est 1.4877 pour la même espèce.

En comparant nos résultats avec celui obtenue par (**Gildo, 2006**) sur les feuilles de *Glycyrrhizaglabra (L)* qui est de 1. 4614. On constatant que ce dernier est inférieure par rapport à notre étude.

L'indice de réfraction dépend de la composition chimique qui augmente en fonction des longueurs des chaînes d'acides ,de leur degrés d'insaturation et de la température .Il varie essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés .Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice élevé (**Gildo, 2006**).

Le faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques.

IV.3.2. Autres indices(indice d'acide, d'ester)

L'indice d'acide, d'ester et l'indice d'iode sont déterminé par la norme internationale AFNOR(1986) et AFNOR(1995).

Le **Tableau n°12** représente les différents indices physico-chimiques d'HE d'*eucalyptus*.

Concernant l'indice d'acide nos résultats sont dans l'ensemble conformes à la norme AFNOR (2000) qui est au maximum 10.mais elle est supérieure par rapport à celle trouvé par **Kesbi(2011)** qui est 1.96 pour la même espèce.

En comparant nos résultats à celui obtenue par (**Farah et al.,2009**) pour le *Thymus fontanesii Boiss et Reut* qui est 8.4, on constate que cette dernière est presque similaire à notre étude.

La valeurs de l'indice d'ester de nos H.E d'*eucalyptus globulus* est 14.025, cette dernière est inférieureà celui obtenue par (**Farah et al., 2009**) pour le *Thymus fontanesiiBoisset Reut* qui est de 16.83.Et ainsi très faible par rapport à la valeur citée par la norme internationale AFNOR(2000)qui est de53-76.

Selon **Gildo, (2006)**,les paramètres physicochimiques sont influencés par les conditions édaphiques et climatiques ainsi que les conditions de culture des plantes ; cela fait partie aussi de la complexité de la notion de chémotype.

IV. 4.L'activité antibactérienne

IV. 4.1. Pré-identification des souches utilisées.

Les résultats des tests de confirmation des trois souches bactériennes testées sont illustrés dans du tableau n°13. Ces résultats ont permis la confirmation des deux espèces bactériennes étudiées.

Tableau n°13 : Résultats de la pré-identification.

	Gram	Forme						
			Catalase	Oxydase	ONPG	TSI	Mannitol	Mobilité
<i>S.aureus</i>	+	Coques	+	-	-	+	+	-
<i>E. coli</i>	-	Coccobacilles	+	-	+	-	+	+

+ : Positif ;

- : Négatif ;

IV.4.2. Résultats d'antibiogramme

Les résultats d'antibiogramme sont présentés dans le tableau n°14.

Tableau n°14 : Résultats des antibiotiques sur les deux souches testées.

ATB	<i>Ceftazidime</i> (CA30)		<i>Colistin</i> (CL10)		<i>Streptomycine</i> (S10)		<i>Métronidazole</i> (MTZ 5)	
	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats	Diamètres (mm)	Résultats
<i>S.aureus</i>	20	Très Sensible	18	Très Sensible	12	S	13	S
<i>E.coli</i>	15	S	12	S	13	S	8	R

S : Sensible

R : résistante

L'antibiogramme vise à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité de quatre antibiotiques par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le **Figure n°11**.

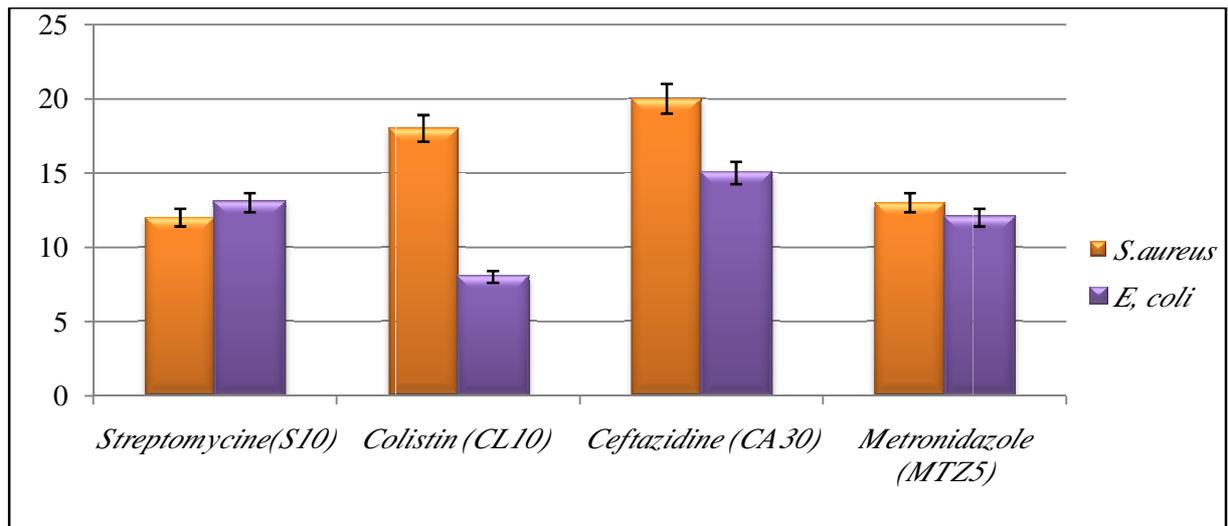


Figure n°11 : Diamètres des zones d'inhibition obtenus par l'antibiogramme sur *S.aureus* et *E. coli*

D'après la **figure n°11**, le meilleur effet antibactérien vis –à-vis *S.aureus*, a été enregistré avec ceftazidime et la colistine, dont les diamètres des auréoles d'inhibition sont respectivement de : 20 et 18 mm.

La meilleure activité antibactérienne des antibiotiques testés sur *E. coli* est enregistrée avec le Ceftazidime (CA30) où on a marqué un diamètre de 15mm.

IV.4.3. Résultats de l'effet antibactérienne obtenue d'H.E d'*Eucalyptus* (gamme 1)

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'huile essentielle a été faite sur deux bactéries isolées du lait mammitieux, en adoptant la méthode de diffusion sur gélose.

Les résultats de l'activité antibactérienne sont présentés dans le tableau n°14 et la figure n°12 :

Tableau n° 15 : Diamètres des zones d'inhibition obtenus des différentes dilutions d'HE d'*E.globulus* selon la gamme 1 (1/2 ,1/4 et 1/8)vis-à –vis *S.aureus* et *E. coli*.

Dilutions HE	DZI (mm) obtenues sur <i>S.aureus</i>	DZI (mm) obtenues sur <i>E. coli</i>
1/2	19±1	17±0,9
1/4	16±0,28	15±0,54
1/8	10±0,029	10±0,28
Hb	22±0,5	22±0,38

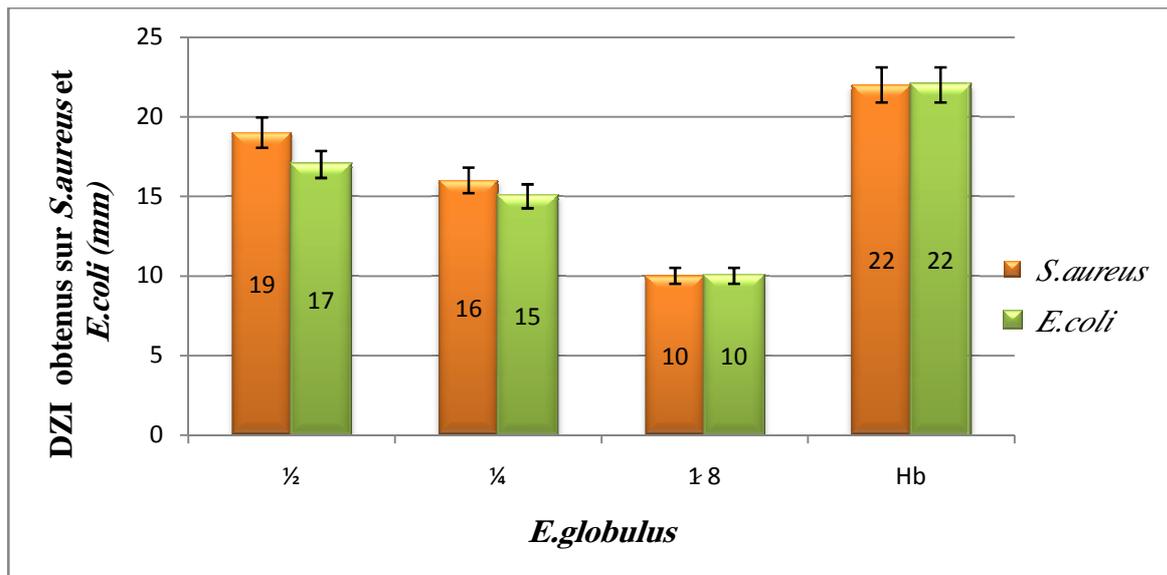


Figure n°12 : Diamètres zones d'inhibition d' H.E des feuilles étudiées sur les souches testées (gamme 1).

D'après ces résultats, on constate que l'HE brute exerce une activité inhibitrice plus élevée que ses différentes dilutions (1/2, 1/4 et 1/8) (v/v).

Des DZI de 19 ± 1 , $16 \pm 0,28$ et $10 \pm 0,029$ mm ont été obtenus respectivement pour les dilutions 1/2, 1/4 et 1/8 (v/v) sur *S. aureus*.

Vis-à-vis *E. coli*, l'HE d'*E. globulus* et les dilutions préparées ont montré en moyenne un effet inhibiteur plus intéressant. Ainsi les diamètres de différentes zones d'inhibition engendrés sont compris entre 17mm et 22mm ; Concernant les différentes dilutions, le maximum d'inhibition est marqué avec la dilution 1/2 avec un diamètre de 17mm. En revanche une faible activité a été obtenue dans la dilution 1/8 avec un DZI de 10mm.

Nos résultats montrent que l'huile essentielle d'*E. globulus* présente une bonne activité inhibitrice vis-à-vis des germes testés. Cependant, les microorganismes étudiés n'ont pas montré la même sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle. L'HE a révélé une activité antibactérienne plus importante vis-à-vis *S. aureus* que celle obtenue vis-à-vis *E. coli*. Cette constatation confirme ce qui a été rapporté par plusieurs travaux (**Franchomme et al., 1990**).

Généralement l'analyse de profil de la résistance d'*E. coli* montre que cette dernière peu sensible à l'action de l'huile essentielle d'*eucalyptus globulus* et ces dilutions, ce qui est dû à leur potentiel de résistance très élevé. La grande résistance des bactéries à Gram (-) aux HEs est liée en partie à la complexité de l'enveloppe cellulaire de ces microorganismes qui contient une double membrane, contrairement à la structure simple des bactéries à Gram (+) (**Poole, 2001**).

L'huile essentielle d'*Eucalyptus* testées a une activité non négligeable contre les bactéries. Dans la littérature, des résultats similaires ont été obtenus pour des huiles essentielles d'*Eucalyptus* d'espèces différentes. Ainsi **Oyedeji et al. (1999)** ont démontré des activités antibactériennes considérables sur les bactéries à Gram positif et négatif, **Elaissi et al. (2011)** ont décrit que l'huile essentielle de l'*Eucalyptusodorata* est la plus active contre *S. aureus*.

Nos résultats sont similaires aussi à ceux trouvés par **Rota et al. (2008)**, qui ont montré que *S. aureus* est plus sensible comparant à *E. coli* pour le chémotype à thymol de *Thymus zygis* sp. Gracilis. Cependant, **Kaloustian et al (2008)** ont trouvé que *E. coli* est plus sensible que *S.aureus* aux HE d'origan et de thym, au thymol et au carvacrol.

Pour le contrôle négatif : Nous avons constaté que le tween 80 et le tween 20 exercent une certaine répression sur la croissance des souches testées par contre l'inhibition est totale 100 % avec le DMSO et le méthanol. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus par **Gachkar et al. (2006)**. D'après ces résultats, nous avons retenu le méthanol pour la préparation des dilutions de d'HE.

IV.4.4. Résultats de l'effet antibactérien obtenu de l'huile essentielle (gamme 2)

Le tableau suivant représente les diamètres des zones d'inhibitions obtenus d'H.b et ses dilutions selon la gamme 2 (Hb, 10%, 20% et 80%).

Tableau n°16 : Diamètres des zones d'inhibitions des différentes dilutions (10% , 20% 80%) sur *S.aureus* et *E. coli*.

HE	DZI (mm) obtenues sur <i>S.aureus</i>	DZI (mm) obtenues sur <i>E.coli</i>
10%	21±0,28	20±0,38
20%	24±0,29	22±0,5
80%	28±0,5	26±0,45
Hb	32±0,5	30±0,25

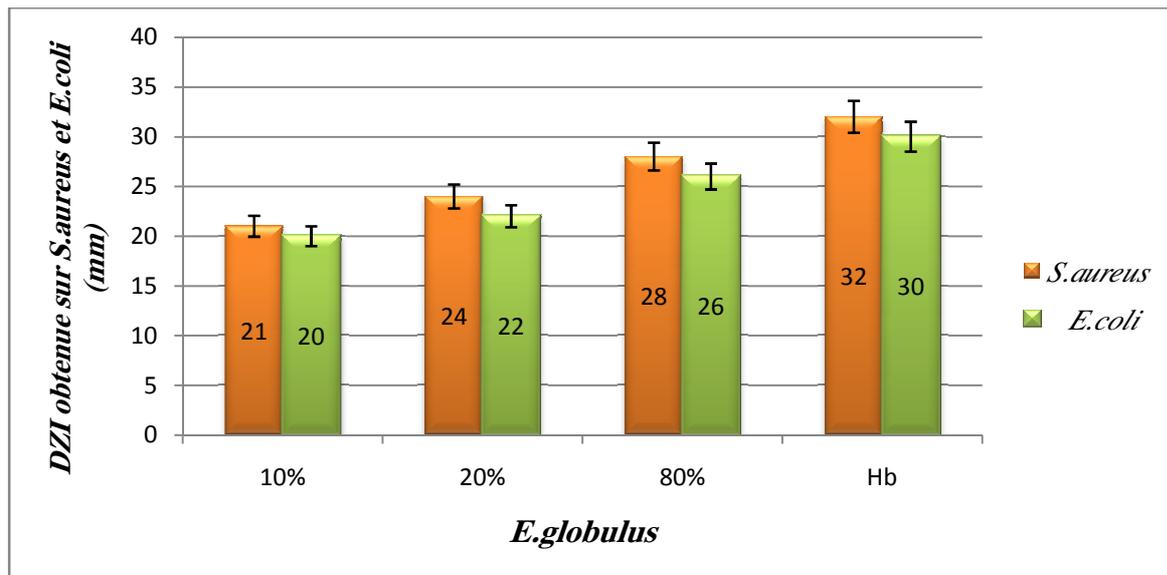


Figure n°13 : Diamètres des zones d'inhibitions obtenues sur *S.aureus* et *E. coli* (mm) (gamme 2).

D'après ces résultats, il est clair que l'H.E brute d'*E. globulus* exerce une activité inhibitrice beaucoup plus importante avec des DZI remarquables qui varient entre 30 et 21 mm et 32 et 22 mm respectivement. Le maximum d'inhibition est enregistré avec l'HE brute où les DZI notées sont 32 mm et 30 mm respectivement pour *S. aureus* et *E. coli* par rapport à ses différentes dilutions.

En comparant nos résultats aux différentes échelles fixées par **Mebarki (2010)** concernant la sensibilité des souches, on constate que *E. coli* et *S. aureus* sont extrêmement sensible à l'huile brute et ses dilutions.

Nous constatons également que l'activité est proportionnelle à la concentration des huiles essentielles plus l'huile est concentrée plus que son activité antibactérienne est meilleure. La plus grande susceptibilité de *S. aureus* vis-à-vis d'huile essentielle par rapport à *E. coli* s'expliquerait par une meilleure perméabilité d'un ou des composés actifs (**Mebarki, 2010**). D'après **Oussalah et al (2006)**, les HEs possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches bactériennes, mais d'une manière générale leurs action se déroule en trois phases qui sont : attaque de la paroi cellulaire ce qui provoque une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires, acidification de l'intérieur de la cellule microbienne et la destruction de matériel génétique.

Les bactéries à Gram positif montrent des zones d'inhibitions supérieures à celles observées chez les bactéries à Gram négatif.

Plusieurs facteurs tels que le climat, l'âge de la plante, la méthode d'extraction des HEs et leur chimiotype pourrait expliquer ces résultats (Mebarki, 2010).

En effet, Ipek *et al*(2005), ont attribué cette activité aux altérations des activités membranaires des cellules bactériennes, sous l'effet de certains composés des HEs, ces altérations sont à l'origine de modification de la perméabilité cellulaire.

Ces constatations montrent que les DZI de l'HE d'*Eucalyptus globulus* (32, 30mm) sont deux fois plus fortes par rapport à ceux obtenus par le Ceftriaxone (CA30) vis-à-vis *S.aureus* 20 mm et *E.coli* 15mm. Il est évident de conclure que les souches bactériennes utilisées dans cette étude présentent des phénomènes de résistance aux antibiotiques.

IV.4.5. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le tableau ci-dessous résume la concentration minimale inhibitrice de l'HE d'*E. globulus* sur les bactéries testées.

Tableau n° 17: La concentration minimale inhibitrice des H.E d'*E.globulus* sur les bactéries testées.

Souche	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	Pourcentage (%)
Espèce	<i>Eucalyptus</i>	<i>Eucalyptus</i>
<i>S. aureus</i>	500 $\mu\text{l/ml}$	1 %
<i>E. coli</i>	1000 $\mu\text{l/ml}$	2 %

D'après ces résultats, il est clair qu'à partir d'une concentration de 1% de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* la croissance de la souche *S. aureus* est totalement inhibée. En conséquence, la CMI de l'huile essentielle d'*eucalyptus* sur la croissance in vitro de *S. aureus* est 500 $\mu\text{L/L}$ (1%) et de pour *E. coli* est 1000 $\mu\text{L/L}$ (2%).

Une étude faite dernièrement, rapporte que les souches *E. coli* et *S. aureus* testées par l'HE d'*E. globulus*, ont présenté respectivement des zones d'inhibitions de (48.15 et 13.50 mm) et des CMI de (0.15 et 0.75 mg/ml). (Mulyaningsih *et al.*,2010); ces valeurs sont proches à ceux décrits par d'autres chercheurs (Mulyaningsih *et al.*,2010). Ces résultats, ne sont pas similaires avec les nôtres, les deux souches sont plus vulnérables à notre essence et

présentent des CMI plus inférieures (20 et 40 µg/ml), ceci est peut être attribué à la composition chimique de notre huile.

Oussalah et al (2007), ont déterminé des CMI de plusieurs HEs vis-à-vis de *S. aureus*; ils ont rapporté que parmi vingt-huit HEs testées vingt-six exhibants parmi elles l'huile essentielle d'*Eucalyptus* une CMI ≤ 0.4% vis-à-vis de la bactérie cible.

Les résultats des travaux de **Sari et al (2006)** ainsi que **Bendahou et al (2008)** montrent que la souche *P. aeruginosa* est moins sensible à l'HE d'origan que *S. aureus*.

La zone d'inhibition est interprété comme l'activité antibactérienne des huiles essentielles à partir des feuilles à la fois *E. globulus*. **Cimanga et al (2002)**; d'autres chercheurs ont rapporté que l'activité antimicrobienne d'une huile essentielle est liée à sa composition chimique. Le groupe fonctionnels de certains composés trouvés dans la plupart Les matières végétales alcool, des phénols, des terpènes et cétones sont associés pour ses caractéristiques antimicrobiens (**Farah et al., 2001; Braca et al., 2008**). **Pibiri (2006)** a démontré dans sa thèse de doctorat thèse que les huiles essentielles testées de *Satureia Montana*, *Thymus*, *Origanum vulgare* et d'écorce de cannelle dans phase gazeuse ont un effet létal sur deux souches de *S. aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, même en petites doses,

Les constituants d'huiles essentielles du genre *Eucalyptus* (Myrtaceae) avait été bien caractérisé (**Batista et al., 2006**). Espèces d'*Eucalyptus* produisent de nombreux composés volatile, en particulier les isoprénoïdes, qui sont accumulés dans les glandes distribués dans tout le parenchyme foliaire et l'écorce (**Rakotonirainy et Lavédrine, 2005**).

Le chimiotype d'*Eucalyptus globulus* est composé de 1,8-cinéole (48,6%), α-pinène (9,7%) globulol (10,9 %), *trans*-pinocarveol (10,7 %) et α-terpineol (6,6%).

La majorité de ces composants sont des monoterpènes qui sont connus par leur célébrité d'activité antimicrobienne; de plus les monoterpènes cycliques en raison de leurs caractères lipophiles ont de ce fait tendance à s'intégrer au niveau de la membrane cellulaire (**Grundy et Stille, 1985**). Ceci a pour conséquence une expansion de la membrane et une augmentation de sa fluidité, permettant ainsi un efflux

plus au moins important des composants intra-cytoplasmiques, la mort microbienne s'en suit (**Sikkema et al., 1994**).

Le pouvoir antimicrobien des composants majoritaires isolés ou associés confirment leur implication dans l'effet antiseptique de ces essences ; des essais *in vitro* rapportés par certains auteurs ont révélé un large spectre d'action aussi bien contre les bactéries Gram positif et négatif que contre les champignons, on citera à l'occurrence les effets synergiques et additifs des combinaisons suivantes: Limonène/1,8-cinéole (**Van Vuuren , 2007**) 1,8 cinéole/aromadendrène (**Mulyaningsih et al., 2010**); cinnamaldéhyde; eugénol; thymol; eugénol; carvacrol; eugénol et thymol; carvacrol(**Iten et al., 2009**).

Des études antécédentes ont démontré que la majorité des HE testées pour leur propriétés antibactériennes ont un effet plus prononcé contre les Gram +. La résistance des Gram – est attribuée à leur membrane externe hydrophile qui peut bloquer la pénétration de composés hydrophobes dans la membrane cellulaire cible (**Wan, 1998**). L'action relative des thujones et de l'eucalyptol (ou 1,8-cinéole) a été associée à leur basse hydro solubilité et la capacité de former des liaisons hydrogènes, ce qui limite leur entrée dans les Gram – qui possèdent des voies hydrophobes inopérants dans la membrane externe (**Faleiro, 2003**).

Cette activité antibactérienne des HES pourrait être expliquée par l'interaction moléculaire des groupements fonctionnels des composants des HE avec la paroi des bactéries ce qui provoque de profondes lésions. On peut conclure donc que cette activité peut être le résultat d'un effet synergique entre plusieurs composés de cette HE (**Felice, 2004**).

Conclusion

Les deux souches *E. coli* et *S.aureus* sont à l'origine de plusieurs infections, et l'antibiothérapie est considérée comme l'une des solutions entamées pour faire face à leur agressions, les records à l'utilisation des HEs ni guerre négligeable.

Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à extraire les huiles essentielles à partir des feuilles d'*Eucalyptus globulus* dont le but de les valoriser et de voir l'activité antibactérienne de cette huile vis-à-vis *E. coli* et *S.aureus*.

Les résultats des analyses physicochimiques des feuilles étudiées ont révélé une humidité de $57,20\% \pm 0,92$ et un taux de cendres qui est de l'ordre de $3,04\% \pm 0,15$. Les feuilles étudiées sont moins acides étant donné que leurs pH est de $6,03 \pm 0,049$ avec une acidité titrable de $0,60 \text{ g/l} \pm 0,013$. Leur valeur de la conductivité électrique est de $13,08 \pm 0,22 \text{ mS/cm}$ respectivement.

La valeur de rendement en huile essentielle par la méthode d'Hydro distillation est $1,48\% \pm 0,84$. Ce rendement est acceptable et peut être rentable à l'échelle industrielle.

Les résultats des indices physicochimiques d'HE des feuilles obtenus ; sont : $1,472 \pm 0,28$ pour l'indice de réfraction $14,025 \pm 0,5$ pour l'indice d'ester, $8,69 \pm 0,9$ pour l'indice d'acide respectivement.

Concernant l'effet antibactérien, l'Hb d'*E.globulus* a exercé une importante activité antibactérienne vis-à-vis *S.aureus* et *E.coli* avec des DZI de $32 \pm 0,5$ et $30 \pm 0,25 \text{ mm}$ respectivement.

Les DZI des différences concentrations d'HE obtenus contre les souches étudiées sont supérieurs à ceux obtenus par Cefotaxime et Colistin.

L'HE d'*E.globulus* a une CMI qui est de $500 \mu\text{l/ml}$ vis-à-vis *S. aureus*. Mais concernant *E.coli*, la CMI est de $1000 \mu\text{l/ml}$.

De nombreuses perspectives peuvent être envisagées telles que :

- Extraction des huiles essentielles à partir d'autres espèces d'*eucalyptus*.
- Réalisation d'une étude *in vivo* sur un modèle animal pour confirmer les résultats obtenus *in vitro*.
- Extraction des huiles essentielles par d'autres méthodes sophistiquées (microondes, CO_2 supercritique) et détermination des facteurs influençant le rendement de cette huile.

Conclusion et perspectives

- La mise en évidence de l'effet antibactérien de la plante utilisé vis –à-vis d'autres souches pathogènes.
- Approfondir les recherches sur les produits naturels comme alternative aux antibiotiques.
- Evaluation d'autres activités biologiques des extraits d'eucalyptus et leurs huiles essentielles (activité antifongique, activité antiparasitaire, effet insecticide.. etc.).
- Caractérisation des composés chimique d'huile essentielle par CPG ou HPLC.

Références bibliographiques

1. **AFNOR, (1986).** Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles ». Paris. 57p.
2. **AFNOR, (2000).** Recueil de normes : les huiles essentielles. Tome 2. Monographies relatives aux huiles essentielles ». Paris, 661-663.
3. **Amarti ,F ., Satrani ,B., Ghanmi ,M., Farah ,A .,Aafi ,A ., Aarab ,L ., El Ajjouri , M., et Chaouch ,A .(2010)** .Composition chimique et activité antibacterienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss.et Reut .Et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth du Maroc .Biotechnol .Agron .Soc .Environ , 14(1) , 141-148.
4. **Amellal, H. (2008).** Aptitudes technologiques de quelques variétés communes de dattes : formulation d'un yaourt naturellement, sucré et aromatisé. Thèse de doctorat en Technologie Alimentaire .Université M'hamedBougara. Boumerdes.127 p.
5. **Andigie , C.L , Figarella , J., Zonszain , F.(1978).** Manipulation biochimique .Ed Dion .Paris .274 p.
6. **AOAC. (2000).** Official method of analysis 17thEd Maryland .U.S.A.
7. **AOAC. (2002).** Official Methods of Analysis.17th Ed. Gaithersburg, USA.
8. **Athamena, S. (2009).** Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuminumcyminum* et les feuilles de *Rosmarinusofficinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Thèse de magister en Biochimie appliquée. Université El Hadj Lakhdar-Batna.88p.
9. **Bachelot, C., Blaise, A., Corbel, T., Le Guernic, A. (2006).** Les huiles essentielles extraction et comparaison. Thèse de fin d'étude en biologie U.C.O. BretagneNord 567 p.
10. **Batista, L.G., Fernandes, J.B .,Corrêa, A.G., Silva, M ., Vieira , P.C (2006).** Electrophysiological responses of eucalyptus brown looper *Thyrinteina arnobia* to essential oils of seven Eucalyptus species. J.Braz.Chem.Soc.17: 555-561.
11. **Becker ,M.J.F et Ricard, Tinbal, j.(1983).** Les arbres ; 2^{ème} Ed : massons et réalisation éditoriales pédagogiques , paris . 141p.

- 12. Benarab ,M . (2006).** Activité antimicrobienne des polyphénols, le cas d'extrait de *Myrtuscommunis*. Université Abderrahmane MIRA Béjaïamemoire de master 2 en science alimentaire 122 p.
- 13. Bendahou, T., Beutner, S., Bloedorn, B., Frixel, S., Blanco, I.H., Hoffmann, T., Maye, B., Noack, P., Ruck, C ., walch, R. (2008) .**Quantitative assessment of antioxidant property of natural colorants and phytochemicals : caroteniode, flavonoides, phenols and indigoids, 67: 1178-1202.
- 14. Bendimerad, N., Taleb, B.A., Bendiab, A., Benabadji, B., Fernandez, X., Valette, L ., Lizzani-Cuvelier ,L. (2005).** Composition and antibacterial activity of *Pseudocytisusintegrifolius*(Salisb) essential oil from Algeria.*Journal of Agriculturaland Food Chemistry*, 53 :2947-2952.
- 15. Benslimani, A.(2006).**Physiologie bactérienne; cours de Résidanat de microbiologie, Physiologie Bactérienne, Tunisie. Pp : 87-89.
- 16. Benzegouta, N. (2005).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliment. Thèse de magistère en pharmacologie, UniversitéMentouri Constantine.153p.
- 17. Bergonier , D., Duquesnel ,R., Brugidou , R. et coll. (2006).** Les mammites cliniques ovines viennent de livrer leurs «derniers» secrets étiologiques. *Nouv. Prat. Vét. Elev. Santé*, pp 1- 27-32.
- 18. Bigendako, M.J. (2004).** Identification et Zonage des *Eucalyptus Globulus* au Rwanda.Chemonics International Inc., sous le projet ADAR.
- 19. Booij ,I., Piombo, G., Risterucci, J.M., Coupe, M., Thomas, D., Ferry, M. (1992).**Etude de la composition chimique de dattes à différents stades de maturité pour la caractérisation variétale de divers cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). *Fruits*,47(6):667-678.
- 20. Boudjellal, K. (2009).**Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de l'*Elaeagnusangustifolia L.* Thèse de magister en Biologie. Option : biochimie appliquée. Université -el hadj lakhder –Batna. 84p.

- 21. Bougandoura , N.(2011).**Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétale *Saturejascalamithasspnepta* (nabta) et *Ajugaiva L.*(chendgoura) del'ouest d'Algérie, Mémoire de Magister, Université Abou BakrBelkaid-Tlemcen. 125p.
- 22. Bouvet ,J.M.(1999).**Les plantations d'*eucalyptus*. Evolutions récentes et perspectives .Le Flamboyant .49. Pp4-14.
- 23. Braca, A., Siciliano, T ., D'Arrigo , M ., Germanò , M. (2008).**Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. Fitoterapia.Vol 79. Issue 2. February:123-125.
- 24. Campbell, N-A., et Reece, J-B. (2007).** Biologie. 3^{ème} édition. Canada : éditions du renouveau Pédagogique. p 165.
- 25. Campinhos ,E.(1999).**Sustainable plantations of high –yield *Eucalyptus* trees for production of fiber : the Aracruz case .New Forests ,17. 129-143.
- 26. Carvalho , R ., Moura, L.S., Rosa, P.T., Meireles, M.A. (2005).**Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinusofficinalis*): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *Journal of Supercritical Fluids*.76-77-78.
- 27. Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruyne T, Hermans N, Totté J, Pieters L, Vlietinck, A.J. (2002).** Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.* 2(79): 213-220
- 28. Cohen ,Y.(1997).**Abrégéspharmacologique .4^{ème} édition ,P360-370.
- 29. Coutouly ,G., Klein ,E ., Barbiery ,E . et Kriat , M.(2006) .**Biotechnique et sciences : travaux dirigés de biochimie , biologie et bioinformatio .Ed dion , 3^{em} édition , p58.
- 30. Cowan , M.(1999) .**Plant Products as Antimicrobial Agents .journal of medicinal plant.vol 16 . 122-125.
- 31. Cremieux ,A.(1990) .**Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activité antibacterienneStudy of six essential oils : chemical composition and antibacterialJ.offood science .vol 85 :24. 37-44.

- 32. Crete , p.(1965).** Précis de botanique, tome II (systématique). ; 2^{ème} Ed, paris ,429p.
- 33. David, W.,Christopher , L. (2004)** .Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus* : Ecology and Management. Cooperative Research Centre for Sustainable Production Forestry and CSIRO Forestry and Forest Products,6.16-47.
- 34. Del Río, A., Gutiérrez, M., Hernando, P. Landín, J. Romero, and Martínez , A. T.(2005).**Determining the influence of eucalypt lignin composition in paper pulp yield using Py-GC/MS, J. Anal. Appl. Pyrolysis, 74, 110-115.
- 35. Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Tec et Doc, Lavoisier, Paris. P 476.
- 36. Delarras, C. (2010).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.France : Ed. Lavoisier. P 340.
- 37. Delière-Baron, E., Jourdan B., Duviquet, M., et Abramowitz, C. (1996).** Importation et acquisition de *S. aureus* résistant à la méticilline isolée en milieu gériatrique institutionnel : vol : (26) .644-50.
- 38. Descoteaux , L., ROY , J.P. (2004).**La mammite clinique stratégies d'intervention. Symposium sur les bovins laitiers. Centre de référence en agriculture et agroalimentaire du Québec CRAAQ. www.craaq.qc.ca.
- 39. Dharm, D., Tyagi, CH. (2010).** Comparaison of various eucalyptus species for their morphological,chemicale,pulp and paper making characteristics, Departement of paper technology,Indian journal of chemicale technology,vol.18.Pp 145-151
- 40. Djalowat, S. (1990).** Le diagnostique biochimique bactérien, Ed. Science et technique, Constantine. Pp45-47.
- 41. Duraffourd , C., D'Hervicourt L., et Lapraz ,J-C.(1999)** .Cahier de phytothérapie clinique ,examen de laboratoire galénique , élément thérapeutiques synergiques , Tome 1, Masson,P89.
- 42. Duval , J., Soussy C.J. (1990)** . Antibiothérapie. Masson, 4ème édition. Pp123-235.

- 43. Elaissi , A ., Salah , K ., Mabrouk , S., Larbi , K ., Chemli , R., Harzallah, F. (2011).** Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. *Food Chemistry*, 129(4): 1427–1434.
- 44. Emami, J., Asili, Z., Mohagheghi., and. Hassanzadeh, M. K. (2007).** Antioxidant Activity of Leaves and Fruits of Iranian Conifers , Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, , School of Pharmacy, Biotechnology Research Center,vol 4. 313-319.
- 45. Erskine,R.(2004).**Philosophical approach to antibiotic therapy : Know the cow , bug and drug .Proceedings of the annual meeting of the National Mastitis Council : 8-11.
- 46. Faleiro, M.L., Lanfranchi ,D.A., Prado ,S., Baldovini ,N., Meierhenrich ,U.J.(2006).**Composition distribution and antibacterial activity of the essential oil of *Achillea ligustica* All .From Corsica .J. Agric .Food Chem., vol : 54 , 6308-6313.
- 47.Farah , H., Hamadi , A., Meziane , A., et Benmansour , A.(2009).**Etudephysicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*Boiss et Reut .Université AboubkeurBelkaid. Tlemcen .05(2) , 246-259.
- 48. Farah, A ., Satrani , B ., Fechtal , M ., Chaouch , A ., Talbi , M .(2001).**Composition chimique des huiles essentielles extraites et de son hybride naturel des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis*et activités antibactérienne et antifongique (clone 583). *Acta Bot. Gallica*. 148 (3): 183-190.
- 49. Felice , S ., Francesco, A., Nelly, B., Maurezio et Werner, H. (2004) .**Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. **20** (3), 291 -294.
- 50. Ferhom, F. (2010).**Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (*Apis Mellifera*intermissa et *apis melliferasahariensis*). Thèse de magister en Technologie Alimentaire. Université M'hamedBouguera. Boumérdes.122p.
- 51. Franchomme, P ., Pénéol, D. (1990).**L'aromathérapie. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Ed. Roger jallois .Limoges . Lyon .445p.
- 52. Francois ,J., Chomarar ,M ., Weber , M., et Gerard , A.(2003) .**De l'antibiotique à la prescription .2^{ème} édition .Pp8-22.

- 53. Gabli , A. (2005).**Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire. Université de Constantine.112 p.
- 54. Gachker ,L ., Yadegari ,D., Bagher , R .M ., Taghizadeh ,M ., Alipoor ,A.S., Rasooli , I.(2006) .**Chemical and biological characteristics of *Cuminumcyminum* and *Rosmarinusofficinal* essential oils .Science direct :Food chemistry , 102 , 898 -904.
- 55. Gavrilovic ,M., Maginot ,M.J et Wallach ,J.(1996) .**Biosciences et technique : biochimie des aliments diététique du sujet bien portant .Ed dion , 2^{em} édition, pp 96-97.
- 56. Geoffrey, C.P. (2011).**Food Science and Technology. Ed. John Wiley et Sons.USA.p325.
- 57. Ghazi .K, et Niar .A .(2011).** Qualité hygiénique du lait cru de vache dans les différents élevages de la Wilaya de Tiaret (Algérie). Institut des Sciences Vétérinaires, Université Ibn –Khaldoun de Tiaret, vol 29, 4, 193-196.
- 58. Gildo, P. (2006).**Précis de phytothérapie,LarousseEncyclopedie,Guenther,.EdAlpen ,p 3-4.
- 59. Goel , G., Makkar , H.S., Becker K., (2008).** Effect of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* and Fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*.vol : 147 . 72–89.
- 60. Grundy, D. L ., et Stille, C.C.(1985) .** Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2-epoxide. *Pesticide Biochem. and physiol.* 23:383-388.
- 61. Guignard, J.L.(2001).** Abrégé Botanique Systématique Moléculaire 12 Eds Révisée MASSON. p 20.
- 62. Guinoiseau, E. (2010),** Molécules antibactériennes issues d’huiles essentielles : Séparation, identification et mode d’action .Thèse de doctorat .Université de Corse-Pasquale Paoli. Lyon. 245 p.

- 63. HELEILI , N. (2003)** .Etude de la prévalence de la mammitte subclinique et la sensibilité in vitro des germes isolés. Thèse de Magister en médecine vétérinaire. Université El Hadj Lakhdar- Batna.133p.
- 64. Hellal, Z. (2011).** Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydants de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la Sardine (*Sardina pilchardus*). Mémoire de Magister en Biologie, Option: Biochimie Application et Biotechnologies .Université Mouloud Mammeri de Tizi- Ouzou.78p.
- 65. Hmiri, SH., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M ., et El Ajjouri, M. (2011).**Evaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Menthapulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, vol. 80, 824 –836.
- 66. Houssni, B., Berkhli, H., Madani, H., et Azzouzi, A. (2011).** Résistance aux antibiotiques : une responsabilité partagée : *Officinal*, 88, Pp 1-10.
- 67. Hulin, V., Mathot, A.G., Mafart, P., Dufosse, L. (1998)** .Les propriétés antibactériennes des huiles essentielles et composés aromatiques, *Science des aliments*. Tec et Doc – Lavoisier, Paris. P 47. 18,563-582.
- 68. Ipek, E., Zeytinognu, H., Okay, S., Tuytu, B.A. (2005).** Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum oil* and *carvacrol* evaluated by *Ames Salmonella*/microsomal test.*Food Chemistry*. Vol .93. 123p.
- 69. Iqbal, M., Khan, K., Hussain, M., Sajid, Z., . Abbas, A. (2010).**In vitroscreening of *ziziphus mauritiana* and *terminalia arjuna* for their anthelmintic activity .*The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(4): 781-786.
- 70. Iten, F., Saller, R., Abel, G., Reichling, J. (2009)** . Additive antimicrobial effects of the active compounds of the essential oil of *thymus vulgaris*- chemotype *carvacrol*.*Planta Med.* 75: 1231-1236.

- 71. Jia HL, Ji , Q. L., Xing , S. L., Zhang, P. H ., Zhu, G.L ., Wang , X.H .(2010)** .Chemical composition and antioxydant, antimicrobial actimicrobial activités of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will and *Thymus proximus* Serg.vol 6. 45-50.
- 72. Kaloustian, J ., Chevalier, J., Mikail, C. (2008)** .Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activiteantibacterienne. *Phytotherapie* ,6(3): 160–164.
- 73. Karim , A., Ashraf, M., Pervez , M., Bhattay, M. K. (1977)** .Studies on the essential oils of the Pakistan species of the family Umbelliferae. Part VIII. *Carum carvi* L. (Caraway, Kala Zira) oil of the mature and the immature seeds and the whole immature plant.Pakistan. *J.Sci .Ind. Res.* 20:100-102.
- 74. Kesbi, A. (2011).** Etude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'*eucalyptus globulus* dans la région de Ouargla. Thèse de Master en Génie des Procédés. Université KasdiMarbah .Ouargla.67p.
- 75. Khadidjatou, T. (2008).** Etude in vitro de la sensibilité bactérienne. Thèse de Master 2, Université Gaston Berger.123p.
- 76. Khenaka, K. (2011).** Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogènes ruminale chez l'ovin. Thèse de Magister en microbiologie appliquée. Université Mentouri Constantine. 142p.
- 77. Koterba, A., Torchia, J., et Silverthorne, C. (1986).** Nosocomial infections and bacterial antibiotic resistance in a university equine hospital: *J Am Vet Med Assoc*, 189(2). 185-91.
- 78. La foret Algerienne. (1996).** Editer par l'institut national de recherché forestiere – Bainem-Alger février –mars 1996 .10 p.
- 79. Laadjama ,A., Ourzout , R ., Hocine, A. (2011).** Enquête sur les facteurs de risque des mammites en élevage bovin laitier dans l'est Algérien. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire. Institut des Sciences Vétérinaires. Alger. 98p.
- 80. Lawrenc et Brian M. (2000)** . Essential oils: from agriculture to chemistry. *The international Journal of Aromatherapy*.vol : 10. 82-98.

- 81. Leclerc, H., Izard, D., Husson, M-O., Watre, P., et Jakubczak, E. (1983).** Microbiologie générale. Paris : Ed. Doin.
- 82. Linden, G. (1981)** .Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro alimentaires Vol .II : principe des techniques d'analyses .Ed .Collection Science et Technique Agro alimentaire .Paris .434p.
- 83. Ljungh, A., Hjerten, S., et Wadstrom, T. (1985).** High surface hydrophobicity of autoaggregating *S.aureus* strains isolated from human infections studied with the salt aggregation test: infection and immunity, 47, pp 522-526.
- 84. Marcel, M. (2007).** Larousse agricole Edition Larousse paris France p115-116-374-375-405.
- 85. Marchal, L., Bourdon, J.L., Richard, C. (1982).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .Ed. Dion. Paris. P45-46-66.
- 86. Marchal, N et Bourdon, J. L. (1973).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries .Ed. Odèon. Paris .P 59.
- 87. Mastelic, J. (2001)** . The essential oil co-distillation by superheated vapour of organic solvents from aromatic plants. Flavour and Fragrance Journal. 16. 370-373.
- 88. Maurin, M., Musso, D., et Charrel. (1995).** Résistance aux antibiotiques des bactéries hospitalières (Bacilles à Gram négatif aérobies) situation à Marseille: Méd. Infect; 25. 508-14.
- 89. Mebarki, N. (2010).** Extraction de l'huile essentielles de *thymus Fontanesii* et application à la formulation d'une forme médicamenteuse –antimicrobienne .Thèse de Magister en Génie des procédés chimiques et pharmaceutiques, Université M'Hahmed Bougara Boumerdes. 185p.
- 90. Medefouni, N. et Bendib, G. (2006).** Dépistage des mammites sub-cliniques par comptage cellulaire et les analyse physico-chimiques. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire. Université El Hadj Lakhdar- Batna. 126p.
- 91. Mesaros, N., Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Vanhouf, R., et Tulkens, P-M. (2005).** L'efflux des antibiotiques: Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat

de la question et implications microbiologiques et cliniques : Louvain médical ; 124, 8 : 308-320.

92. Messaid, H. (2008).Optimisation du processus d'immersion –réhydratation du système dattes sèche- jus d'orange. Thèse de Magistère en Génie Alimentaire .Université .M'hamedBouguera. Boumérdes.74 p.

93. Mohammedi, Z.(2006).Etude du pouvoir antibactérien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de magistère en produits naturels, activités biologiques et synthèse, Université Abou BakrBelkaid - Tlemcen .155p.

94. Moufida, S., Marzouk ,B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange.INRST. *Laboratoire d'Adaptation etd'amélioration des plantes*. Pp 2-6.

95. Mulyaningsih, S., Frank, S., Zimmermann, S., Jürgen Reichling , Michael, W., (2010). Synergistic properties of the terpenoidsaromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus*against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13):1061-1066.

96. Nielsen, S.S. (2010). Food Analysis .4^{émé} Ed. Springer .USA.602 p.

97.Ould El Hadj, A.H., Siboukeur,O et Sebihi, M.D. (2001).Qualité Hygiénique et Caractéristiques Physico-Chimiques du Vinaigre Traditionnel de Quelques Variétés de Dattes de la Cuvette de Ouargla, Université de Ouargla, .mémoire de master 2 en agronomie. 92p.

98. Oussalah ,M., Caillet ,S., Saucier ,L., Lacroix, M. (2007).Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *Escherichia coli* ,*SalmonellaTyphimurium*,*Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*, *Meat Science* ,73,236-244.

99. Oyedeji , A. O, Ekundayo, O, Olawore , O ., Adenivi , B. A ., Koenig , A . (1999) .Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. *Fitoterapia*, 70(5): 526-528.

- 100. Pauli, A. (2001).**Antimicrobial properties of essential oil constituents.*International Journal of Aromatherapy*, 11:126-133.
- 101. Perez-Trallero, E., Vicente, D., et Montes, M. (2001).** High proportion of pharyngeal carriers of commensal streptococci resistant to erythromycin in Spanish adults: Antimicrobial Chemother, 48 (2): 225-9.
- 102. Pibiri, M. C. (2006).** Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de Doctorat. Ecole Polytechnique Fédération de Lausanne. 152 P.
- 103. Poole, K. (2001).** Multidrug resistance in Gram (-) bacteria.*Current Opinion in Microbiology*, 4: 500-508.
- 104. Prescott, L-M., Harley, J-P., et Klein, D-A. (2003).** Microbiologie. 2^{ème} édition. Paris : Ed. De boeck et Larcier.
- 105. Rakotonirainy , M. S., Lavédrine , B. (2005).** Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. *International Biodeterioration and Biodegradation*. March. 55(2): 141-147.
- 106. Rhoades ,C., Binkley , D. (1995) .** Factors influencing decline in soil pH in Hawaiian Eucalyptus and Albizia plantations. *Forest Ecology and Management* Colorado State University, , USA. Vol 80.47-56.
- 107. RibereauGayon, P. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux .Ed. Dunod. Paris. 254 p.
- 108. Rodier, J. (1997).** L'analyse de l'eau ; eau naturelle, eau résiduaire, eau de mer .8^{ème} Ed. Dunod. France. Pp 57-65.
- 109. Rota, MC., Herrera, A., Martinez, RM. (2008).**Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*and *Thymus hyemalis*essential oils.*Food Control*, 19: 681–687.
- 110. Sari,M., Cheynier, V. (2006).**Les polyphénols en agroalimentaire. Collection Science et techniques agroalimentaire. Ed Lavoisier. Tec et Doc. Paris. 424p.

- 111. Schaechter., Medoff., et Eisenstein. (1999).** Microbiologie et pathologie infectieuse. 2^{ème} édition. France : Ed. Deboeck.au traitement antibiotique : Médecine du Maghreb. Pp 91-22-25.
- 112. Schwammler, E-W, Slobodanka , K and Walter Steiner ,(2001).**Isolation of Carvacrol Assimilating microorganisms Blagica Austria .Vol 56. 14-23.
- 113. Seghier, M., Ramdani Bouguessa, N., Belouni, R., et Benslimani, A. (2009).** Manuel de microbiologie. 2^{ème} édition. France.Pp57-118.
- 114. Siddiqui , I. &Shaukat ,S. (2003).**Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylpholoroglucinol. *Soil Biol. Biochem.*, 35, 1615-1623.
- 115. Sikkema, J., Bont, J.A.M., boolman, B., 1994.** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes.*J. of Bacter.* 269: 8022-8028.
- 116. Singh, S-B., et Barrett, J-F. (2006).** Empirical antibacterial drug discovery- foundation in natural products: *Biochem. Pharmacol*, 71 . 1006-1015.
- 117. Sqalli, H., El ouarti, A., Ennabili, A., Ibsouda, S., Abdellah, F. (2007).** Evaluation de l'effet antimycobactérien de plantes du centre-nord du Maroc : *Bull. Soc. Pharm.* 23 ;276-287.
- 118. Syed , B., Mian Furqan , Aand Amanullah , B. (2006).** The effect of eucalypts camaldulensis on soil properties and fertility . NWFP Agricultural University, Peshawar, Pakistan. *Journal of Agricultural and Biological Science* vol : 1, 3.
- 119. Sylvie, C. (2009).**La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important !Le parrainage des antimicrobiens : *Pharmactuel*, 42, 6-21.
- 120. Thurre, N.(2007).**Influence de la variété de fraise et de la période de récolte sur les contenus en antioxydants et en anthocyanes ainsi que sur la répartition de l'acide ellagique dans le fruit, les feuilles et le rhizome, Mémoire d'obtention de diplôme d'ingénieur en Technologie alimentaire, Université de Suisse. Pp 15-17.
- 121. Valnet, J. (2001).** La santé par les fruits, légumes et les céréales. Ed Vigot. Pp 207-281.

- 122. Van Bambeke, F. (2007).** Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse. Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université catholique de Louvain.
- 123. Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M., Özek, T., Demirci, B., Başer, K.H.C. (2007) .** Seasonal and geographical variation of *Heteropyxis natalensis* essential oil and the effect thereof on the antimicrobial activity. *South African J. Botany* 73: 441–448.
- 124. Wan, J., Wilcock, A., Coventry, M.J. (1998).** The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.*, **84**: 152-158.
- 125. Yala, D., Merad, A-S., Mohamedi, D., et Ouarkorich, M-N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques : *Médecine du Maghreb*, 91, pp 5-12.
- 126. Zerroug, M.M., Zouaghi, M., Boumerfeg, S., Baghiani, A., Nicklin, J., et al. (2011).** Antibacterial Activity of Extracts of *Ajuga Iva*, and *Teucrium polium*: *Advances in Environmental Biology*, 5 (2): 491-495.

Annexes

Annexe n°01: H.E des *d'Eucalyptus globulus* obtenus par l'Hydrodistillation.



Annexe n°02 : Coloration de Gram.

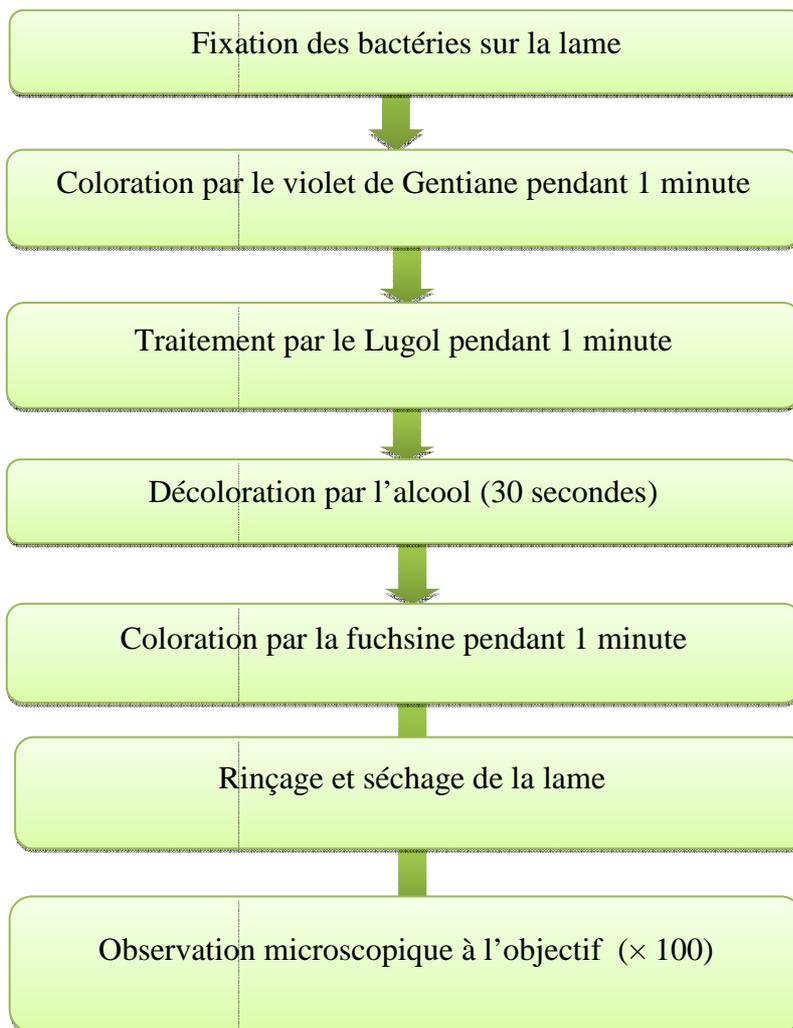
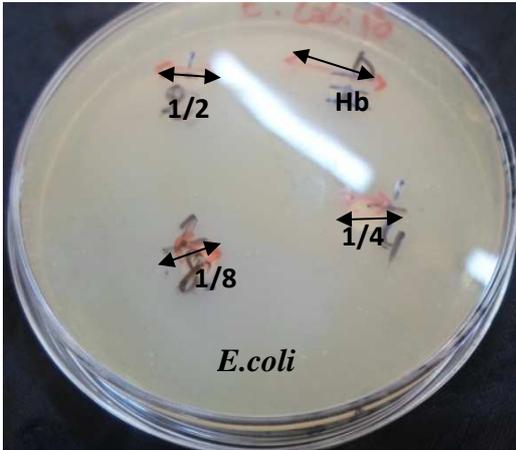
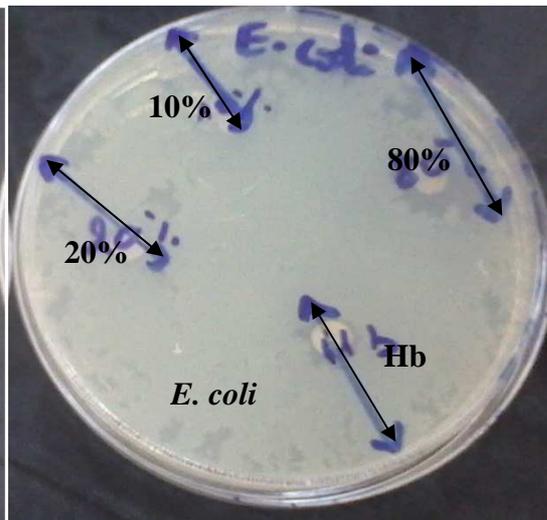
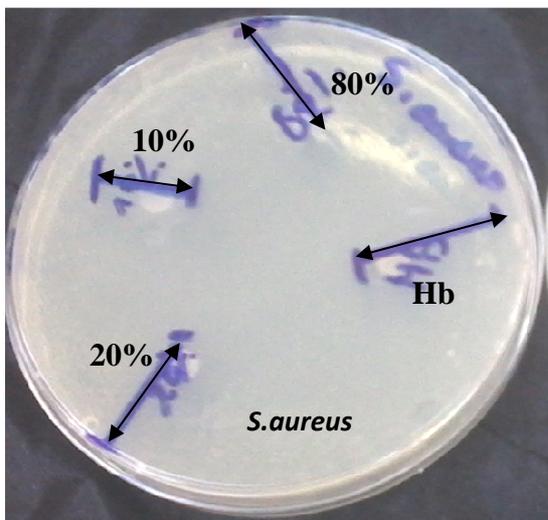


Figure n°09 : Schéma représentant les étapes de la coloration de Gram (Delarras, 2007).

Annexes n°03: Les DZI d' H.E d'*Eucalyptus globulus* sur les deux bactéries.

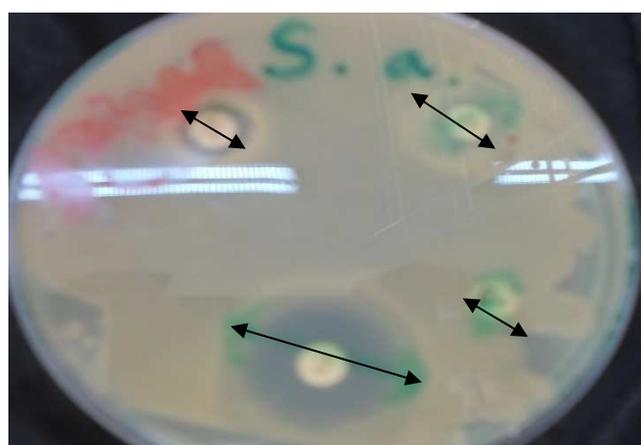
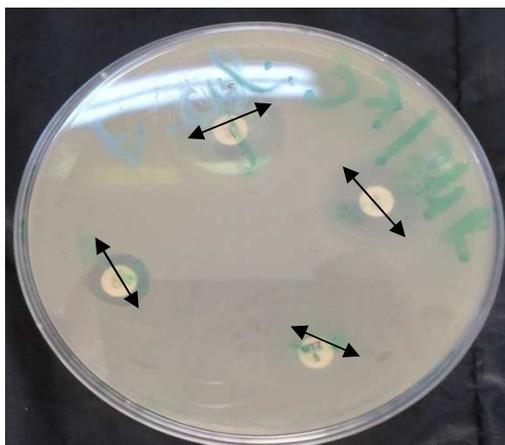


Les dilutions des H.ES (10%, 20%, 80%).

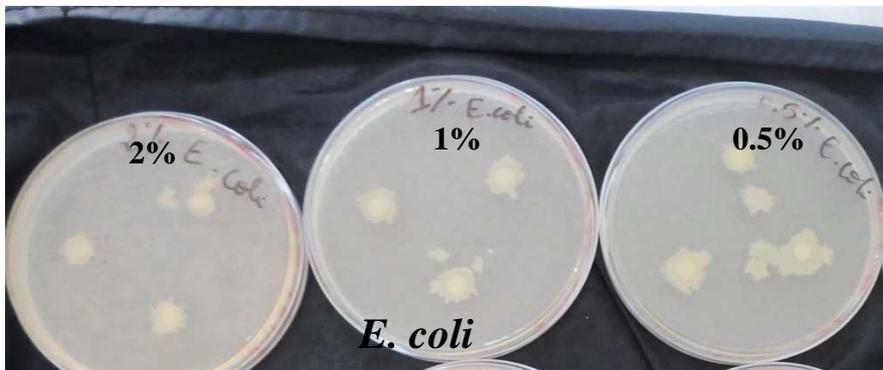
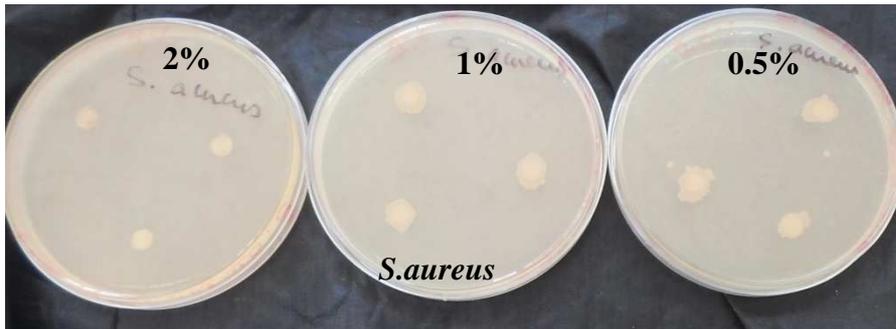


Annexe n°04 : Antibiogramme et la CMI.

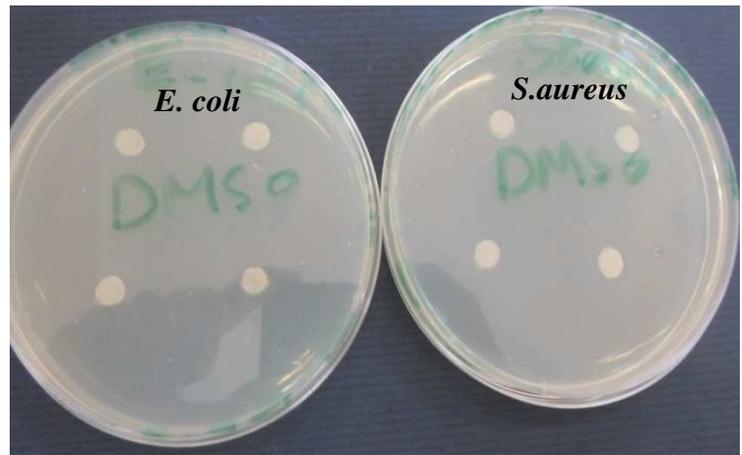
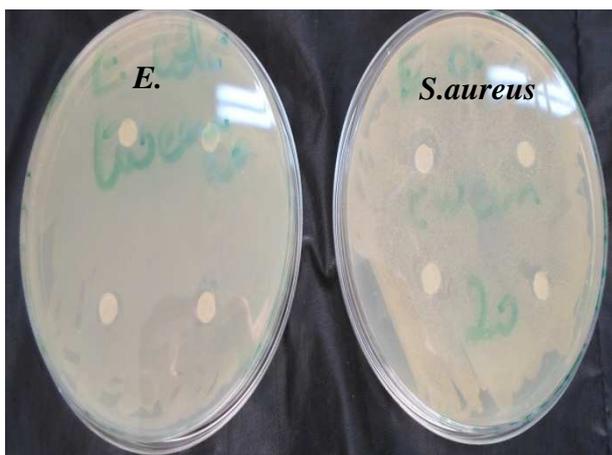
Antibiogramme



LA CMI



Annexe n°05 : Les témoins négatifs.





Annexes n°06: La composition des milieux de la culture utilisés. (Marchal *et al.*, 1973)

Bouillon nutritif

✚ Macération de viande.....	1 L
(Ou eau distillé + extrait de viande q.a.)	
✚ Peptone tryptique.....	15 g
✚ Na Cl ou K Cl.....	5 g

Milieu de Baird-Parker

✚ Tryptone.....	10g
✚ Extrait de viande.....	5g
✚ Extrait de levure.....	1g
✚ Chlorure de lithium.....	5g
✚ Gélose.....	20g
✚ Eau distillée q.s.p.....	1,000ml

pH= 7,2

Milieu Muller Hinton liquide

✚ Infusion de viande bovine.....	02,0g
✚ Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g
✚ Amidon soluble.....	01,5g

Milieu Muller Hinton gélosé

✚ Infusion de viande bovine.....	02,0g
✚ Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g
✚ Amidon soluble.....	01,5g
✚ Agar agar.....	15,0g

Gélose Hektoen (en grammes par litre d'eau purifiée filtrée)

✚ Peptone de viande.....	12,0
✚ Extrait de levure	3,0
✚ Lactose.....	12,0
✚ Sucrose	12,0
✚ Salicine.....	2,0
✚ Sels biliaires	9,0
✚ Chlorure de sodium.....	5,0
✚ Citrate ferrique d'ammonium	1,5
✚ Thiosulfate de sodium.....	5,0
✚ Fuchsine acide	0,1
✚ Bleu de bromothymol	0,065
✚ Gélose	14,0

pH =7

✚ Gélose Chapman

✚ La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

- ✚ Extrait de viande (bovin ou porcin) 01 ;
- ✚ Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin) .10 ;
- ✚ Chlorure de sodium .75;
- ✚ D-Mannitol ...10;
- ✚ Agar 15;
- ✚ Rouge de phénol 0,025.

pH 7,4

Annexes n°07: Matériels utilisés.



Spectrophotomètre



Réfractomètre



Conductimètre



pH mètre



ampoule à décanter



Four à moufle

Résumé :

Ce travail à évaluer l'effet antibactérien d'huile essentielle extraite d'*Eucalyptus globulus* provenant de la région de Tiaret.

Les diamètres de zones d'inhibition d'huile essentielle ont été déterminés par la méthode de diffusion des disques sur gélose Mueller-Hinton. Ainsi la concentration minimale inhibitrice de cette huile a été déterminé.

Les résultats de différentes analyses physicochimiques des feuilles d'*eucalyptus* étudiées montrent qu'ils sont satisfaisants selon les normes internationales.

L'extraction d'huile essentielle d'*eucalyptus globulus* en utilisant l'hydro distillation a montré un rendement de $1.48\% \pm 0.84$.

Des diamètres des zones d'inhibition allant de 10 jusqu'à un 32mm ont été obtenus avec les différentes concentrations de l'HE d'*eucalyptus globulus* sur les souches testées. *Staphylococcus aureus* est la souche la plus sensible à cette huile avec un diamètre de zone d'inhibition de 32mm.

L' H.E d'*eucalyptus globulus* présenté des CMI de l'ordre de 500 µl/ml vis-à-vis *S. aureus* et de 1000 µl/ml pour *E. coli*.

Les mots clés : *Eucalyptus*, Huile essentielle, hydro distillation, activité antibactérienne, CMI.

ملخص

يهدف هذا البحث إلى تقييم الفعل المضاد للبكتيريا للزيت الأساسي المستخلص من نبتة الكاليتوس (*Eucalyptus globulus*) مأخوذة من منطقة تيارت .

تم تحديد أقطار مناطق التثبيط لهذا الزيت الأساسي باستعمال طريقة النشر للأقراص على أجار (Mueller-Hinton)

توضح نتائج مختلف التحاليل الفيزيوكيميائية (الأس الهيدروجيني , الحموضة, نسبة الرطوبة, نسبة الرماد و الناقلية الكهربائية) لقشور الحمضيات المدروسة أنها مقبولة حسب المواصفات القياسية.

أعطى استخلاص الزيت الأساسي من نبتة الكاليتوس باستخدام طريقة التقطير المائي مردوداً قدره $1.48 \pm 0.84\%$.

أقطار مناطق التثبيط تتراوح بين 10 إلى 32مم تم الحصول عليها باستعمال مختلف تراكيز الزيت الأساسي لنبتة الكاليتوس ضد الأصناف البكتيرية المجربة.

Staphylococcus aureus هي الصنف الأكثر حساسية لهذا الزيت حيث بلغ قطر منطقة تثبيطها 32 مم.

أعطى الزيت الأساسي لنبتة الكاليتوس CMI قدرها 500 ميكرو لتر /مل من أجل *S.aureus* و 1000 ميكرو لتر /مل من أجل *E.coli*.

الكلمات الدالة: الكاليتوس، الزيت الأساسي، التقطير المائي، الفعالية المضادة لبكتيريا، تركيز الحد الأدنى المثبط.