

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIC ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العلي والبحث العلمي
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
جامعة باجي مختار عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA-



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE APPLIQUEES

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En MICROBIOLOGIE

Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire

THEME

Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de certaines plantes
de l'est algérien sur des souches résistantes aux antibiotiques.

Présentée par : Bouras Marwa

Directrice de thèse : M^{me} ABBACI BOUTEFNOUCHET Nafissa

Pr, Université d'Annada

Co-directrice de thèse : M^{me} BENNADJA Salima

MCA, Université d'Annada

Membre de Jury :

Président : M^r MESSARAH Mahfoud

Pr, Université d'Annaba

Examiteur : M^{me} AOUN Leila

Pr, Université d'El Taref

Examiteur : M^r Soumati Boujema

Pr, Université d'Annaba

Année universitaire: 2018/2019

REMERCIEMENTS

Au nom de DIEU clément et miséricordieux, le plus grand merci lui revient de m'avoir guidé vers le droit chemin et de m'avoir aidé tout le long de mes études.

Je profite de l'occasion qui m'est offerte pour adresser mes vifs remerciements à ma directrice de thèse, Madame le Professeur BOU'VEFNOUCHE' Nafissa pour sa disponibilité à toute épreuve et ses remarquables compétences en la matière ont été le garant de ce travail particulièrement enrichissant, ces qualités humaines et sa gentillesse.

Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour exprimer mes sincères remerciements et toute ma gratitude à ma co- directrice de thèse madame le professeur Bennadja Salima, pour son aide et son soutien à tout les moments. Sa gentillesse et ses grandes qualités humaines.

Au Professeur Messarahi Mahfoud, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous m'avez apporté tout au long de cette période, surtout pour votre entretien, vos conseils ainsi que vos précieuses discussions. Merci d'avoir cru en moi.

Mes sincères remerciements vont également aux membres de jury de thèse pour avoir bien voulu accepter de juger ce travail :

Mme Aoun, Professeur au département des sciences de la nature et de la vie, Université d'El Taref et

A Monsieur Soumati, Professeur à l'université Badji Mokhtar d'Annaba, j'exprime mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury de thèse.

Merci à tous mes amis docteurs et doctorantes du laboratoire 36 : Saida, Keltoum, Zahra, Samia, Khawla, Minet et Zayneb ... Je n'oublierai jamais les bons moments qu'on a passé ensemble

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'ensemble du personnel du laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquée : Lazhar, Bouchra, Sakina et Adraa pour leur disponibilité et ces services qu'ils m'ont rendus durant la réalisation de ce travail.

A tous ceux qui me sont proches et chers, mes parents, pour leur soutien permanent dans mes études et dans ma vie, leur confiance en moi, leurs encouragements, et leur amour.

A mes sœurs Meriem, Nedjwa et Chayma pour leur support continu et leur amour.

A grand merci à mon époux BOURJA Mehdi qui a toujours été là à me soutenir et m'encourager, qui a su me comprendre et me supporter au long de ce travail.

Un immense merci à Hadjer, mon amie, avec qui j'ai passé d'excellents moments de complicité. Merci pour ton aide et tes encouragements.

Liste des abréviations :

AmpC: céphalosporinase

BGN : bacille à Gram négatif

BGN-Nf : bacille à Gram négatif non fermentaire

BHIB : Brain-Heart Infusion Broth

BLSE: β -lactamase à spectre étendu

CGP : cocci à Gram positif

EAq : extrait aqueux

FID : Flamme Ionisation Dectecteurs

HE : huile essentielle

MLSB: Macrolides, Lincosamides et Stretogrammine Bismuth

OprD : Outer membrane protein D

PLP: Protéine liant la pénicilline

Liste des figures :

| Numéro | Titre | Page |
|--------|---|------|
| 01 | Schéma du montage de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau. | 7 |
| 02 | Schéma du montage de l'extraction par hydrodistillation. | 8 |
| 03 | Schéma du montage de l'extraction par la pression à froid. | 9 |
| 04 | Schéma du montage de l'extraction par micro-onde. | 10 |
| 05 | Schéma du montage de l'extraction par CO ₂ supercritique. | 11 |
| 06 | Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne. | 13 |
| 07 | Fruits, feuilles, Fleurs et étamines d' <i>Eucalyptus</i> . | 16 |
| 08 | Aire de distribution du genre <i>Origanum</i> . | 20 |
| 09 | Aspects morphologiques d' <i>Origanum vulgare</i> . | 21 |
| 10 | Schéma récapitulatif du protocole expérimental. | 27 |
| 11 | Région de la récolte de la plante <i>Eucalyptus globulus</i> . | 29 |
| 12 | Feuilles sèches d' <i>Eucalyptus globulus</i> . | 29 |
| 13 | Région de la récolte de la plante <i>Origanum vulgare</i> . | 30 |
| 14 | Feuilles sèches d' <i>Origanum vulgare</i> . | 30 |
| 15 | Montage de l'hydrodistillateur employé pour l'extraction des huiles essentielles. | 35 |
| 16 | Principe de la méthode des disques ou aromatochrome. | 37 |
| 17 | Principe de la méthode des microatmosphères. | 38 |
| 18 | Principe de la méthode des puits. | 40 |
| 19 | Préparation des dilutions des huiles essentielles. | 42 |
| 20 | Détermination de la CMI par la méthode des dilutions en milieu solide. | 44 |
| 21 | Test de synergie par combinaison des deux huiles essentielles. | 46 |
| 22 | Test de synergie par combinaison de l'huile essentielle avec Oxacilline (1µg). | 47 |
| 23 | Schéma récapitulatif du protocole expérimental d'extraction des extraits aqueux. | 48 |
| 24 | Répartition des souches de <i>S.aureus</i> selon le sexe des patients. | 52 |
| 25 | Répartition des souches des entérobactéries selon le sexe des patients. | 52 |
| 26 | Répartition des souches de l'espèce <i>P.aeruginosa</i> selon le sexe des patients. | 53 |

| | | |
|----|--|----|
| 27 | Répartition des souches de <i>S.aureus</i> selon l'âge des patients. | 53 |
| 28 | Répartition des souches des entérobactéries selon l'âge des patients. | 54 |
| 29 | Répartition des souches de <i>P.aeruginosa</i> selon l'âge des patients. | 54 |
| 30 | Répartition des souches de <i>S.aureus</i> selon la nature de prélèvement. | 55 |
| 31 | Répartition des souches des entérobactéries selon la nature de prélèvement. | 55 |
| 32 | Répartition des souches de l'espèce <i>P.aeruginosa</i> selon la nature de prélèvement. | 56 |
| 33 | Sensibilité des 19 souches de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques testés. | 57 |
| 34 | Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques testés. | 59 |
| 35 | Sensibilité des souches de <i>P.aeruginosa</i> aux antibiotiques testés. | 60 |
| 36 | Répartition des 19 souches <i>S.aureus</i> sélectionnées selon leur résistance et sensibilité à la méthicilline. | 60 |
| 37 | Extraction des HE d' <i>O. vulgare</i> . | 61 |
| 38 | Extraction des HE d' <i>E. globulus</i> . | 61 |
| 39 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des disques. | 63 |
| 40 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis la souche <i>E.coli</i> 4 par la méthode des disques. | 65 |
| 41 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis la souche <i>P.aeruginosa</i> ATTC27853 par la méthode des disques. | 66 |
| 42 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des disques. | 68 |
| 43 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche <i>E.coli</i> 03 par la méthode des disques. | 69 |
| 44 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche <i>P.aeruginosa</i> 01 par la méthode des disques. | 70 |
| 45 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des microatmosphères. | 72 |
| 46 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche <i>E.coli</i> 02 par la méthode des microatmosphères. | 73 |
| 47 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis | 74 |

| | | |
|----|---|----|
| | la souche <i>P.aeruginosa</i> 05 par la méthode des microatmosphères. | |
| 48 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des puits. | 76 |
| 49 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche <i>K.pneumoniae</i> 2 par la méthode des puits. | 77 |
| 50 | Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche <i>P.aeruginosa</i> 1 par la méthode des puits. | 78 |
| 51 | Exemple de l'effet synergique obtenu par de la combinaison oxacilline /huile essentielle vis-à-vis la souche SARM 23. | 85 |
| 52 | Exemple de l'effet antibactérien de l'extrait aqueux de l' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis la souche SARM 40. | 88 |
| 53 | Exemple de l'effet antibactérien de l'extrait aqueux de l' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis la souche <i>S.aureus</i> ATTC 29233. | 90 |

Liste des tableaux :

| Numéro | Titre | Page |
|--------|--|------|
| 01 | Systématique de l'espèce <i>Eucalyptus globulus</i> . | 15 |
| 02 | Composition chimique des huiles essentielles de feuilles de l' <i>Eucalyptus globulus</i> . | 16 |
| 03 | Systématique de l'espèce <i>Origanum vulgare</i> . | 19 |
| 04 | Teneur en thymol, carvacrol et para-cymène de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> de différentes régions d'Algérie. | 21 |
| 05 | Famille des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour <i>S.aureus</i> . | 110 |
| 06 | Famille des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour les entérobactéries. | 111 |
| 07 | Famille des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour <i>Pseudomonas</i> . | 112 |
| 08 | Provenance des souches isolées selon le sexe, l'âge et la nature des prélèvements. | 112 |
| 09 | Réparation des espèces du groupe des entérobactéries et le groupe des bacilles à Gram négatif non fermentaire. | 51 |
| 10 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis 20 souches de <i>S. aureus</i> par la méthode des disques. | 62 |
| 11 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis 14 souche d'entérobactéries par la méthode des disques. | 64 |
| 12 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis 06 souche appartenant à l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la méthode des disques. | 65 |
| 13 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis 20 souche de <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode des disques. | 67 |
| 14 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis 14 souche d'entérobactéries par la méthode des disques. | 68 |
| 15 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis 06 souches appartenant à l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i> par la méthode des disques. | 70 |

| | | |
|----|---|----|
| 16 | Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis 20 souche de <i>S. aureus</i> par la méthode des microatmosphères. | 71 |
| 17 | Diamètres des zones d'inhibition de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis 15 souche d'entérobactéries par la méthode des microatmosphères. | 72 |
| 18 | Diamètres des zones d'inhibition de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis les six souches de <i>P.aeruginosa</i> par la méthode des microatmosphères. | 74 |
| 19 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis 20 souches appartenant à l'espèce <i>S. aureus</i> par la méthode des puits. | 75 |
| 20 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis 14 souche appartenant au groupe des entérobactéries par la méthode des puits. | 76 |
| 21 | Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d' <i>O.vulgare</i> contre les six souches de <i>P. aeruginosa</i> par la méthode des puits. | 78 |
| 22 | Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> . | 79 |
| 23 | Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'huile essentielle d' <i>Origanum vulgare</i> . | 81 |
| 24 | Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de la combinaison des deux HE d' <i>E.globulus</i> et <i>O.vulgare</i> contre les SARM. | 83 |
| 25 | Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de la combinaison d'oxacilline avec des deux huiles essentielles étudiés. | 84 |
| 26 | Rendements d'extraction des extraits aqueux pour les deux plantes étudiées. | 85 |
| 27 | Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'extrait aqueux d' <i>Eucalyptus globulus</i> vis-à-vis les 40 souches testées par la méthode des disques. | 86 |
| 28 | Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'extrait aqueux d' <i>Origanum vulgare</i> vis-à-vis les 40 souches testées par la méthode des disques. | 88 |

Sommaire :

Liste des abréviations.

Liste des figures.

Liste des tableaux.

Introduction.....1

Etude bibliographique.

I- Les huiles essentielles.....4

I-1- Définition..... 4

I-2- Répartition, localisation et biosynthèse.....4

I-3- Composition chimique.....5

I-4- Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles.....5

I-4-1- Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....6

I-4-2- Couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (CPG/MS).....6

I-5- Toxicité des huiles essentielles.....6

I-6- Conservation des huiles essentielles.....6

I-7- Méthodes d'extraction.....7

I-7-1- Distillation par entraînement à la vapeur.....7

I-7-2- Hydrodistillation.....8

I-7-3- Extraction par expression à froid.....8

I-7-4- Extraction par micro-ondes.....9

I-7-5- Extraction par CO₂ supercritique.....10

I-8- Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne.....11

| | |
|--|----|
| I-8-1- Technique de diffusion en disque ou aromatoigramme..... | 11 |
| I-8-2- Technique de diffusion en puits..... | 12 |
| I-8-3- Technique des micro-atmosphères..... | 12 |
| I-9- Mode d'action contre les bactéries..... | 12 |
| II- Etude de l'espèce <i>Eucalyptus globulus</i> | 14 |
| II-1- Origine et répartition géographique..... | 14 |
| II-2- Classification..... | 15 |
| II-3- Description botanique d' <i>Eucalyptu globulus</i> | 15 |
| II-4- Composition chimique..... | 16 |
| II-5- Propriétés des huiles essentielles..... | 18 |
| III- Etude de l'espèce <i>Origanum vulgare</i> | 19 |
| III-1- Origine et répartition géographique..... | 19 |
| III-2- Classification..... | 19 |
| II-3- Description botanique d' <i>Origanum vulgare</i> | 20 |
| III-4- Composition chimique..... | 21 |
| III-5- Propriétés des huiles essentielles..... | 22 |
| IV- Généralités sur les souches bactériennes..... | 23 |
| IV-1- <i>Staphylococcus aureus</i> | 23 |
| IV-2- Les entérobactéries..... | 24 |
| IV-3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 26 |
| Matériel et méthodes. | |
| Objectif de l'étude | 28 |
| Matériel | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 1- Souches étudiées..... | 30 |
| 2- Matériel végétal..... | 30 |
| 2-1- Critères de choix des plantes..... | 30 |
| 2-2- Cueillette, situation géographique et identification botanique..... | 30 |
| Méthodes..... | 33 |
| 1- Isolement des souches..... | 33 |
| 2- Purification des souches..... | 33 |
| 3- Identification des souches étudiées..... | 33 |
| 3-1- Recherche de l'oxydase..... | 33 |
| 3-2- Recherche de la catalase..... | 34 |
| 3-3- Recherche de la coagulase..... | 34 |
| 3-4- Identification biochimique par API système..... | 35 |
| 3-4-1- Identification biochimique par la galerie API Staph..... | 35 |
| 3-4-2- Identification biochimique par la galerie API 20 E..... | 35 |
| 3-4-1- Identification biochimique par la galerie API NE..... | 36 |
| 4- Test de sensibilité aux antibiotiques..... | 36 |
| 5- Détection de <i>S.aureus</i> méthicillino-résistants..... | 37 |
| 6- Conservation des souches..... | 37 |
| 7- Extraction des huiles essentielles..... | 37 |
| 7-1- Principe..... | 38 |
| 7-2- Mode opératoire..... | 38 |
| 7-3- Calcul du rendement..... | 39 |
| 8- Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles..... | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 8-1- Préparation des suspensions bactériennes..... | 40 |
| 8-2- Préparation des disques..... | 40 |
| 8-3- Tests de l'activité antibactérienne..... | 40 |
| 8-3-1- Méthode des disques ou aromatoigramme..... | 40 |
| 8-3-2- Méthode des micro atmosphères..... | 42 |
| 8-3-3- Méthode des puits..... | 43 |
| 8-3-4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB)..... | 44 |
| 9- Tests de synergie..... | 49 |
| 9-1- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées..... | 49 |
| 9-2- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées et l'oxacilline | 49 |
| 10- Extraction des extraits aqueux..... | 50 |
| 10-1- Mode opératoire..... | 50 |
| 10-2- Calculs des rendements d'extraction..... | 50 |
| 11- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux..... | 51 |
| 12- Etude statistique..... | 52 |
| Résultats | 53 |
| 1- Isolement des souches bactériennes..... | 53 |
| 2- Aspect microscopique..... | 53 |
| 3- Identification biochimique..... | 53 |
| 4- Répartition des souches isolées..... | 55 |
| 4-1- Répartition des souches selon le sexe..... | 55 |
| 4-1- Répartition des souches selon l'âge..... | 56 |

| | |
|--|----|
| 4-1- Répartition des souches selon la nature de prélèvement..... | 58 |
| 5- Test de sensibilité aux antibiotiques..... | 59 |
| 5-1- Résistance des souches de <i>S.aureus</i> aux antibiotiques..... | 59 |
| 5-2- Résistance des souches des entérobactéries aux antibiotiques..... | 61 |
| 5-3- Résistance des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques..... | 62 |
| 6- Détection de <i>S.aureus</i> méthicillino-résistant..... | 63 |
| 7- Extraction des huiles essentielles..... | 64 |
| 7-1- Propriétés organoleptiques..... | 64 |
| 7-2- Les rendements d'extraction..... | 64 |
| 8- Evaluation de l'activité antibactérienne..... | 64 |
| 8-1- Evaluation de l'activité antibactérienne des HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> | 65 |
| 8-1-1- La méthode des disques ou aromatoigramme..... | 65 |
| 8-1-2- La méthode des microatmosphères | 69 |
| 8-1-1- La méthode des puits..... | 69 |
| 8-2- Évaluation de l'activité antibactérienne de L'HE d' <i>Origanum vulgare</i> | 69 |
| 8-2-1- La méthode des disques ou aromatoigramme..... | 69 |
| 8-2-3- La méthode des microatmosphères..... | 73 |
| 8-2-3- La méthode des puits..... | 78 |
| 8-3- Détermination des CMI et CMB des huiles essentielles..... | 82 |
| 9- Tests de synergie..... | 85 |
| 9-1- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées..... | 85 |
| 9-2- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées et l'oxacilline (1 µg)..... | 87 |
| 10- Extraction des extraits aqueux..... | 88 |

| | |
|---|-----|
| 10-1- Rendements d'extraction des extraits aqueux..... | 88 |
| 11- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux..... | 88 |
| Discussion | 94 |
| Conclusion et perspectives | 111 |
| Référence bibliographique..... | 113 |
| Résumés..... | 139 |
| Annexe..... | 145 |
| Annexe des publications scientifiques..... | 150 |

INTRODUCTION

Au cours des années, plusieurs familles d'antibiotiques regroupant une centaine de molécules ont été développées et sont utilisées jusqu'à ce jour pour le traitement des maladies infectieuses. L'usage fréquent et non contrôlé de ces substances chimiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne est l'un des facteurs essentiels dans l'apparition et la propagation des bactéries multi résistantes, ce qui constitue un problème majeur de santé à l'échelle mondiale.

Cependant, l'efficacité des antibiotiques a décliné, une grande variété des espèces bactériennes responsables des infections nosocomiales qui sont apparues. Parmi les bactéries les plus incriminées dans ces infections, les bacilles à Gram négatif (BGN), dont on cite, la famille des Enterobacteriaceae, ainsi que *Pseudomonas aeruginosa*, et aussi *Staphylococcus aureus* du groupe des cocci à Gram positif (CGP) (Oliveira et al., 2002).

Actuellement, la problématique de la résistance aux antibiotiques interpelle les communautés scientifiques, car il est devenu très indispensable de trouver des nouveaux agents thérapeutiques. Pour cela, les chercheurs ont été orientés vers le monde végétal et particulièrement les plantes médicinales et culinaires représentant un potentiel inestimable pour la découverte de phytomédicaments à pouvoir antibactérien. Ainsi les huiles essentielles commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules bioactives (Bruneton., 1999 ; Teuscher et al., 2005). Elles rentrent dans la composition de plusieurs médicaments, sous forme de crèmes, gélules et suppositoires, leur utilisation s'appelle "l'aromathérapie", qui consiste à utiliser les huiles essentielles comme alternative pour le traitement des maladies d'origine bactérienne (Deans et al., 1994 ; Chalchat et al., 1997 ; Baser et al., 2001 ; Miguel et al., 2003 ; Yahyaoui., 2005).

L'Algérie, grâce à sa situation géographique, son relief, sa grande variété de climats et sols, possède une flore riche et diversifiée dans les régions côtières, les massifs montagneux, les hauts plateaux, le steppe et oasis sahariennes, renfermant plus de 3000 espèces végétales (Saad et al., 2005). Elle est considérée comme un pays riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique et agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes (Quézel et Santa., 1962). Ces plantes aromatiques sont à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines...) qui se présentent presque souvent

comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation (Bouhaddouda., 2016).

Dans le but de valoriser les extraits des plantes médicinales nationales, nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aqueux de deux plantes aromatique de l'est algérien très utilisées en médecine traditionnelle :

L'espèce *Eucalyptus globulus* appartenant à la famille des Myrtacées de la région d'El Kala, elle est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits des feuilles de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre la grippe, la toux, la sinusite, la bronchite et la rhinopharyngite et notamment comme anti-inflammatoire. Des études récentes soulignent des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de ces huiles essentielles.

Ainsi que l'espèce *Origanum vulgare* appartenant à la famille des Lamiacées de la région de Guelma, cette plante est parmi les plantes médicinales de référence en médecine traditionnelle, elle est utilisée pour traiter la toux, la coqueluche, fièvre et la bronchite et aussi les rhumes et les troubles digestives. Des travaux scientifiques confirment une forte activité antibactérienne et antioxydante de ces extraits (Pizzal et al., 2002; Sari et al., 2006).

Pour cela notre travail est structuré en trois parties :

La première partie est consacrée à une étude bibliographique composée de trois sous parties : la première comprend des généralités sur les huiles essentielles, la deuxième donne un aperçu sur la description, la classification, et la répartition géographiques des deux plantes étudiées (*Origanum vulgare* et *Eucalyptus globulus*), leurs composition chimique et utilisation en médecine traditionnelle. Dans la troisième, nous rappelons des généralités sur les bactéries étudiées (les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*).

Une deuxième partie expérimentale traitant le matériel et les méthodes expérimentales utilisées, cette partie est axée sur :

- Isolement et identification des souches bactériennes étudiées.
- Evaluation de leur antibiorésistance.
- Sélection des souches les plus résistantes aux antibiotiques.
- Extraction des huiles essentielles et détermination de leurs rendements.

- Evaluation in vitro du pouvoir antibactérien des huiles essentielles vis-à-vis des souches multirésistantes sélectionnées, en utilisant trois méthodes : la méthode des disques (aromatogramme), la méthode des puits et la méthode des micro atmosphères.
- Ainsi qu'une mise en évidence in vitro de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide des huiles essentielles étudiées.
- Etude de l'effet synergique entre les des deux huiles essentielles et chaque huile seule/ oxacilline pour les souches SARM.
- Extraction des extraits aqueux et détermination de leur rendement.
- Evaluation in vitro de l'effet antibactérien des extraits aqueux en utilisant la méthode des disques.

La troisième partie portera sur une synthèse des résultats obtenus avec discussion. Ce travail terminera par une conclusion et des perspectives.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

I- Les huiles essentielles :

I-1- Définition :

Le terme huile essentielle dérive de « quinta essentia », un nom donné par le médecin suisse Paracelsus aux extraits de plantes obtenues par distillation, il signifie la fragrance et la quintessence de la plante (Hart et al., 2008).

Il s'agit des substances odorantes, liquides, volatiles à température ambiante, hydrophobes, souvent colorées, totalement solubles dans l'alcool, ce type des huiles s'oppose aux huiles fixes qui sont des lipides par leur volatilité et leur composition chimique (Chapuis., 1997; Fernandez et al., 2002; Valnet., 2003; Baudoux., 2010). Elles sont obtenues à partir de feuilles, de graines, de bourgeons, de fleurs de brindilles, d'écorces, de bois, de racines, de tiges ou de fruits (Burt, 2004), mais également à partir de gommages qui s'écoulent du tronc des arbres.

Approximativement 3000 huiles essentielles sont connues, alors que 300 sont commercialement importantes. Grâce à leur activité antimicrobienne, antifongique, antiparasitaire et à leur fragrances, les huiles essentielles sont utilisées dans le domaine pharmaceutique, alimentaire, cosmétique..., néanmoins, une seule huile peut avoir plusieurs utilisations à la fois (Bakkali F et al., 2008).

I-2- Répartition, localisation et biosynthèse :

Les huiles essentielles sont largement réparties dans le règne végétal, les plantes capables d'élaborer les constituants qui composent ces essences sont connues sous le nom de plantes aromatiques, réparties dans un nombre limité de familles comme : **Myrtacées**, Lauracées, Rutacées, **Lamiacées**, Astéracées, Apiacées, Cupressacées, Poacées, Zingibéracées, Pipéracées. Elle peuvent être extraites à partir de tous les organes végétaux: sommités fleuries, écorces, racines, rhizomes, fruits, bois, etc. Au sein d'une même plante, elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes. Leur composition peut varier d'une partie de la plante à l'autre, elles sont produites dans le cytoplasme des cellules sécrétrices et s'accumulent en général dans des cellules glandulaires spécialisées, situées en surface de la cellule et recouvertes d'une cuticule (Belaiche., 1979 ; Paris et Hurabielle., 1981 ; Bruneton., 1999 ; Ghestem et al., 2001). Elles sont alors soit stockées dans une cellule transformée en cellule à essence (Lamiacées), ou dans des poils glandulaires (Lamiacées), des poches sécrétrices, des canaux sécréteurs (Rahili., 2002; Tenscher., 2005).

I-3- Composition chimique :

Les huiles essentielles sont des composés naturels très complexes qui peuvent contenir environ 20 à 60 composantes à différentes concentrations. Ils sont caractérisés par deux ou trois composantes importantes à assez hautes concentrations (20-70%) comparés à d'autres composantes présentées en quantités de trace (Croteau et al., 2000 ; Betts., 2001 ; Bowles., 2003 ; Pichersky et al., 2006).

En effet, les constituants des huiles essentielles peuvent être répartis en deux groupes conférant aux essences aromatiques leurs propriétés antibactériennes:

- Le groupe des terpénoïdes (les composés terpéniques) : il s'agit d'une famille de composés largement répandus dans le règne végétal, ils sont formés par la combinaison de 5 atomes de carbones (C5) nommée : isoprène. Ce groupe est subdivisé en deux sous-groupes : les monoterpènes et les sesquiterpènes.
- Le groupe des phénylpropanoïdes (les composés aromatiques) : sont beaucoup moins fréquents que les composés terpéniques. Ils comprennent plusieurs fonctions : alcool, phénols, dérivés méthoxy, composés méthylène dioxy.

Elles peuvent également renfermer divers produits issus du processus de dégradation mettant en jeu des constituants non volatils (Buchanan et al., 2000, Seguin., 2001; Rhayour., 2002; Bowles., 2003; Chami., 2005; Clarke., 2008; Baser et Buchbauer., 2010).

I-4- Méthodes d'identification chimique des huiles essentielles :

L'analyse chimique des huiles essentielles permet d'identifier et de quantifier ses composants. Les progrès des méthodes analytiques permettent d'identifier rapidement un très grand nombre de composés. En effet, la CPG est la méthode de référence utilisée pour analyser les huiles essentielles (Lehotay et al., 2002), elle permet l'analyse de mélanges, qui peuvent être de nature très complexe, et de volatilité très variée (Arpino et al., 1995).

I-4-1- La chromatographie en phase gazeuse (CPG) :

La CPG est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. C'est la technique de séparation la plus utilisée pour l'analyse de la composition chimique des huiles essentielles, car elle permet d'effectuer l'individualisation des constituants à partir d'échantillons de l'ordre du millilitre voire du microlitre. Les progrès technologiques réalisés dans le domaine des colonnes capillaires, des phases stationnaires et des détecteurs à ionisation de flamme (FID) ont contribué à rendre la CPG incontournable pour l'analyse des huiles essentielles (Paolini., 2005).

Chaque constituant est caractérisé par un indice calculé à partir d'une gamme d'alcane ou plus rarement d'esters méthyliques linéaires, dans les mêmes conditions d'analyse des échantillons (indice de Kováts) (Kováts E., 1965) ou en programmation de température (indices de rétention) (Van Den Dool H et al., 1963). Les temps de rétention, bien que spécifiques d'un composé, ont tendance à varier d'une analyse à l'autre, notamment du fait du vieillissement des colonnes (Paolini., 2005).

I-4-2- Couplage chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse (CPG/SM) :

La simplicité du couplage entre ces deux techniques, les progrès accomplis dans le traitement en temps réel du signal, la constitution de banques de données de spectre de masse et le développement des algorithmes de comparaison entre le spectre d'un composé inconnu avec ceux répertoriés dans la banque sont à l'origine de la généralisation de l'usage de la CPG/SM dans les laboratoires d'analyse des composés aromatisants. La CPG sur colonne capillaire constitue une excellente méthode d'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse. Ainsi, la colonne capillaire est directement couplée à la source d'ions permettant l'ionisation en impact électronique (Fernandez et al., 1988).

I-5- Toxicité des huiles essentielles :

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Certaines huiles essentielles sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines). D'autres huiles essentielles ont un effet neurotoxique, les cétones comme l' α -thujone sont particulièrement toxiques pour les tissus nerveux (Guba., 2001).

I-6- La conservation des huiles essentielles :

A cause de leur évaporation rapide, leur sensibilité à l'air et à la lumière, les huiles essentielles doivent être conservées dans des flacons opaques et fermés hermétiquement (Valnet., 1984 ; Salle et Pelletier., 1991).

I-7- Méthodes d'extraction :

Parmi de nombreuses techniques d'extraction des huiles essentielles, la distillation est la méthode la plus ancienne et également la plus utilisée. D'autres techniques plus récentes ont été développées afin d'améliorer le rendement ou la qualité des huiles essentielles extraites, diminuer le temps d'extraction, réduire la quantité du solvant utilisé et accélérer la cinétique d'extraction (Besombes.,2008).

I-7-1- Distillation par entraînement à la vapeur :

La distillation par entraînement à la vapeur est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles (Figure 1). Dans ce système d'extraction, le matériel végétal est placé dans l'alambic sur une plaque perforée située à une certaine distance au-dessus du fond rempli d'eau. Le végétal est en contact avec la vapeur d'eau saturée mais pas avec l'eau bouillante. La vapeur provoque la rupture d'un grand nombre de glandes qui libèrent leurs composés aromatiques. Les huiles essentielles diffusent donc à travers le végétal pour entrer en contact avec la vapeur d'eau circulant à l'extérieur. Les vapeurs chargées en composés volatils sont ensuite condensées avant d'être décantées. Du fait de leur différence de densité, les HE et l'eau sont séparées en deux phases et les HE sont ensuite récupérées (Nixon et Mc Caw., 2001). Cette technique permet d'éviter des réactions lors du contact des constituants des huiles essentielles avec l'eau conduisant à des changements dans la composition finale de l'extrait. En outre, elle agit mieux avec les huiles essentielles contenues dans les glandes situées à la surface du végétal. La distillation à la vapeur des huiles essentielles non superficielles est plus longue et exige plus de vapeur que celle des HE superficielles.

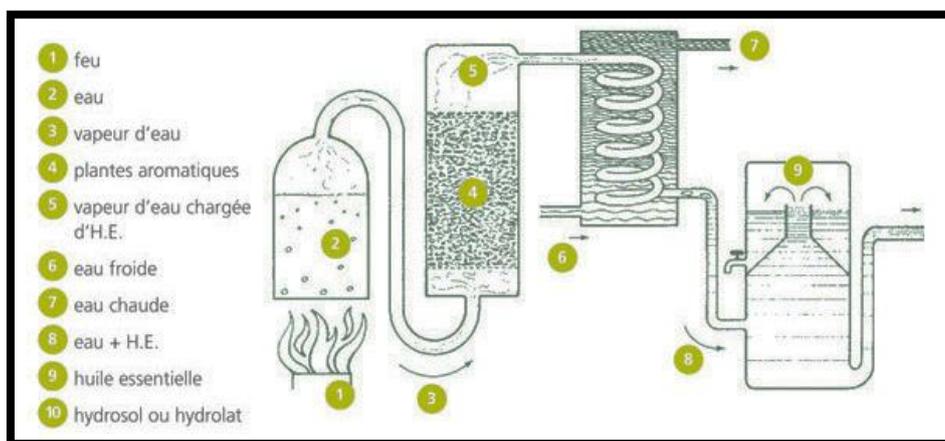


Figure 1 : Schéma du montage de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau.

(<http://www.pranarom.com/informations/huiles-essentiels-footer-a>)

I-7-2- Hydrodistillation :

Dans un premier temps, l'extraction des huiles essentielles se fait en plongeant la matière première dans l'eau puis porter à ébullition, c'est l'hydrodistillation (figure 2). Par la suite, la matière première et l'eau sont séparées : soit l'eau est placée au fond de la cuve avant d'être portée à ébullition pour qu'un courant de vapeur d'eau traverse la matière première, c'est la vapo-hydrodistillation ; soit la vapeur d'eau est générée dans une chaudière à l'extérieur de l'alambic, technique dite vapo-distillation. Dans ces divers cas, la vapeur d'eau chargée d'huile essentielle est dirigée vers un condenseur formé généralement d'un serpentín, à tubes parallèles, dans lequel circule de l'eau froide. Une fois condensées, eau et huile essentielle sont acheminées vers un essencier ou vase florentin. Dans ce dernier, les deux liquides, non miscibles : l'eau aromatisée et l'huile essentielle. La séparation se fait ensuite par une simple décantation (Besombes., 2008).



Figure 2 : Schéma du montage de l'extraction par hydrodistillation (Lucchesi., 2005)

1: Chauffe-ballon 2:Eau bouillante 3:Thermomètre 4:Réfrigérant à eau 5:Arrivée d'eau froide et Sortie d'eau tiédie 6:Essencier 7:Végétal 8:Huile Essentielle

I-7-3- Extraction par expression à froid :

Il s'agit du procédé d'extraction le plus simple et le plus limité. C'est une méthode artisanale qui est totalement abandonnée (figure 3). Les plantes sont pressées à froid (notamment les agrumes : citron, orange) de l'écorce ou des fruits (Benjilali B., 2004). Cette technique consiste à briser mécaniquement les poches oléifères de zestes frais d'agrumes pour libérer leur contenu aromatique. La rupture de la paroi des poches oléifères fait intervenir trois procédés:

- Une technique qui agit sur le fruit entier, elle utilise des machines exerçant une action abrasive.
- Une technique qui agit sur le fruit sans endocarpe. Elle utilise des machines exerçant une pression suffisante pour libérer l'essence.
- Un troisième procédé permet d'extraire en une seule opération l'essence et le jus sans mélanger les deux produits (Garnero J., 1991). Le produit obtenu se nomme « essence » et non huile essentielle, car aucune modification chimique liée à des solvants ou à la vapeur d'eau n'a lieu (Couic-Marinier F et al., 2013 ; Lamendin H., 2004).

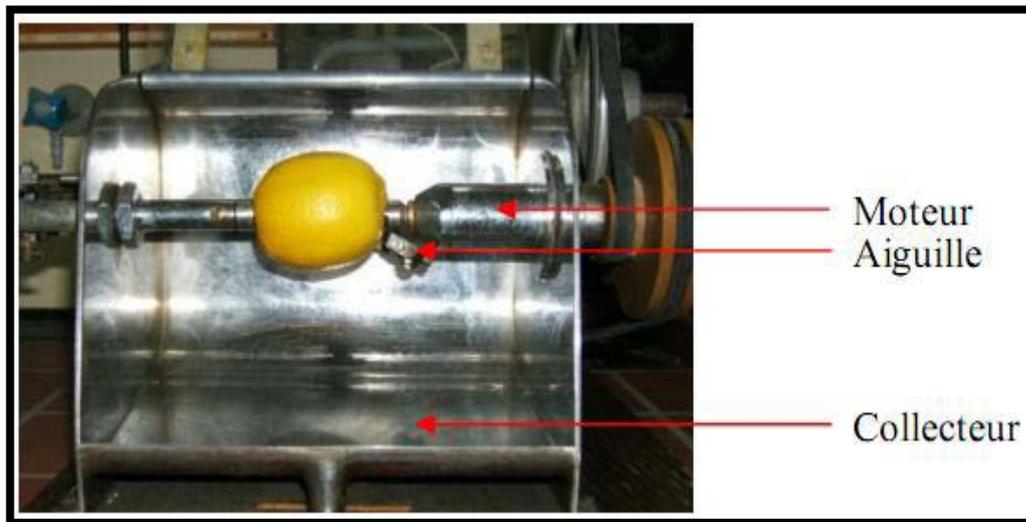


Figure 3 : Schéma du montage de l'extraction par la pression à froid (Farhat. A ., 2010).

I-7-4- Extraction par micro-ondes :

Au début des années 1990 est apparue une toute nouvelle technique appelée hydrodistillation par micro-ondes sous vide (Figure 4). Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par micro-ondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation (Zenasni., 2014).

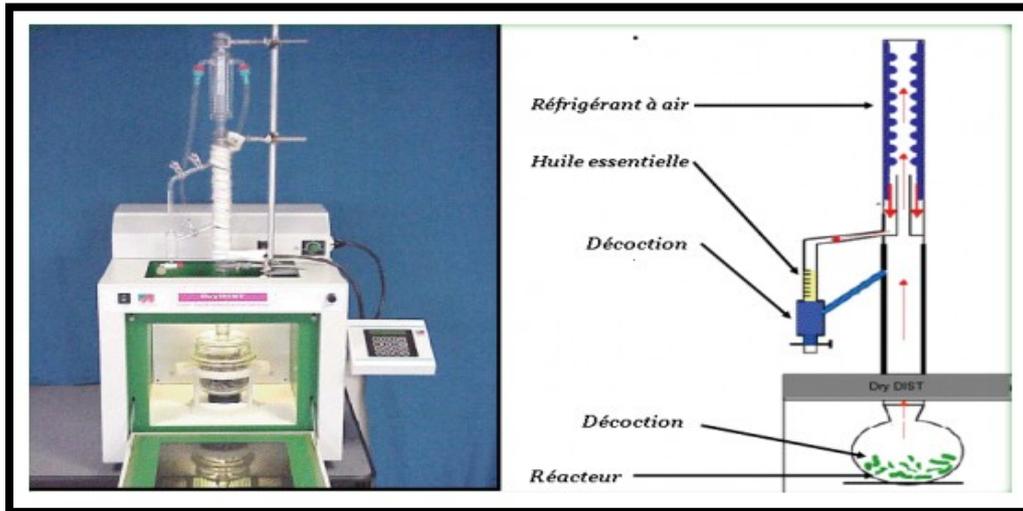


Figure 4 : Schéma du montage de l'extraction par micro-onde.

(<https://www.google.dz/huile-essentielle2013.e-monsite.com%2Fpages%2Fi-1%2Fcat->).

I-7-5- Extraction par CO₂ supercritique :

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé: il s'agit du CO₂ en phase supercritique. L'extraction consiste à comprimer le dioxyde de carbone à des pressions et à des températures au-delà de son point critique (P=72.8 bars et T= 31.1°C). A l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux (Peron L., 1992). Les avantages de ce procédé sont les suivants (figure 5) :

- Le CO₂ est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et peu coûteux (Bruneton J., 1999 ; Wichtel M et al., 1999).
- En fin de cycle, la séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO₂ à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse (Bruneton J., 1999) ;
- L'extraction des huiles essentielles par le CO₂ supercritique fournit des huiles de très bonne qualité et en temps d'extraction relativement court par rapport aux méthodes classiques (Scheffer., 1996).

Cependant l'installation industrielle de ce procédé reste onéreuse, et l'appareillage est encore envahissant.

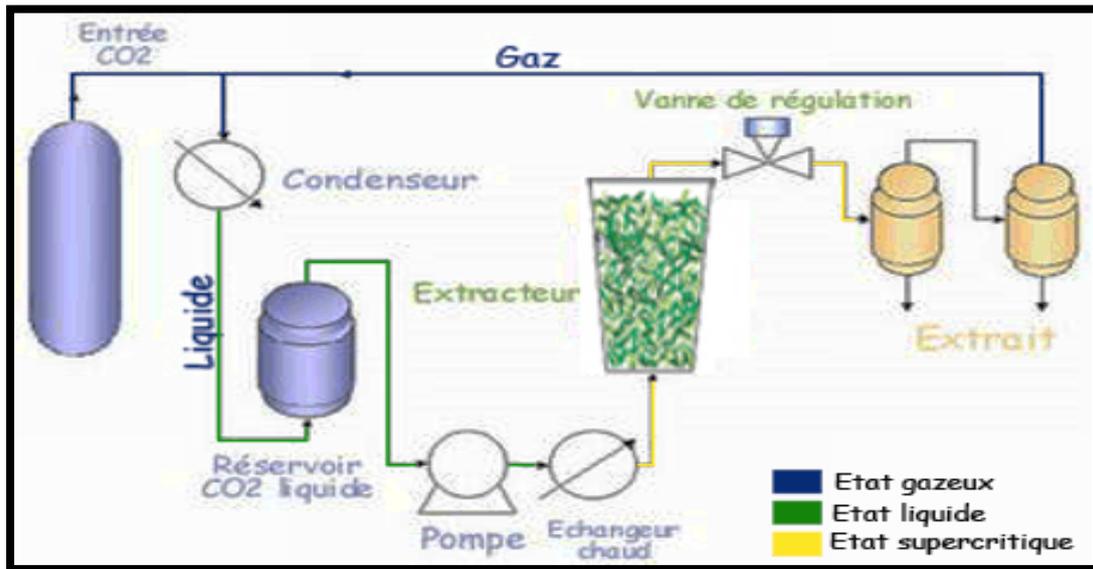


Figure5 : Schéma du montage de l'extraction par CO₂ supercritique.

(<https://www.google.dz.soin-et-nature.com%2Fles-differentes-techniques-pour-obtenir-des-huiles-essentielles>).

En conclusion, il n'existe pas de procédé meilleur que d'autre. Chaque méthode possède sa propre indication selon le végétal ou la partie du végétal et l'utilisation du produit obtenu commande ainsi que l'aspect économique qui est tout aussi important (Collin G., 2000).

I-8- Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne :

La détermination du pouvoir antibactérien des huiles essentielles fait appel à plusieurs techniques expérimentales. Cependant, ces méthodes utilisées donnent parfois des résultats différents selon les conditions opératoires expérimentales pour chaque manipulateur (Surk., 2003). L'insolubilité des huiles essentielles dans l'eau et d'une manière générale dans les milieux aqueux largement utilisée en microbiologie, est une des explications de la variété des techniques d'évaluation, selon la souche bactérienne, l'huile essentielle et l'application choisie, divers techniques peuvent être mis en œuvre.

I-8-1- Technique de diffusion en disque ou aromatoگرامme :

C'est une méthode de mesure *in vitro* du pouvoir antibactérien des huiles essentielles (Girault., 1971). Cet examen est équivalent à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par des essences préalablement sélectionnées et reconnues. Il s'agit d'une méthode en milieu Muller-Hinton réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier (de cellulose, Wattman ou filtre) de 6 mm sur lequel est disposé une

quantité donnée d'huile essentielle (Bondi., 1993). Après ensemencement et incubation, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés.

Pour cette technique, la sensibilité de la bactérie testée peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu. En effet, la sensibilité d'une bactérie est nulle pour un diamètre inférieur ou égal à 8 mm. Elle est limitée pour un diamètre compris entre 8 et 14 mm, et moyenne pour un diamètre entre 14 et 20 mm. Pour un diamètre supérieur ou égale à 20 mm le germe est très sensible (Duraffourd., 1990).

I-8-2- Technique de diffusion en puits :

Un puits (d'environ 6mm) est creusé au centre de la gélose dans lequel sera coulée une quantité d'huile essentielle pure ou diluée. Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenues (pour les huiles actives) et mesurées (Dorman., 2000). Pour cette technique, la sensibilité des bactéries est évaluée de la même façon que l'aromatogramme.

I-8-3- Technique des micro-atmosphères :

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné de l'huile essentielle au centre du couvercle d'une boîte de Pétri, sans que l'huile essentielle entre en contact avec la gélose ensemencée par les bactéries. La boîte est hermétiquement fermée et placée couvercle en bas à l'étuve à 37°C.

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées, donc l'essence n'agit qu'à l'état des vapeurs qu'elle développe à 37°C. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum (Benjilali et al, 1986).

I-9- Mode d'action contre les bactéries :

L'activité antibactérienne des HE a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antibactérienne de ces HE. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable, jusqu'à présent, il n'existe pas d'étude pouvant nous donner une idée claire et précise sur le mode d'action des HE. Etant donné la complexité de leur composition chimique, tout laisse à penser que ce mode d'action

est assez complexe et difficile à cerner du point de vue moléculaire. Il est très probable que chacun des constituants des HE ait son propre mécanisme d'action (figure 6).

D'une manière générale, leur action se déroule en trois phases :

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

Le mode d'action des HE dépend aussi du type de bactéries: en général, les bactéries Gram - sont plus résistantes que les Gram + grâce à la structure de leur membrane externe. Ainsi, la membrane extérieure des Gram - est plus riche en lipo-polysaccharides et en protéines que ceux de Gram+ qui la rend plus hydrophile, ce qui empêche les terpènes hydrophobes d'y adhérer. Néanmoins, certains composés phénoliques de bas poids moléculaire comme le thymol et le carvacrol peuvent adhérer à ces bactéries par fixation aux protéines et aux lipopolysaccharides membranaires grâce à leurs groupements fonctionnels et atteindre ainsi la membrane intérieure plus vulnérable (Zani et al., 1991).

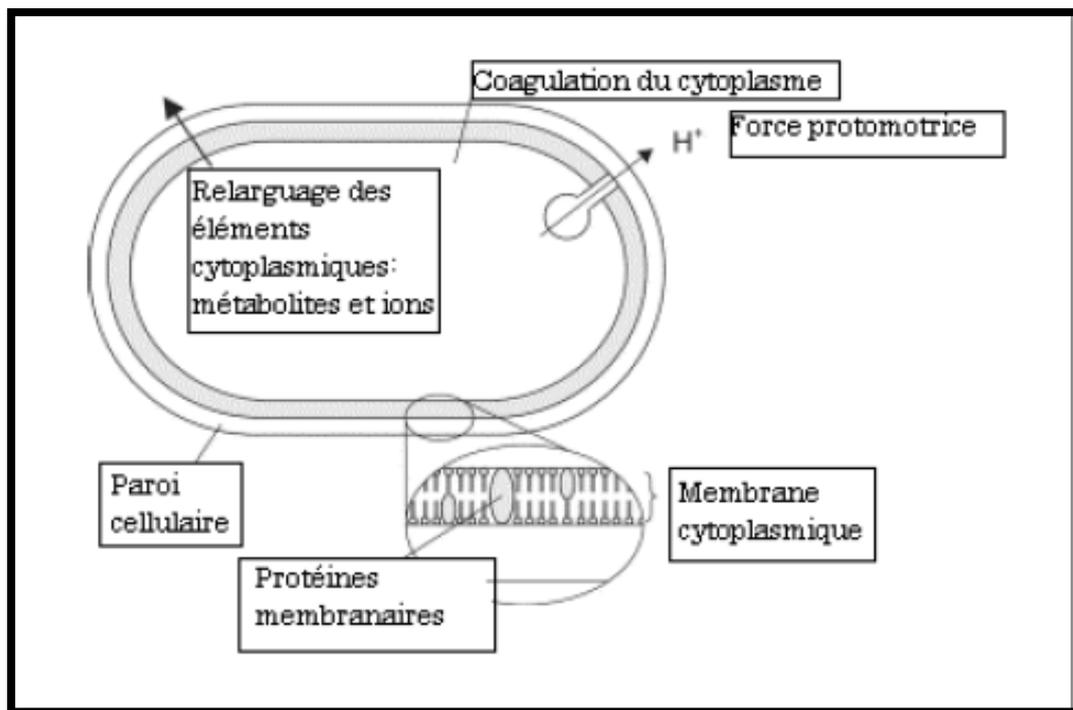


Figure 6 : Sites d'action des huiles essentielles sur la cellule bactérienne (Burt., 2004).

II- Étude de l'espèce *Eucalyptus globulus* :

Le genre *Eucalyptus* fait partie de la famille des Myrtacées, son nom a pour origine les mots grecs: eu «bien» et kaluptos «couvert». Il fut décrit et baptisé en 1788 par le botaniste français L'HERITIER, après qu'il eut examiné des échantillons d'*Eucalyptus obliqua*, parmi les plantes australiennes récoltées par NELSON. Dix-neuf espèces d'*Eucalyptus* avaient été nommées en 1800 et 28 en 1820. En 1840, 71 espèces d'*Eucalyptus* avaient reçu des noms et 149 en 1890. Depuis lors, des savants botanistes se sont succédés dans la description des espèces d'*Eucalyptus* et W. F. BLAKELY, assistant de MAIDEN, décrivait 500 espèces dont 138 variétés en 1938 (Bingendako., 2004). Le nombre d'espèces d'*Eucalyptus* introduites dans différents pays est supérieur à 150, moins d'une trentaine sont exploitées de façon significative en plantation et quatre espèces (*E.camaldulensis*, *E. globulus*, *E. tereticornis* et *E. grandis*) occupaient à la fin des années quatre-vingts, plus de la moitié des surfaces plantées (Elderidje et al., 1993). L'une de ses espèces *Eucalyptus globulus* fera l'objet de notre étude.

II-1- Origine et répartition géographique :

Le genre *Eucalyptus* est endémique en Australie et en Tasmanie. Il est cultivé de nos jours dans quelques régions subtropicales d'Afrique, d'Asie (Chine, Inde, Indonésie) et d'Amérique du Sud ainsi qu'en Europe méridionale et aux États-Unis (Bouamer., 2004).

Son introduction en Algérie fut par les français en 1860. L'espèce pionnière semble être l'*E.camaldulensis*, mais d'autres espèces furent introduites dans des placettes d'essais notamment à Reghaia, Bouchaoui et El-Alia dans la région d'Alger. Cette zone d'introduction a été tellement favorable pour des croisements naturels qui ont donnés des hybrides dont l'*Eucalyptus* «Algériensis». Dans les années 40 et 50 les *Eucalyptus* furent introduits dans 18 arboretums couvrant les étapes bioclimatiques humides et semi-arides. Dans ce cadre pas moins de 130 espèces ont été plantés sur le territoire national. Pendant les années 60 à 70, les reboisements à base d'*Eucalyptus* ont concernés notamment l'Est (**El-Kala**, Annaba, Skikda), le centre (Tizi-Ouzou, Baïnem) et l'Ouest (Mostaganem) et ceci afin de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et papetiers (INRF., 1996).

II-2- Classification :

La classification scientifique réalisée par l'AGP (Angiosperms Phylogeny Groupe) sur le genre *Eucalyptus* a permis de déterminer la systématique indiquée dans le tableau suivant : (Guignard., 2001).

Tableau 1 : Systématique de l'espèce *Eucalyptus globulus* (Guignard., 2001).

| | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Phanerogames |
| Sous embranchement | Angiospermes |
| Classe | Eudicots |
| Ordre | Myrtales |
| Sous ordre | Rosids-Eurosids II |
| Famille | Myrtaceae |
| Genre | <i>Eucalyptus</i> |
| Espèce | <i>Eucalyptus globulus</i> |

II-3- Description botanique d'*Eucalyptus globulus* :

Les Eucalyptus sont des arbres qui poussent très rapidement. L'*Eucalyptus globulus* mesure 30 à 60 mètres de haut et il peut atteindre jusqu'à 100 mètres dans certains cas. Son tronc est lisse et sa couleur varie du blanc au gris. Son écorce se détache facilement en longues bandes. Les jeunes feuilles sont cireuses, ovales, claires, opposées et sessiles. Mais ce sont les feuilles poussant sur les vieilles branches qui sont officinales car ce sont les seules à posséder des poches à essences sur la face inférieure.

Ces feuilles peuvent atteindre 25 centimètres de long. Elles sont falciformes, alternes, pétiolées, de couleur gris-vert. Les feuilles ont une nervure principale surtout distincte sur la face inférieure. La plante coupée est reconnaissable par la présence de nombreuses poches sécrétrices sur la face inférieure de la feuille (figure 7).

Les fleurs, visibles au printemps, naissent à l'aisselle des feuilles, le calice a la forme d'une toupie bosselée dont la partie large est couverte par un opercule qui se détache au moment de la floraison laissant apparaître de nombreuses étamines. Le fruit est la capsule anguleuse du calice, il renferme deux types de graines (Nathalie., 2016).



Figure 7: Fruits, feuilles, Fleurs et étamines d'*Eucalyptus* (Nathalie., 2016).

II-4- Composition chimique :

La famille Myrtacées comme d'autres familles de plantes médicinales, se caractérise par l'abondante de production d'huile.

Les *Eucalyptus* sont aussi extrêmement intéressants pour leurs tanins, résines et huiles essentielles que renferment les feuilles, les tiges et même l'écorce et qui ont des applications très importantes en médecine (Bigendako., 2004). L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* contient environ 70% en eucalyptol (1,8- cinéole) et ce dernier considéré comme un composé majoritaire dans plusieurs espèce d'*Eucalyptus* : *E. viridis* et *E. salubris*...etc (Sroka., 2005).

La composition chimique des huiles essentielles de feuilles de l'*Eucalyptus globulus* d'après certaines études est résumée dans le tableau 2.

Tableau 2 : Composition chimique des huiles essentielles de feuilles de l'*Eucalyptus globulus* locales (Cimanga et al.,2001), (Manika et al., 2013), (Tyagi et al., 2010).

| les composants des huiles essentielles identifiés par CPG/MS | Le pourcentage de chaque composant (%) | | |
|--|--|-----------------------|----------------------|
| | (Cimanga et al., 2001) | (Manika et al., 2013) | (Tyagi et al., 2010) |
| α -Thuyene | - | 0.1 | - |
| α - Pinene | 9.3 | 2.8 | 4.2 |

| | | | |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Camphene | 23.1 | 0.3 | - |
| β - Pinene | 2.7 | - | - |
| Myrcene | - | - | - |
| Limonene | 5.1 | - | 17.8 |
| 1,8-Cineole (Eucalyptol) | 44.3 | 84.2 | 45.4 |
| α -Phellandrene | - | - | 1.3 |
| β -Ocimene | - | - | 1.0 |
| γ -Terpinene | - | 0.2 | 8.8 |
| ρ -Cymene | 1.6 | - | 9.5 |
| cis-Linalool oxide | - | 0.5 | 9.5 |
| Citronellal | - | 0.1 | - |
| Linalool | 0.3 | - | 0.5 |
| Isopugegol | - | - | - |
| β -Caryophyllene | - | - | - |
| Aromandendrene | 1.3 | 1.6 | - |
| β -Terpineol | - | 0.2 | - |
| Terpin-4-ol | 0.2 | 2.1 | 1.4 |
| Myrtenal | - | - | - |
| α -Humulene | - | - | - |
| Cryptone | 1.3 | - | - |
| α -Terpineol | 0.3 | 0.2 | 3.6 |
| Borneol | - | 0.1 | 0.1 |
| α -Terpenyl acetate | 1.2 | - | - |
| Geranial | - | - | - |
| Carvacrol | - | - | - |
| β -Elemene | - | - | - |
| Cuminaldehyde | - | - | - |
| Citronellol | 0.1 | - | - |
| Myrtenol | - | - | - |
| Netrol | - | - | - |
| Geraniol | 0.2 | - | 0.1 |

| | | | |
|---------------------|-----|-----|---|
| Citronellyl acetate | - | - | - |
| Neryl acetate | - | - | - |
| Geranyl acetate | - | - | - |
| Globulol | 7.3 | 1.7 | - |
| Spathulenol | - | 0.3 | - |
| Eugenol | - | 0.4 | - |
| Methyleugenol | - | - | - |
| Thymol | - | 0.2 | - |
| α -Eudesmol | - | 1.1 | - |
| β - Eudesmol | - | 0.1 | - |

II-5- Propriétés des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* :

Grâce à sa composition chimique et à son principe-actif qui est le 1.8 cinéole, l'HE d'*Eucalyptus* possède des vertus considérables, elle est très recherchée pour son action antiseptique et cicatrisante. Elle agit comme un antibiotique naturelle pour soigner certaines maladies respiratoires comme la grippe, la toux, la sinusite, la bronchite et la rhino-pharyngite tandis qu'en dermatologie, elle sert pour traiter l'acné, entre autres. Son action est particulièrement remarquable au niveau du poumon par sécrétion d'un mucus antiseptique. Pour ceux qui ont des problèmes de fièvre persistante, c'est un excellent fébrifuge qui a la propriété de faire baisser rapidement la fièvre et de réguler la température du corps. En outre, de nombreuses maladies gastro-intestinales peuvent également être soulagées par l'huile essentielle d'*Eucalyptus* grâce à ses propriétés anti-infectieuses et antibactériennes (Candy., 1977).

III- Étude de l'espèce *Origanum vulgare* :

Le genre *Origanum* fait partie de la famille Lamiacées connue également sous le nom des labiées. Le terme *Origanum* vient de deux mots grecs, "*oros*" qui veut dire montagne et "*ganos*" qui signifie éclat ; ce mot signifierait "ornement des montagnes" (Zenasni., 2014).

Le genre *Origanum* comprend environ 70 espèces, sous-espèces, variétés et hybrides, caractérisés par une extrême variabilité dans leurs caractères morphologiques (longueur de la tige, arrangement, nombre et longueur des branches, formes des feuilles,...) (Kintzios., 2002).

Origanum vulgare (Origan) étant l'espèce la plus répandue et la plus connue de la famille des Lamiacées (Spada et Perrino, 1996), l'une de ses sous espèces *Origanum vulgare* ssp. synonyme d'*O. glandulosum* Desf fera l'objet de notre étude.

III-1- Classification :

La classification des différentes espèces et hybrides est une tâche très délicate. D'après Quezel et Santa (1963), Ietswaart (1980), Guignard et Dupont (2004), l'espèce *Origanum vulgare* occupe la systématique indiquée dans le tableau 3.

Tableau 3 : Systématique de l'espèce *Origanum vulgare* (Ietswaart., 1980; Quezel et Santa., 1963).

| | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| Règne | Plantae |
| Embranchement | Phanérogames ou Spermaphytes |
| Sous embranchement | Angiospermes |
| Classe | Eudicots |
| Ordre | Lamiales |
| Sous ordre | Rosids-EurosidsII |
| Famille | Lamiaceae |
| Genre | Origanum |
| Espèce | <i>Origanum vulgare</i> |

III-2- Origine et répartition géographique :

Le genre *Origanum* est originaire de Sud-Est méditerranéen et de l'Asie occidentale (Vokou et al., 1993). Ce genre est largement présent dans les îles Canaries et les Açores, dans l'Europe du Nord et jusqu'à l'Est de l'Asie. On peut le rencontrer aussi en culture à Cuba ou dans l'île de

la Réunion, mais la région méditerranéenne représente son aire de distribution la plus importante (figure 8).

La plupart de ces espèces sont originaires du bassin méditerranéen. Environ 75% se trouvent dans l'Est méditerranéen et seulement quelques espèces se produisent dans la partie occidentale de la Méditerranée (Kokkini., 1996; Skoula et al., 1999 ; Baser., 2002)

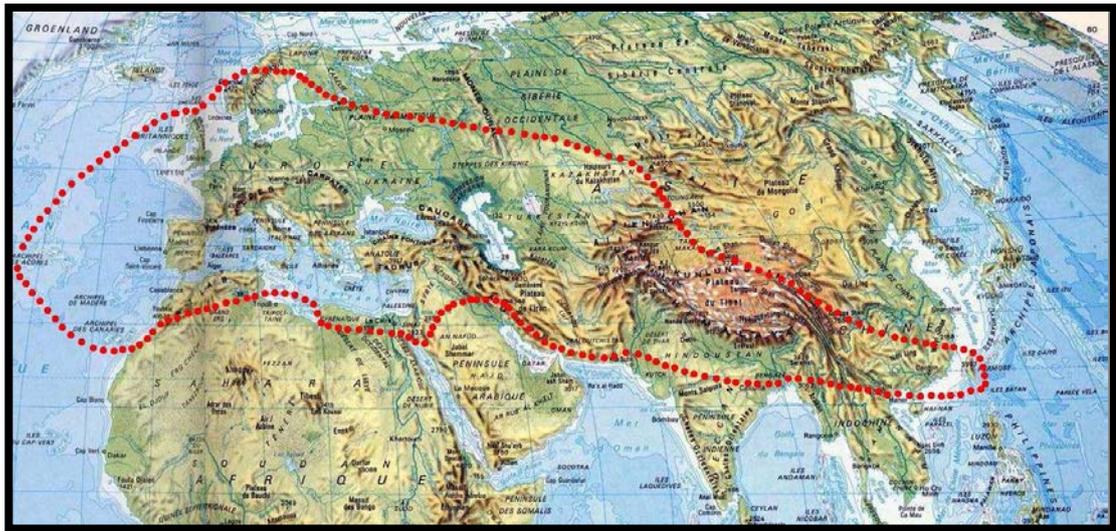


Figure 8: Aire de distribution du genre *Origanum* (Ietswaart., 1980).

III-3- Description botanique :

L'origan est une herbacée vivace de 30 à 60 cm de hauteur, au feuillage et aux fleurs très odorants quand on les froisse (figure 9). Elle est ainsi reconnaissable à son odeur et à sa saveur phénolée, épicée et chaude (Arvy et Gallouin., 2003 ; Teuscher et al., 2004).

Les tiges dressées, souvent rougeâtres et velues, portent les feuilles ovales opposées et espacées. Celles-ci possèdent des glandes sécrétrices sessiles non apparentes. Les fleurs blanches ou rose sont groupées en inflorescences. Chaque fleur est située à l'aisselle d'une bractée ovale, et dépassant le calice. Ce calice est lui-même en tube gamosépale et persistant.

La corolle, plus grande que le calice, est quant à elle bilabée à tube saillant à la base et gamopétale. Le fruit est constitué d'akènes. La floraison se prolonge de mai à octobre (Baba Aissa., 1990 ; Teuscher et al., 2004 ; Figueredo., 2007).



Figure 9 : Aspects morphologiques d'*Origanum vulgare* (Iserin., 2001)

III-4- Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles du genre *Origanum* varie selon les espèces et leur provenance. L'analyse chimique des constituants des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* récoltés dans différentes régions en Algérie signalent la présence de deux chimiotypes majoritaires : l'un contient comme principaux composants des phénols : thymol et/ou carvacrol et l'autre est constitué principalement d'alcools monoterpéniques comme le terpinen-4-ol, seul ou en présence de cis- et de trans-sabinène hydrate (Tableau 4).

Tableau 4 : Teneur en thymol, carvacrol et para-cymène de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* de différentes régions d'Algérie.

| Composés identifiés | Pourcentage de chaque composé (%) | | |
|---------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| | Berrahal et al en 2010 Constantine | Semra et al en 2013 Zigoud Youcef | Bouhaddouda et al en 2016 Nechmaya (Guelma) |
| Thymol | 34,7 | 70.6 | 23.12 |
| Carvacrol | 32,8 | 5.7 | 20.32 |
| Para-cymène | 8,2 | 0,0 | 25,61 |

III-5- Propriétés des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* :

L'origan est connu depuis l'antiquité pour ses qualités médicinales. En fait, une décoction de cette plante est utilisée contre la coqueluche, la toux, la fièvre, la bronchite (Ruberto et al., 2002), le rhume et le rhumatisme (Mahmoudi., 1990) alors que sous forme de poudre elle est employée pour soulager les douleurs rhumatismales (Ruberto et al., 2002).

C'est une plante apéritive, expectorante, carminative (Baba Aïssa, 1999), stomachique (Baba Aïssa., 1999; Sijelmassi., 1991), stimulante (Fourment et Roques., 1941) et possède des propriétés antiseptique, antitussif et antispasmodique (Sijelmassi., 1991 ; Baba Aïssa., 1999). Cette plante jouit d'une grande faveur populaire en Algérie et en Tunisie comme remède contre la toux et les affections respiratoires. Par contre, l'origan du Maroc (*Origanum compactum*) est consommé sous forme d'infusion pour calmer les coliques (Baba Aïssa., 1999).

Belhattab et al. en 2004, rapportent que les huiles essentielles de cette plante ont montré un effet inhibiteur sur les levures et les moisissures isolées à partir de l'hôpital central de Sétif.

Enfin, les huiles essentielles des différentes espèces *d'Origanum* ont des activités antibactériennes (Pizzal et al., 2002; Sari et al., 2006) et antifongiques (Paster et al., 1995; Sari et al., 2006).

IV- Généralités sur les souches bactériennes étudiées :

IV-1- *Staphylococcus aureus* :

Les staphylocoques ont été mis en évidence pour la première fois en 1878 dans le pus d'abcès par Koch en Allemagne. La dénomination de *Staphylococcus* a été introduite en 1883 par Ogston et provient de l'association des termes grecs Staphylê, grappe de raisin et Kokkos, grain. La classification des staphylocoques a connu de nombreux bouleversements; lors de la première édition en 1923 du « Bergey's Manual ® of Determinative Bactériology », les staphylocoques étaient classés dans la famille des Streptococcaceae puis lors de la deuxième édition en 1926 dans la famille des Micrococcaceae (Touaitia., 2016).

Actuellement sa position taxonomique est bien définie il s'agit de la famille Staphylococcaceae (Garrity et al., 2002). Cette famille comporte les genres *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macroccoccus*, ainsi que le plus important le genre *Staphylococcus* (Dworkin et al., 2006). Ce genre comprend actuellement 53 espèces et sous-espèces. Néanmoins, le nombre d'espèce n'a cessé d'augmenter au cours des 20 dernières années et le genre a été remanié (Touaitia., 2016).

Selon la 9^{ème} édition du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, les staphylocoques sont classés comme suivant:

Règne : Bacteria

Division: Firmicutes

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : *Staphylococcus* (Prescott., 2010).

Les critères de base de la classification des espèces du genre *staphylococcus* restent la présence d'une catalase et la production de la coagulase libre, enzyme responsable de la coagulation du sérum humain. On distingue ainsi sept espèces et sous espèces à coagulase positive dont *S.aureus*, et quarante-six à coagulase négative (Le Loir Y et Gantier M., 2010).

S. aureus est un coque à Gram positif d'environ 0,7 à 1,2 micromètre de diamètre qui se trouve seul, en paires ou en grappe dans divers milieux liquides et solides. Cette bactérie aérobie ou anaérobie facultative a une température optimale de croissance de 37 °C lui conférant le caractère de mésophile.

Cette espèce est considérée avant tout comme une bactérie commensale. En effet, elle fait partie de la microflore normale de la peau, du tractus intestinal et du nasopharynx. Dix à 35 % de la population générale sont des porteurs sains permanents et 60 % des individus sont des porteurs sains temporaires de *S. aureus* (Edwards et Massey., 2011). Cependant, *S. aureus* peut se retrouver dans d'autres niches écologiques dont la terre, l'air, l'eau et les aliments dont les produits laitiers. Certaines souches infectent les mammifères incluant l'humain. C'est le staphylocoque à coagulase positif le plus isolé d'infections humaines puisqu'il est capable de produire l'enzyme menant à la coagulation du plasma sanguin.

Ce pathogène provoque un large éventail d'infections cliniques, allant des infections courantes telles que les infections de la peau et des tissus mous à des infections meurtrières comme la septicémie, la pneumonie et les toxinoses, telles que le syndrome du choc toxique (Alouia., 2015).

IV-2- Les entérobactéries :

Le nom «Enterobacteriaceae» fait référence à la localisation de cette famille de bactéries dans le tube digestif et principalement le côlon de l'homme et des animaux, bien qu'ils soient également présents dans l'environnement. C'est une famille hétérogène, regroupe des bactéries à Gram-négatif, fréquemment impliquée dans les infections humaines. Elle se compose d'environ 30 genres de bactéries et de plus de 100 espèces (Avril et al., 2000). Selon le manuel de Bergy's, Cette famille est classée comme suit :

Règne : Bacteria

Division : Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Enterobacteriales (Grimont F et Grimont., 2002).

La famille des entérobactéries regroupe l'ensemble des bacilles droits, ayant un diamètre de 0,3-1,8 µm. Les cellules prennent une coloration à Gram négatif étant mobiles (flagelles péritriches) ou immobiles. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives et chimiorganotrophes ayant un métabolisme simultanément de type fermentatif et respiratoire.

De type oxydase négative, la plupart réduisent les nitrates, excepté certains genres ou espèces (Habi., 2010).

Dans notre partie paratique, les espèces d'entérobactéries ciblées sont : *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*. Pour cela, nous rappelons brièvement quelques caractéristiques générales de ces espèces bactériennes.

➤ *Escherichia coli* :

C'est une bactérie très courant, son habitat est le colon humain où elle est la plus abondante, alors que sa survie est extrêmement difficile dans l'environnement. *E. coli* cause principalement des infections du tractus digestif, la plus connue étant la diarrhée du voyageur, en raison de la contamination de l'eau ou des aliments par la flore fécale des malades ou des porteurs. Il est également l'espèce préférentielle des infections urinaires. L'incidence de ces infections est plus marquée chez les personnes de sexe féminin en milieu extrahospitalier en raison notamment de la colonisation de la région péri-urétrale et de la longueur de l'urètre. En milieu hospitalier, l'incidence est égale entre les deux sexes en rapport essentiellement avec l'utilisation fréquente des sondes urinaires.

Cette espèce est aussi à l'origine d'infections pulmonaires chez les personnes gravement malades, ces patients étant souvent colonisés au niveau des voies respiratoires supérieures. Elle peut coloniser le vagin et générer des méningites néonatales suite au passage du nouveau-né à travers la voie génitale maternelle colonisée ou suite à l'infection du liquide amniotique consécutive à une rupture prolongée des membranes (Dioman., 2008).

➤ *Klebsiella pneumoniae* :

K.pneumoniae est une espèce ubiquiste, isolée des eaux de surface, des eaux usées, des effluents industriels, du sol, du bois, de végétaux divers (Dong et al., 2003) et des aliments. Elle est également retrouvée dans la flore fécale d'environ 30% des animaux et de l'homme, elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment respiratoires (Baerwolf et al., 2002).

K.pneumoniae est responsable d'infections spontanées dans 25% des cas, mais surtout d'infections nosocomiales. Dans ce dernier cas, elle est transmise par la manipulation de matériel souillé (cathéter, masque à oxygène...) et par les mains sales. Elle est pathogène chez l'immunodéprimé, souvent traité par les antibiotiques, chez lequel elle est parfois inoculée lors de manœuvres dans un but diagnostique ou thérapeutique.

Cette espèce est responsable d'infections diverses : infections suppuratives, urinaires, respiratoires, biliaires, hépatiques intra-abdominales, bactériemies, septicémies, fasciites

nécrosantes.... etc et elle est responsable d'environ 10% des infections nosocomiales. L'arthrite à *K.pneumoniae* est rare mais elle peut détruire l'articulation provoquant un handicap définitif (Chung et al., 1992; Dong., 2003; Podschum et al., 1998).

Classiquement, les *Klebsiellas* ne sont pas considérées comme agents de toxi-infections alimentaires. Toutefois; lors d'une toxi-infection alimentaire, une souche de *Klebsiella pneumoniae* du type capsulaire 15 et capable de produire une exotoxine de type thermolabile (LT) a été isolée de la viande et des selles des malades (Guiraud., 1998).

➤ *Proteus mirabilis* :

Ce sont des saprophytes de l'intestin dans lequel se trouvent normalement qu'en petit nombre. Ces bactéries sont aussi des hôtes normaux des téguments, des voies respiratoires supérieures et des orifices naturels. Ils sont répandus dans la nature : dans le sol, les eaux, notamment les eaux d'égout. Ce sont des pathogènes occasionnels. On les rencontre dans les infections urinaires chroniques, dans les méningites otogènes du nourrisson, parfois dans des septicémies. Leur présence dans les selles est normale : elle est donc sans signification pathologique (Dioman., 2008).

IV-3- *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique ; du grec : puon : pus et kuanos : bleu foncé, elle est désignée sous le nom d'espèce *Pseudomonas aeruginosa* du latin : *aeruginosa* : couvert de rouille, le nom est lié à la pathogénéicité initiale, elle a été isolée en 1882 par Gessard dans le pus d'un pansement (Avril et al., 2000 ; Eyquem A and Montagnier.L., 2000 ; Flandrois.J.P and Carret.G., 1997). D'après la huitième édition de Bregey's Manuel, cette espèce est classée comme suit :

Règne : Bacteria

Division: Proteobacteria

Classe : Gamma Proteobacteria

Ordre : Pseudomonadales

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : Pseudomonas

P.aeruginosa est un petit bacille à Gram négatif fin d'environ 1 à 3 µm de large, se présentant de manière isolé ou groupé en deux ou en courtes chainettes, mobile grâce à une ciliature de type polaire monotriche, asporulé, acapsulé mais certaines souches possèdent une pseudo-capsule appelée « slime » constituée d'alginate qui peut jouer un rôle important dans la pathogénicité de cette bactérie (Liolios., 2009 ; Fraillery., 2001).

C'est une bactérie ubiquiste, saprophyte dans les eaux douces et marines, dans l'air, dans les sols humides ou sur les végétaux. Elle est commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, mais aussi pathogène pour eux. Cette espèce se rencontre dans l'environnement hospitalier au niveau du matériel, médical ou chirurgical, et dans les solutions d'antiseptiques.

Chez l'homme, *P.aeruginosa* est l'agent du pus bleu des infections cutanées post-chirurgicales de septicémies, d'endocardites... ; cette espèce est aussi pathogène opportuniste et elle constitue une cause majeure d'infections nosocomiales diverses chez des personnes fragilisées ou immunodéprimées (grands brûlés, cancéreux...) (Camille., 2007 ; Hélène., 2008).

MATERIEL
ET
METHODES

❖ Objectif de l'étude :

Dans la présente étude, nous avons tenté de contribuer à la valorisation des extraits de deux plantes aromatiques: *Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* de l'est algérien très utilisées en médecine traditionnelle dans les traitements des infections d'origine bactériennes.

Pour cela nous avons fixé les objectifs suivants :

- Isolement des souches d'origine cliniques à partir de différents établissements hospitaliers de la ville d'Annaba.
- Purification et identification biochimique des souches isolées.
- Évaluation de l'antibiorésistance des souches identifiées vis-à-vis une gamme d'antibiotiques.
- Sélection des souches les plus résistantes aux antibiotiques et leur conservation.
- Extraction des huiles essentielles des deux plantes étudiées et détermination de leur rendement.
- Évaluation de l'activité antibactérienne des HE obtenues vis-à-vis des souches pathologiques sélectionnées.
- Détermination de la CMI et CMB des huiles essentielles en milieu solide.
- Évaluation de la synergie entre les deux huiles essentielles et entre chaque huile et un antibiotique.
- Extraction des extraits aqueux et détermination de leur rendement.
- Évaluation de l'activité antibactérienne des EAq obtenus vis-à-vis des souches pathologiques sélectionnées.

Matériel et méthodes

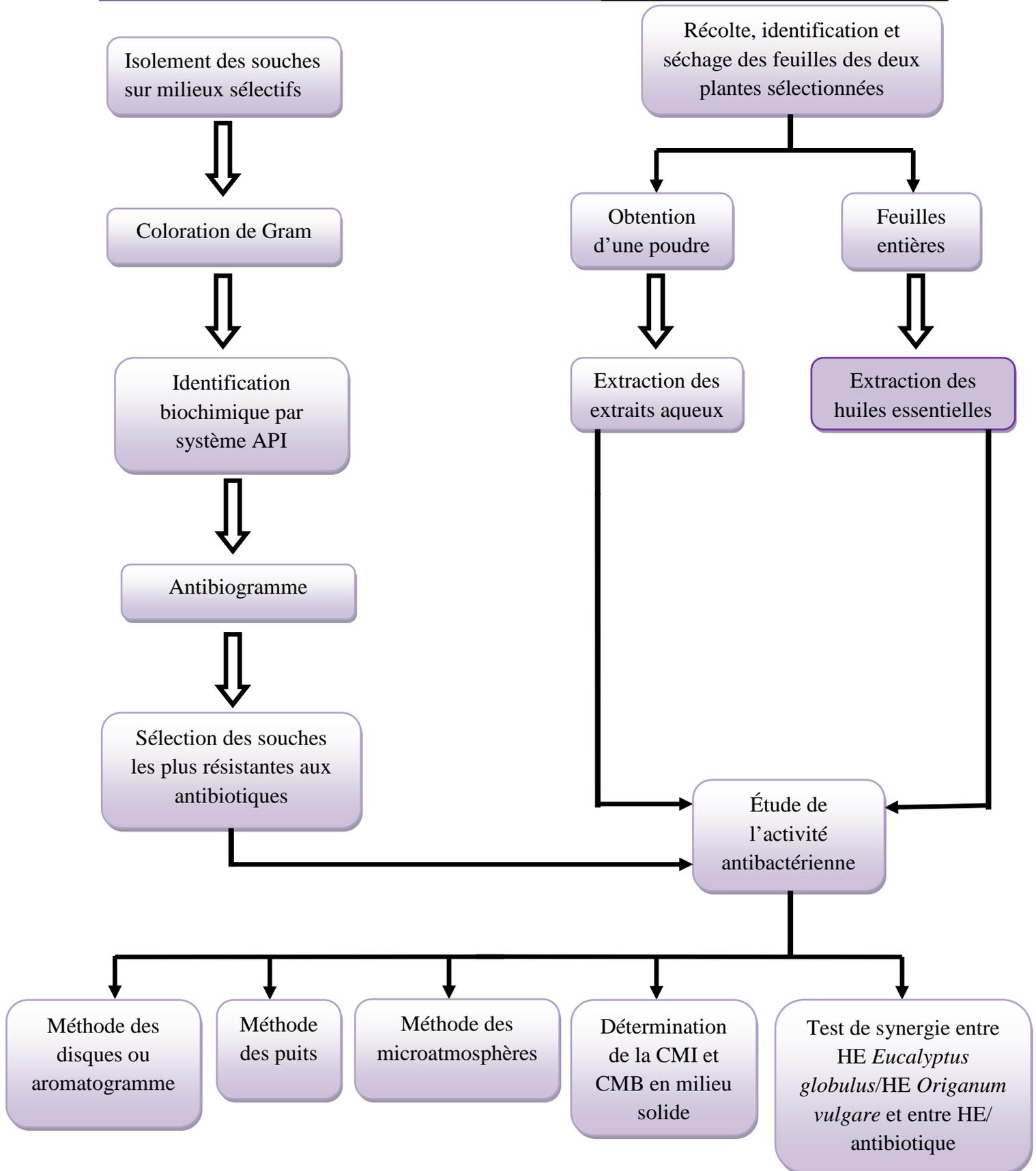


Figure 10 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental.

❖ Matériel :

1- Souches étudiées :

Durant notre travail expérimental, nous avons collecté un total de 102 souches d'origine cliniques à partir de différents établissements hospitaliers de la ville d'Annaba sur une période de 18 mois allant de mars 2013 à janvier 2015.

L'étude bactériologique et l'antibiorésistance des souches ont été effectuées au sein du laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée du département de biochimie de l'Université Badji Mokhtar Annaba.

2- Matériel végétal :

2-1- Critères de choix des plantes :

Dans le but de la valorisation de la biodiversité végétale de l'est algérien, nous avons étudié deux espèces de plantes aromatiques : *Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare*. Le choix de nos deux plantes est basé sur étude bibliographique et une enquête ethnobotanique. Ces deux espèces ont une large utilisation pour leur pouvoir curatif et guérisseur en médecine traditionnelle algérienne. Ainsi, les différents critères de choix de nos deux plantes dans notre étude sont les suivants :

- La valorisation des plantes médicinales de l'est algérien.
- L'abondance des deux espèces dans cette zone.
- L'utilisation en médecine traditionnelle comme remède pour traiter des maladies de provenance bactérienne.
- La richesse et la rentabilité des plantes de point de vue molécules bioactives (huiles essentielles).

2-2- Cueillette, situation géographique et identification botanique :

Les feuilles de la plante *Eucalyptus globulus* sont récoltées au niveau de la région Boumelek El Kala en Mai 2013 pendant la période de floraison, ensuite séchées à l'ombre à une température voisine à 25°C (figure 12 et 13).

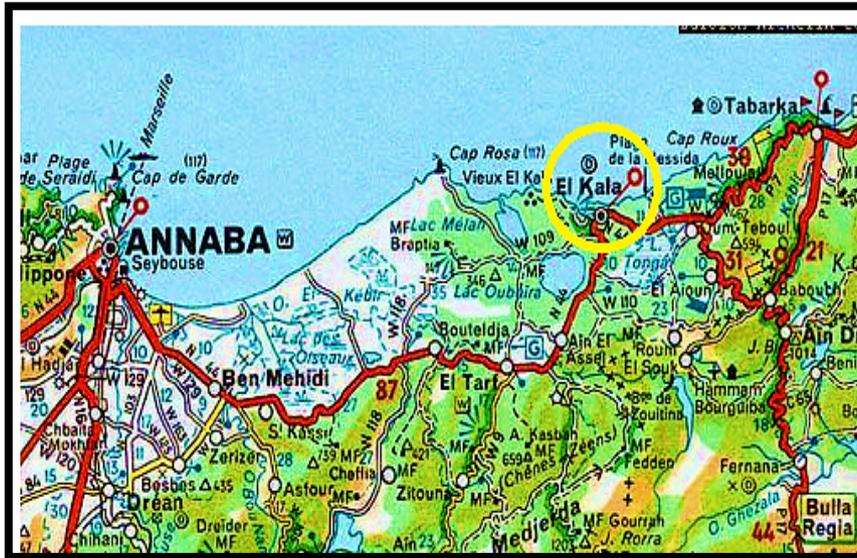


Figure 11 : Région de la récolte de la plante *Eucalyptus globulus*.



Figure 12 : Feuilles sèches d'*Eucalyptus globulus*.

Les feuilles de la plante *Origanum vulgare* sont récoltées au niveau de la montagne Houara, Guelma en juin 2014 à une altitude de 380 mètre pendant la période de floraison, puis elles sont traitées de la même manière que les feuilles de plante précédente (figure 13 et 14).

L'identification botanique des deux espèces végétales a été par Dr. Zaafour, un membre de l'équipe de recherche de botanique de l'université Badji Mokhtar Annaba.



Figure 13 : Région de la récolte de la plante *Origanum vulgare*.



Figure 14 : Feuilles sèches d'*Origanum vulgare*.

❖ Méthodes :

1- Isolement :

Les souches bactériennes nous ont été parvenues dans la gélose nutritive inclinée ; à l'aide d'une anse de platine stérile, Un isolement a été effectué pour chaque souche par la méthode des stries à la surface des milieux de culture suivants :

- ✓ Gélose Chapman
- ✓ Milieu Mac Conkey
- ✓ Gélose au cétrimide

L'incubation a été faite à 37°C pendant 18 à 24 heures.

2- Purification des souches :

Cette étape est basée sur les caractères cultureux et la coloration de Gram. A partir des colonies isolées sur les différents milieux (Chapman, Mac Conkey, cétrimide), procéder directement à la coloration de Gram. Ensuite, sélectionner les colonies présentant des cocci à Gram positif (*Staphylococcus*), et les colonies présentant des bacilles à Gram négatif (les entérobactéries, *Pseudomonas*). La purification se fait en poursuivant le repiquage sur le même type de milieu jusqu'à l'obtention d'un isolat pure présentant les mêmes caractéristiques que celui obtenu en premier isolement. La dernière culture pure doit être faite sur gélose nutritive pour faire l'objet d'autres tests (identification biochimique, antibiogramme, activité antibactérienne...).

3- Identification des souches étudiées :

Suite aux études macroscopiques et microscopiques, toutes les souches ont été identifiées grâce aux tests biochimiques (production d'oxydase pour les Gram négatif et production catalase, coagulase pour les Gram positif) ensuite confirmées par les galeries miniaturisées API (Bio Mérieux) : API 20E, API Staph et API NE.

3-1- Recherche de l'oxydase:

3-1-2- Mode opératoire :

Déposer sur une lame porte objet propre un disque d'oxydase "ox" et l'imbiber avec une goutte d'eau distillée ou d'eau physiologique stérile.

Prélever une partie de la colonie à étudier à partir d'une culture jeune sur gélose à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile et l'étaler sur le disque.

➤ **Lecture:**

Une coloration violet foncé puis noire apparaît immédiatement ou en quelques secondes signifie un test oxydase (+).

L'essai est négatif si la couleur n'a pas viré au violet dans les 10 secondes.

3-2- Recherche de la catalase:

➤ **Principe :**

Cette enzyme est produite en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire qui peuvent détruire les peroxydes H_2O_2 dont l'accumulation a un effet létal pour les bactéries. La catalase a la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 avec dégagement d' O_2).

➤ **Technique:**

A partir d'un milieu solide et aérobie, prélever une quantité suffisante de culture et la mettre en suspension dans une goutte d'eau oxygénée déposée sur une lame.

➤ **Lecture :**

La présence de catalase est marquée par la formation immédiate des bulles d' O_2 (Touaitia., 2016).

3-3- Recherche de la coagulase:

➤ **Principe:**

La propriété de *Staphylococcus aureus* de provoquer la coagulation d'un plasma recueilli sur anticoagulant est un critère important de son identification. Elle est due à la sécrétion d'une enzyme thermostable ; la staphylocoagulase ou coagulase. La staphylocoagulase agit en liaison avec la prothrombine et en absence de calcium.

Parmi les staphylococcus, pratiquement seul *Staphylococcus aureus* la possède, certaines souches de *S. aureus* peuvent en être dépourvues (10 à 15 % en milieu hospitalier), la perte de la coagulase étant souvent reliée à un traitement antibiotique.

Dans l'organisme, l'action de la coagulase est à l'origine de microcaillots de fibrine à l'intérieur desquels les bactéries peuvent proliférer à l'abri des défenses de l'organisme.

La recherche de la coagulase de *Staphylococcus* est compliquée par la présence d'un récepteur au fibrinogène provoquant l'agglutination de la souche placée dans un plasma oxalaté (on parle de coagulase « liée »).

➤ **Technique:**

- Réaliser une culture en bouillon BHIB.
- Etuver 24h à 37°C.
- Mettre dans un tube à hémolyse 4 gouttes de bouillon agité et 4 gouttes de plasma de lapin oxalaté.
- Placer le tube au bain d'eau à 37°C durant 2 à 24h.

➤ **Lecture:**

Observer toutes les heures. Une coagulation pourra être observée par une prise en masse du liquide (Joffin et Leyral., 2001).

3-4- Identification biochimique par système API :

3-4-1- Identification biochimique par la galerie API Staph :

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. L'API staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux API 20E manual., 2010).

3-4-2- Identification biochimique par la galerie API20E :

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries et autres BGN non fastidieux, comportant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données. La galerie est commercialisée dans des boîtes stériles, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, chaque microtube est partagé en deux parties : le tubule (en bas) et la cupule (en haut).

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition des réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux API 20E manual., 2010).

3-4-3- Identification biochimique par la galerie API20NE :

L'API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*...), combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données.

La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (BioMérieux API 20E manual., 2010).

4- Test de sensibilité aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion de disque (Bio-Rad, France) en milieu gélosé Mueller-Hinton (Bio-Rad) selon les recommandations décrites par la CA-SFM 2013 (comité de l'antibiogramme de la société française de Microbiologie).

Les antibiotiques testés pour les différentes souches isolées sont indiqués dans les tableaux 5, 6 et 7 (voir annexe).

➤ **Technique :**

A partir d'une colonie jeune de 24h, mesurer la densité optique de l'inoculum en utilisant spectrophotomètre et ajuster en ajoutant la culture s'il est très faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est très fort, la densité optique doit être équivalente à 10^8 UFC/ml (0,5 Mac Farland).

- Après avoir ajusté la turbidité de l'inoculum, tremper l'écouvillon dans cette suspension.
- Presser fermement contre la paroi intérieure du tube juste au-dessus du niveau du liquide, tourner l'écouvillon pour enlever l'excès du liquide.
- Étaler à trois reprises sur la surface entière de la gélose Mueller Hinton, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application afin d'obtenir une distribution égale de l'inoculum.
- Appliquer les disques d'antibiotiques sur les boîtes de Pétri après 15 minutes d'ensemencement à l'aide d'une pince stérile.
- Incuber les boîtes à 37°C pendant 18 heures à 24h.

➤ **Lecture et interprétation :**

Mesurer avec précision les diamètres de chaque zone d'inhibition en mm, et classer les bactéries dans l'une des catégories: sensible, intermédiaire ou résistante (voir annexe tableau 5, 6 ,7) (CA-SFM., 2013).

5- Détection de *S.aureus* méthicillino-résistant :

Il existe plusieurs méthodes de détection de la résistance à la méthicilline pour l'espèce *Staphylococcus aureus*, parmi lesquelles on a choisis la méthode de diffusion du disque d'oxacilline.

5-1- Méthode de diffusion du disque d'Oxacilline (1ug) :

➤ **Principe :**

Un disque d'Oxacilline (1ug) a été appliqué sur une Gélose MH additionnée 2% de NaCl pour la détection des SARM selon les directives de CLSI (the Clinical Laboratory Standards Institute).

➤ **Lecture :**

Après une incubation à 37°C pendant 24 heures, les souches sont considérées résistantes pour diamètre d'inhibition ≤ 10 mm, intermédiaires pour 11-12 mm et sensibles pour diamètres ≥ 13 mm (Rasheed et al., 2010).

6- Conservation des souches :

La conservation des souches sélectionnées a été réalisée par ensemencement sur gélose nutritive inclinée par l'anse de platine. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes ont été conservés au réfrigérateur à 4°C.

7- Extraction des huiles essentielles :

Les huiles essentielles des deux espèces végétales (*O.vulgare* et *E.globulus*) sont extraites par la méthode d'hydrodistillation par un appareil de type Clevenger, au niveau du laboratoire de pharmacie de la faculté des médecines de l'Université Badji Mokhtar Annaba.

Cet appareil est constitué d'un chauffe ballon qui permet la distribution homogène de la chaleur dans le ballon, où l'on place la matière végétale séchée et l'eau distillée et une colonne de condensation de la vapeur (réfrigérant).

7-1- Principe :

La technique de l'hydrodistillation est basée sur l'immersion d'un matériel végétal dans l'eau portée à l'ébullition. La vapeur saturée en huiles essentielles traverse un serpentin où elle se condense pour donner deux phases :

- **Phase organique** : huileuse et très odorante appelée « huile essentielle » contenant la majorité des composés odorants.
- **Phase aqueuse** : odorante appelée « eaux aromatiques » contenant que très peu des composés odorants (Benkeblia., 2004).

7-2- Mode opératoire :

L'opération consiste à introduire 100 g de masse végétale séchée dans un grand ballon en verre, on y ajoute une quantité suffisante d'eau distillée sans pour autant remplir le ballon pour éviter les débordements de l'ébullition. Le mélange est porté à ébullition à l'aide d'un chauffe ballon. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement où aura lieu la condensation. Les gouttelettes ainsi produites s'accumulent dans le tube rempli auparavant d'eau distillée. L'huile essentielle de faible densité par rapport à l'eau, surnage à la surface de cette dernière. L'huile ainsi obtenue est récupérée dans des flacons opaques bien scellés à température basse (4-5 C°). L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition (figure 15).



Figure 15 : Montage de l'hydrodistillateur employé pour l'extraction des huiles essentielles.

7-3- Calcul du rendement :

Le rendement en huile essentielle est le rapport de la quantité d'huile recueillie après hydrodistillation sur la quantité de la plante à traiter exprimé en pourcentage (AFNOR., 1986).

Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$R = PB / PA \times 100$$

R : rendement de l'huile essentielle en %.

PB: quantité de l'huile essentielle en g.

PA : quantité de la plante en g.

8- Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles

L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles des deux plantes étudiées a été effectuée sur 36 souches bactériennes sélectionnées vue leur multi résistance aux antibiotiques disponibles et quatre souches de référence (*S.aureus* ATTC29233, *E.coli* ATTC29233, *K.pneumoniae* ATCC10031 et *P.aeruginosa* ATTC27853).

8-1- Préparation des suspensions bactériennes :

Les souches bactériennes à tester sont ensemencées dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive, par la suite incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. A partir de ces cultures jeunes, à l'aide d'une anse de platine stérile 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées, ensuite on décharge l'anse de platine dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel NaCl. Après, les suspensions bactériennes sont bien homogénéisées à l'aide d'un vortex, la densité optique est justifiée à 0.5 Mac Farland est réalisée par un spectrophotomètre. L'inoculum obtenu doit avoir une densité optique comprise entre 0.08 à 0.1 nm ce qui est équivalent à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml.

8-2- Préparation des disques :

A l'aide d'un emporte-pièce, des disques de 6mm de diamètre de papier Wattman N°40 sont fabriqués. Ensuite, ces disques sont mis à l'autoclavage dans un tube à essai stérile.

8-3- Tests de l'activité antibactérienne :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles des deux plantes étudiées a été mise en évidence par trois méthodes : la méthode des disques, la méthode des microatmosphères et la méthode des puits. Les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides ont été déterminées par la méthode de dilution agar.

8-3-1- Méthode des disques ou aromatoگرامme :

La méthode de diffusion par disque en milieu gélosé appliquée pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est celle décrite par Gulluce et al en 2007.

➤ Principe :

L'aromatoگرامme est une méthode inspirée de l'antibiogramme qui permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des extraits végétaux (Chapuis., 2007). Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir de la migration de l'huile essentielle ou de l'extrait aqueux par diffusion dans la gélose. Cette méthode permet la mise en évidence de l'effet antibactérien d'un extrait par la mesure du diamètre d'inhibition en millimètres autour d'un disque imprégné par un extrait. En fonction du diamètre d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes (figure 16).

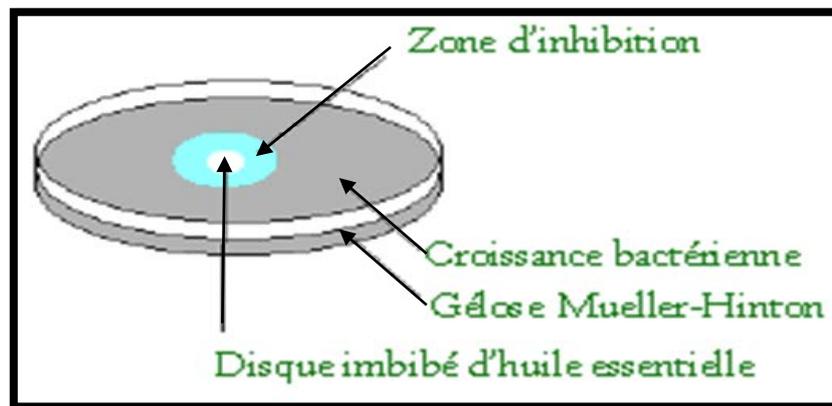


Figure 16 : Principe de la méthode des disques ou aromatoگرامme.

➤ **Mode opératoire :**

▪ **Ensemencement :**

Le milieu Mueller-Hinton en surfusion est coulé dans des boîtes de Pétri en raison de 15ml dans chaque boîte. Après solidification du milieu de culture, un écouvillon stérile imbibé par la suspension bactérienne est étalé sur la totalité de la surface gélosée de haut en bas en stries serrées à trois reprises, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de pivoter l'écouvillon sur lui-même, et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

▪ **Dépôts des disques :**

Dans des conditions aseptiques, trois disques de papier Wattman stériles de 6mm de diamètre sont déposées à la surface gélosée préalablement ensemencée, à l'aide d'une pince stérile. un disque est imbibés d'un volume de 5µl et le second par 10 µl d'huile essentielle des plantes étudiées. Le troisième disque est imprégné par 5 µl de DMSO pour servir comme contrôle négatif.

➤ **Incubation :**

Les boîtes de Pétri sont maintenues à 4°C pendant 1 heure pour que l'HE puisse diffuser, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

➤ Expression des résultats :

La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre d'inhibition formé autour de disque en millimètres où les microorganismes testés n'ont pas poussés en tant que moyenne \pm écart type (Chaque essai est répété en double) (El Hanbali., 2009).

8-3-2- Méthode des microatmosphères :

La méthode des microatmosphères appliquée pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles est celle décrite par Gulluce et al en 2007.

➤ Principe :

Cette méthode consiste à déposer un disque de papier filtre imprégné de l'huile essentielle au centre du couvercle d'une boîte de pétri, sans que l'huile essentielle entre en contact avec la milieuensemencé par les micro-organismes. La boîte est hermétiquement fermée et placée couvercle en bas à l'étuve à 37°C (figure 17).

Il se produit une évaporation des substances volatiles dans l'enceinte de la boîte et les cellules sensibles de l'inoculum sont inhibées, donc l'essence n'agit qu'à l'état des vapeurs qu'elle développe à 37°C. La lecture du test porte donc sur la croissance ou non de l'inoculum

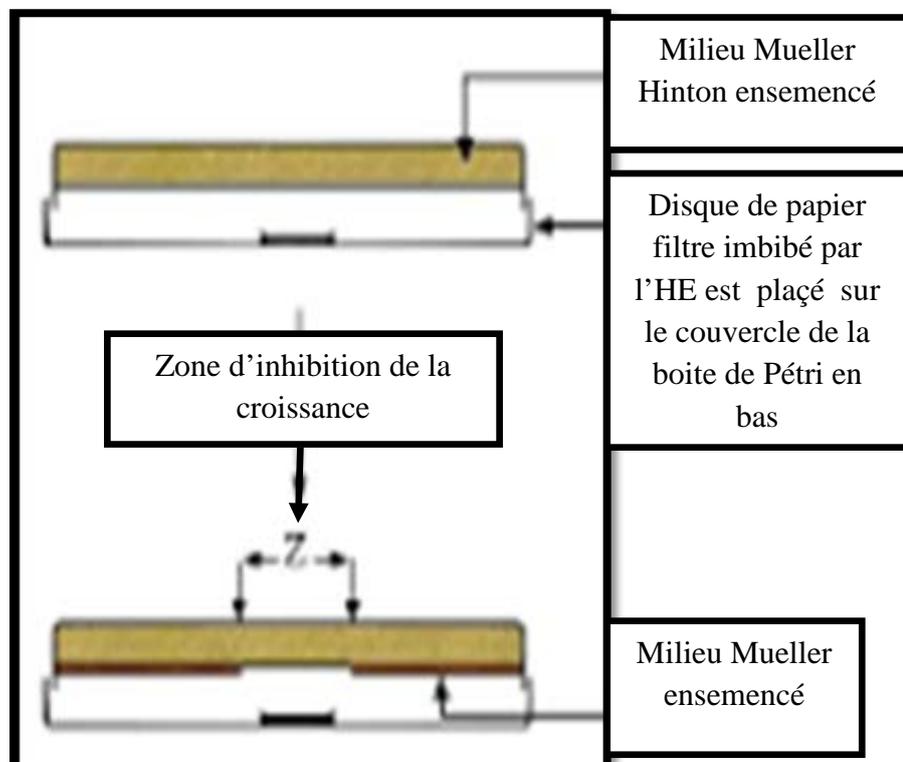


Figure 17 : Principe de la méthode des micro atmosphères.

➤ **Mode opératoire :**

▪ **Ensemencement :**

L'ensemencement des boîtes de Pétri pour cette méthode a été réalisé de la même façon que celle de la méthode des disques ou aromatoگرامme.

▪ **Dépôts des disques :**

Un disque de papier Wattman stérile de 6 mm de diamètre a été placé au centre du couvercle de chaque boîte de Pétri, puis il est imbibés d'un volume (5µl, 10µl) de l'huile essentielle par la suite les boîtes sont hermétiquement fermées par le parafilm.

➤ **Incubation :**

Les boîtes de Pétri sont incubées en position inversée sur le couvercle, à 37 °C pendant 24 heures.

➤ **Expression des résultats :**

Après la période d'incubation, la présence d'une activité se traduit par l'inhibition de la croissance de l'inoculum.

8-3-3- Méthode des puits :

La méthode des puits appliquée pour la détermination de l'activité antibactérienne des huiles essentielles et celle décrite par Gulluce et al., 2007.

➤ **Principe :**

Un puits (d'environ 6mm) est creusé au centre de la gélose dans lequel sera coulée une quantité d'huile essentielle (5µl et 10µl). Après incubation, des zones d'inhibition de croissance bactérienne sont obtenues (pour les huiles actives) et mesurées (figure 18).

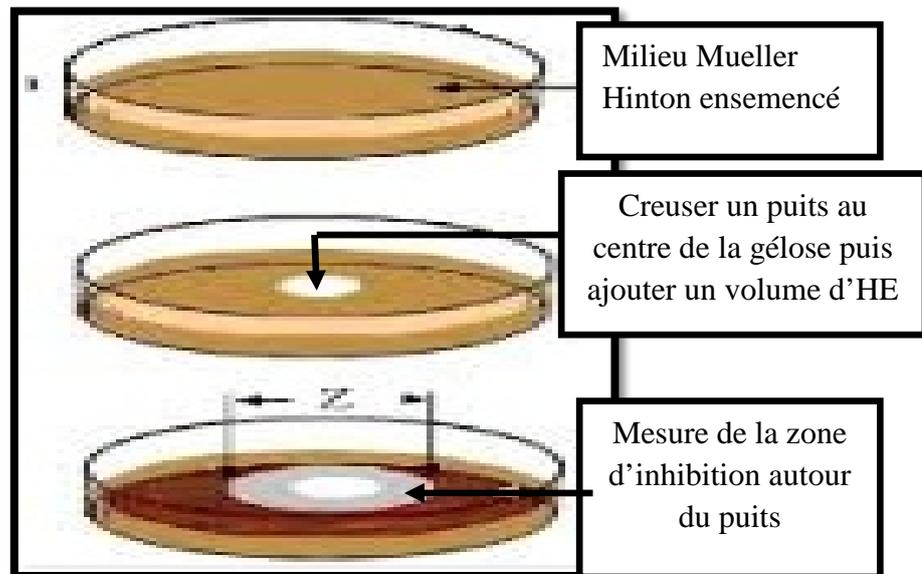


Figure 18 : Principe de la méthode des puits.

➤ **Mode opératoire :**

▪ **Ensemencement :**

L'ensemencement des boîtes de Pétri pour cette méthode a été réalisé de la même façon que celle de la méthode des disques ou aromagramme. Après ensemencement, un puits de 6mm de diamètre est creusé à l'aide d'un cône jaune stérile au centre de la gélose, au niveau duquel est coulée un volume (5 μ l, 10 μ l) de l'huile essentielle.

➤ **Incubation :**

Les boîtes de Pétri sont maintenues à 4°C pendant 1 heure pour que l'extrait puisse diffuser, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures.

➤ **Expression des résultats :**

La lecture des résultats de la méthode des puits se fait par mesure des diamètres d'inhibitions autour du puits en millimètre en tant que moyenne \pm écart type (Chaque essai est répété en double).

La sensibilité à l'huile essentielle dans cette technique a été classée de la même façon que celle de la méthode des disques.

8-3-4-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) :

La CMI et la CMB des huiles essentielles ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu solide ou la méthode de dilution agar décrite par Mayachiew et Devahastin (2008).

Le choix de cette technique est basé sur un point de vue économique de la quantité des huiles essentielles, où plusieurs souches bactériennes sont testées dans la même boîte de Pétri au même temps.

➤ **Principe :**

Le principe de cette technique consiste à l'incorporation d'un agent antibactérien dans un milieu gélosé à des concentrations variables, suivie d'un dépôt d'un inoculum bactérien à la surface de la gélose dans le but de déterminer le taux d'inhibition (El Kalamouni., 2010).

➤ **Mode opératoire :**

▪ **Préparation des dilutions des huiles essentielles :**

A partir d'une solution mère des huiles essentielles à une concentration 100000 µg/ml, on prépare une gamme de dilutions de concentrations allant de 1000 µg/ml à 10000 µg/ml de la manière suivante (figure 19) :

- A l'aide d'une balance analytique, peser 1g de l'huile essentielle.
- Introduire cette quantité dans un tube à essai contenant 10 ml de DMSO pour obtenir une solution mère à concentration égale à 100000 µg/ml.
- Des volumes de 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 ml de la solution mère préparée sont ajoutés respectivement dans des tubes contenant 9, 9.2, 9.4, 9.6, 9.8 et 9.9 ml de DMSO, pour obtenir une gamme de concentrations (10000, 8000, 6000, 4000, 2000, 1000 µg/ml).

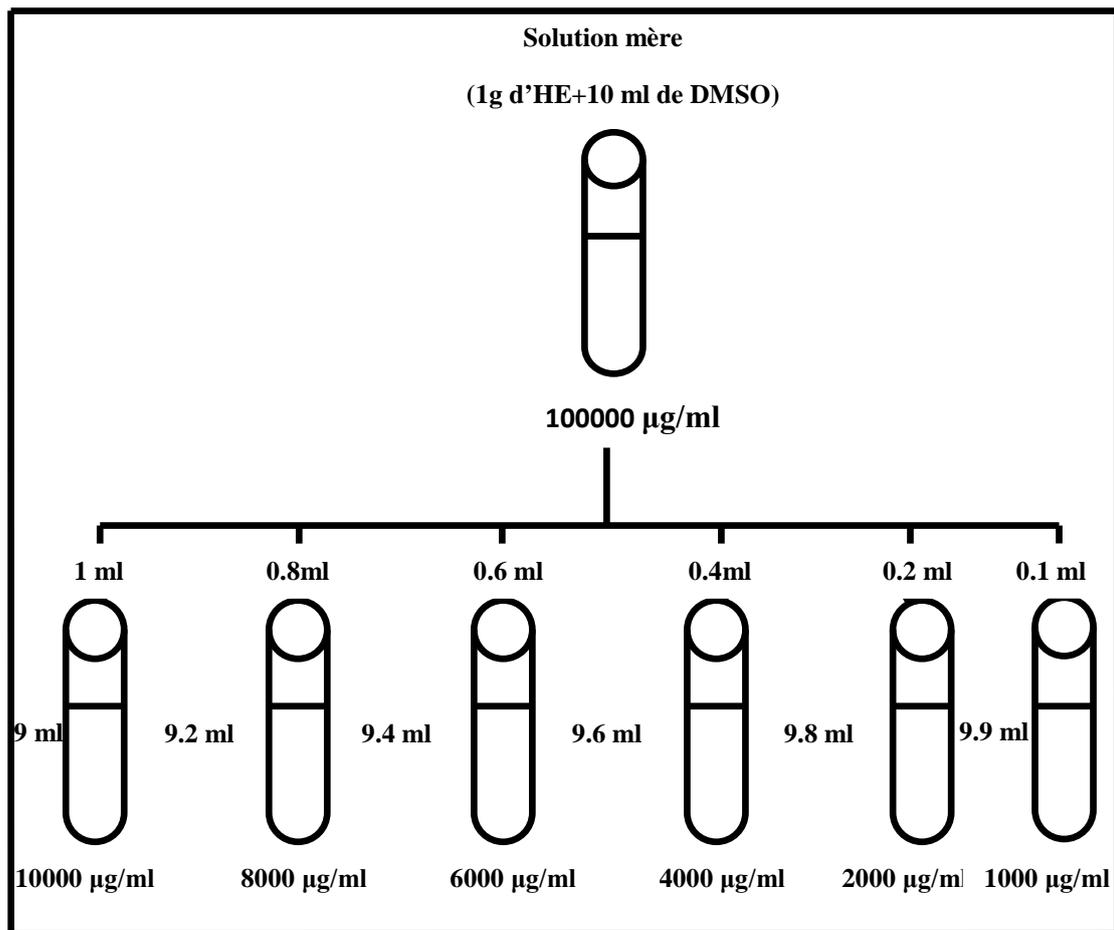


Figure 19: Préparation des dilutions des huiles essentielles.

▪ **Préparation des dilutions d'agar :**

Introduire aseptiquement dans un tube à essai 9 ml de milieu Mueller Hinton fondus et refroidis à 45°C, additionnés de 0.5% de tween 80, en lui rajoutant par la suite 1ml de chaque concentration de l'huile essentielle préalablement préparée, pour obtenir une série de concentrations finales (500, 400, 300, 200, 100, 50 µg/ml) calculées par l'équation suivante :

$$C_F = C_I / 20$$

C_F : est la concentration finale de l'huile essentielle testée dans l'agar

C_I : est la concentration initiale de l'huile essentielle dans le DMSO.

➤ **Dépôts de l'inoculum :**

Les tubes contenant les concentrations finales (dilutions de l'huile essentielle+MH+tween80) sont homogénéisés puis coulés dans des boîtes de Pétri. Après solification du mélange, les

boites sont divisées en six compartiments dans les quelles sont inoculées les cinq suspensions bactériennes, sous de dépôts 1µl correspondant à 10^5 UFC. Dans chaque boite, un contrôle négatif est réalisé par le DMSO (Figure 20).

➤ **Incubation :**

Après inoculation, on incube les boites de Pétri à l'étuve à une température égale à 37°C pendant 24h.

➤ **Expression des résultats :**

A la sortie de l'étuve, les boites de pétri qui montrent une absence de croissance bactérienne ont été maintenues pour déterminer les CMI et les CMB des huiles essentielles des deux plantes étudiées.

La CMI est représentée par la boite qui contient la plus faible concentration d'huile essentielle qui inhibe sur la gélose toute croissance apparente à l'œil nu après 24 heures d'incubation à 37°C.

La CMB est indiquée par la plus faible concentration d'huile essentielle inhibant toute culture visible à l'œil nu après 5 jours incubation à 37°C.

Le calcul du rapport CMB/CMI, permet de déterminer le pouvoir bactéricide ou bactériostatique des deux huiles essentielles testées. Lorsque ce rapport est supérieur à 4, l'huile est qualifié bactériostatique et on dit que l'huile est bactéricide et lorsqu'il est inférieur ou égal à 4 (Canillac et Mourey., 2001).

➤ **Remarque :**

Les préparations des dilutions des huiles essentielles ont été effectuées au niveau du DMSO. Ce choix est basé sur des tests sur des souches bactériennes où le DMSO n'a pas présenté un pouvoir antibactérien. En plus, le DMSO est le solvant le plus utilisé par des auteurs, notamment, Gachkar et al., (2006) et également conseillé par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

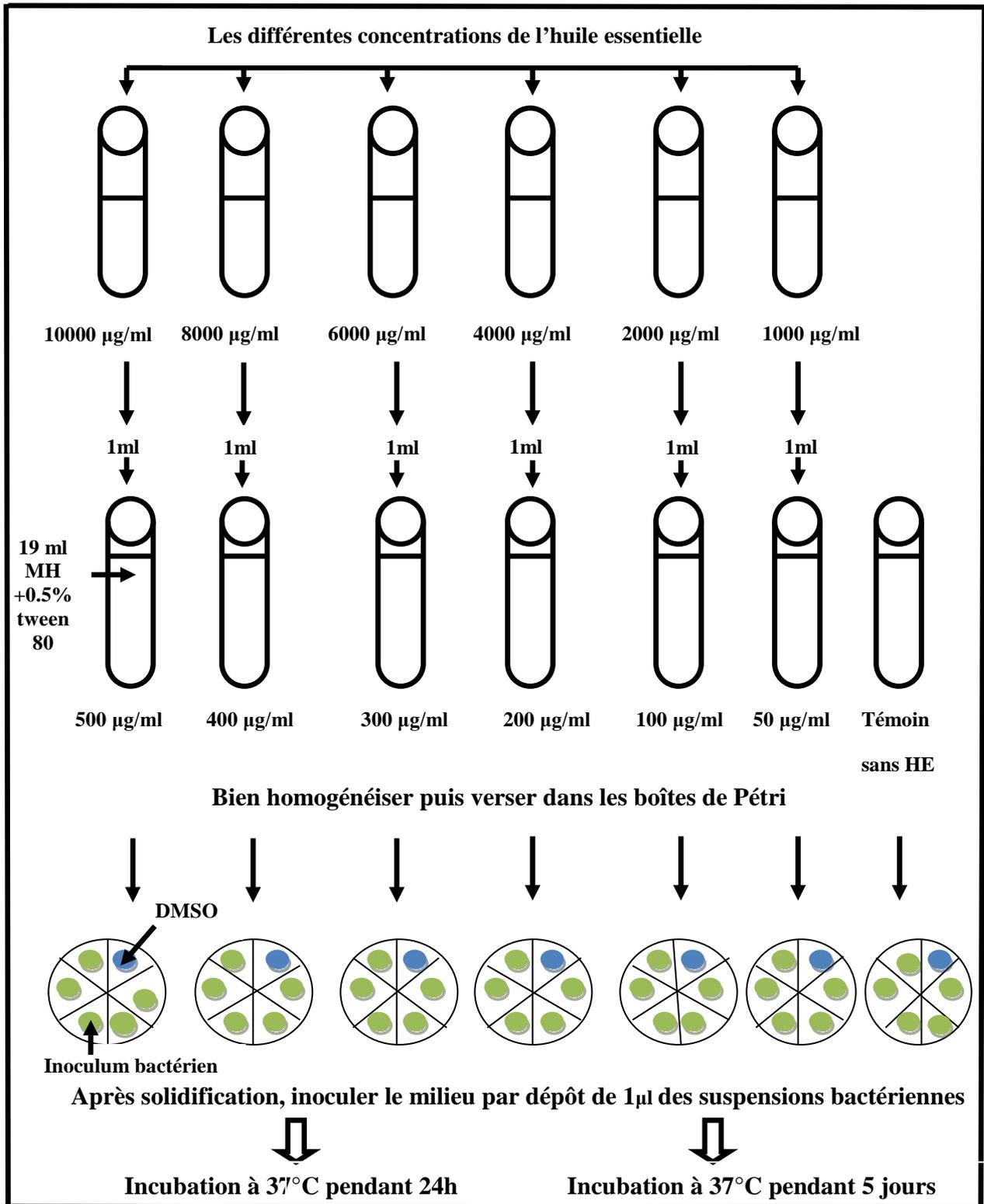


Figure 20 : Détermination de la CMI et la CMB par la méthode des dilutions en milieu solide.

9- Tests de synergie :

On a effectué deux tests de synergie, le premier entre les huiles essentielles des plantes étudiées et le second s'agit d'une combinaison entre les huiles essentielles et un antibiotique.

9-1- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées :

L'évaluation de l'effet synergique entre les deux huiles essentielles des deux plantes (*Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare*) est déterminé par la méthode des disques ou aromatoگرامme décrite précédemment.

➤ Technique :

Pour cela, deux disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre sont déposés aseptiquement à la surface du milieu préalablement ensemencé par la suspension bactérienne, le premier disque est imprégné par 5µl de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus globulus* ou *Origanum vulgare* et le deuxième par combinaison d'un volume de 5µl de chaque huile essentielle (figure 21).

➤ Lecture :

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, Les effets antimicrobiens des associations de ces extraits, comme pour les associations aux antibiotiques, sont définis en réponse aux interactions de manières suivantes:

- **Indifférence:** l'activité d'un extrait n'est pas affectée par l'autre: $(A + B) = \text{effet A ou effet B}$.
- **Addition:** l'effet de l'association des extraits est égal à la somme des effets de chaque extrait étudiée isolément: $(A + B) = \text{effet A} + \text{effet B}$.
- **Synergie:** l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque extraits étudiée isolément: $(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B}$.
- **Antagonisme:** l'association diminue l'activité. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque extrait pris séparément: $(A+B) < \text{effet A ou effet B}$ (Saffidine., 2015).

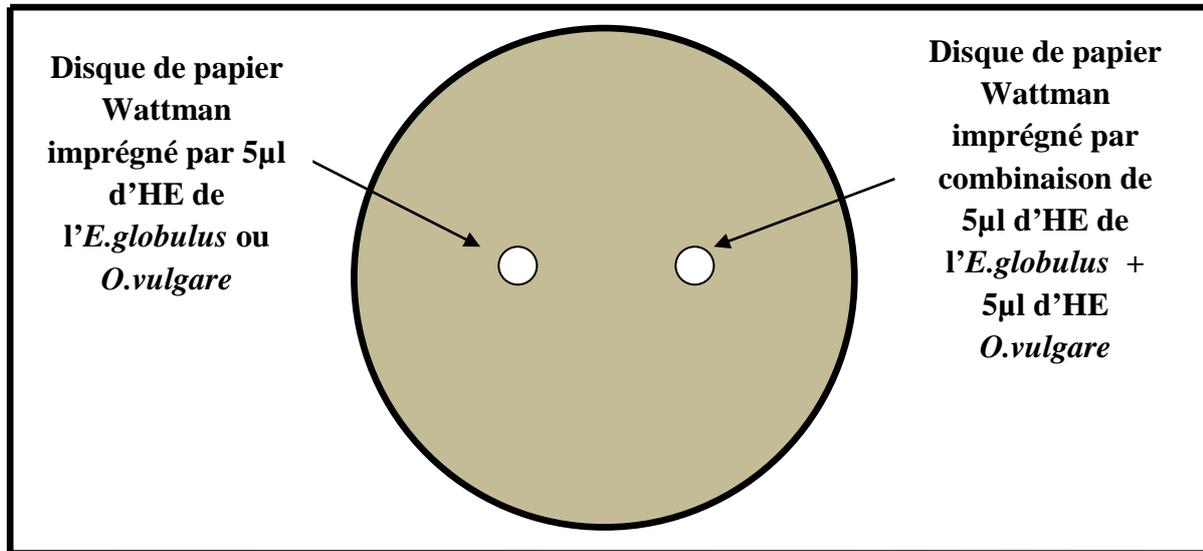


Figure 21: Test de synergie par combinaison des deux huiles essentielles.

9-2- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées et l'oxacilline (1 µg) :

Ces dernières années, les recherches scientifiques s'intéressent à l'utilisation des antibiotiques en combinaison avec des molécules bioactives de plantes médicinales, afin de réduire l'émergence de la résistance bactérienne à ces agents chimiques. Pour cela, nous avons axé ce test sur des souches de *S.aureus* résistantes à la méthicilline qui causent un problème de santé publique.

➤ **Technique :**

On procède de la même manière que la technique d'aromatogramme dans la préparation de l'inoculum et l'ensemencement, puis on dépose sur la surface de la gélose ensemencée deux disques d'oxacilline (1µg) placé côté à côté, un des deux disques d'oxacilline est imbibé de 5µl de l'huile essentielle de l'*E.globulus* /*O.vulgare*. On laisse diffuser pendant une heure de temps, à la température ambiante du laboratoire, ensuite on incube les boîtes à 37°C pendant 24 heures (figure 22).

➤ **Lecture :**

La lecture se fait de la même façon indiqué précédemment dans le test synergie HE/HE.

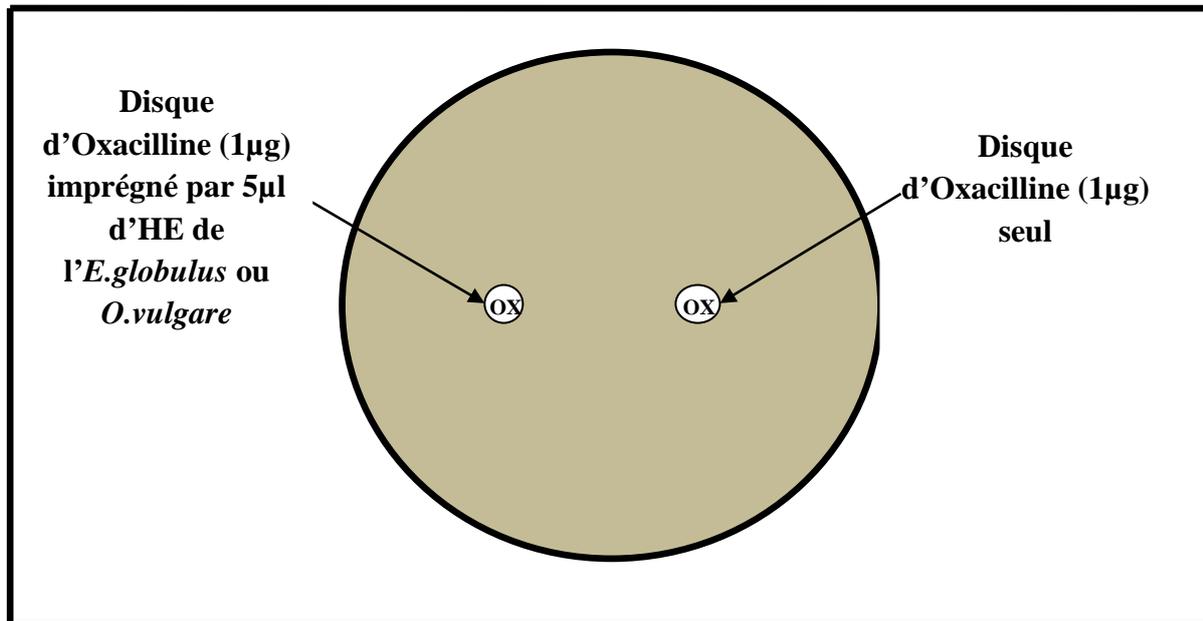


Figure 22 : Test de synergie par combinaison de l'huile essentielle avec Oxacilline (1µg).

10- Extraction des extraits aqueux :

L'extraction des extraits aqueux a été réalisée par l'eau suivant les travaux de Beloued., (1998), Qujeq et al., (2011) et Zemmouri., (2015).

10-1- Mode opératoire :

L'opération consiste à macérer dix grammes (10g) de broyat des feuilles sèches de chaque plantes dans 200ml d'eau distillée bouillante avec agitation occasionnelle pendant une durée de 20 minutes. Les préparations de la décoction sont ensuite filtrés à travers une mousseline suivie d'une filtration avec un papier filtre. Les extraits aqueux obtenus sont conservés à 4 ° C pour des utilisations ultérieures (figure 23).

10-2- Calculs des rendements d'extraction :

Les rendements d'extraction des extraits aqueux de chaque espèce végétale sont calculés selon la formule suivante (Zemmouri., 2015) :

$$R (\%) = 100 M_{\text{ext}}/M_{\text{éch}}$$

R : est le rendement en %;

Mext : est la masse de l'extrait en mg (après l'évaporation du solvant)

Méch : est la masse sèche de la plante en mg.

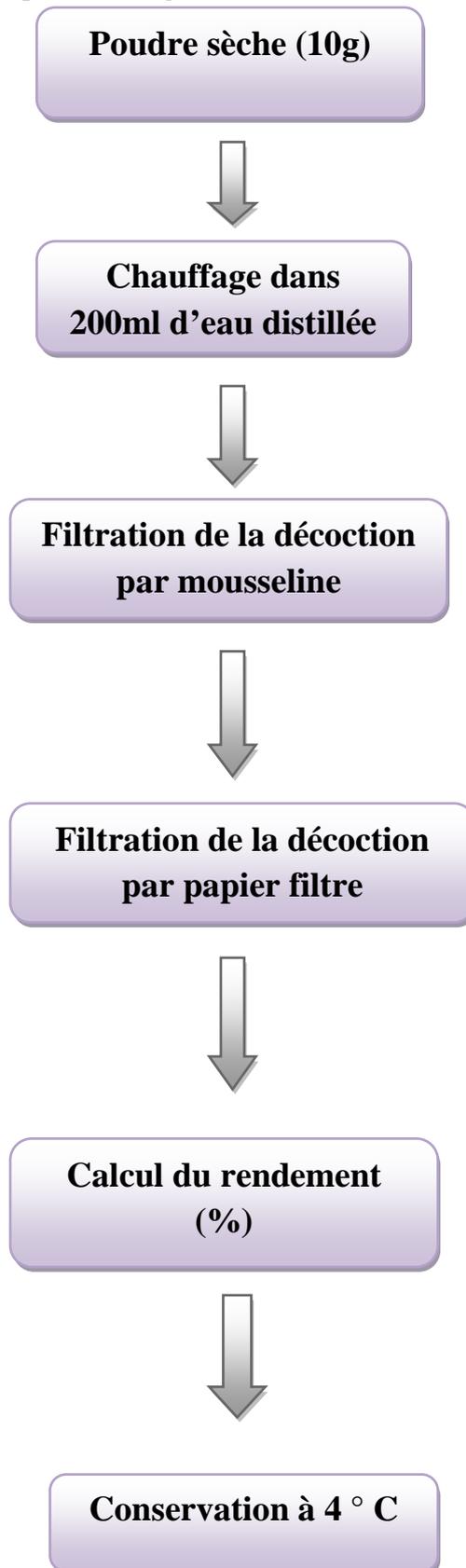


Figure 23 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental d'extraction des extraits aqueux.

11- Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux :

L'activité antibactérienne des extraits aqueux a été évaluée par la méthode des disques ou aromatoگرامme.

➤ **Technique :**

Après ensemencement du milieu, 4 disques de papier Wattman de 6mm de diamètres sont déposés aseptiquement sur la gélose, ensuite chaque disque est imprégné par un volume de l'extrait aqueux des deux plantes étudiées (5 μ l, 10 μ l, 15 μ l et 20 μ l).

➤ **Lecture :**

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, la lecture se fait par mesure du diamètre de la zone inhibition par mm et l'expression des résultats des extraits aqueux se fait de la même que celle des huiles essentielles décrite précédemment.

12- Étude statistique :

Cette étude a été réalisée par calcul de la moyenne et l'écart type à l'aide d'un logiciel statistique Excel version 2007.lnk.

RESULTATS

❖ Résultats :

1- Isolement des souches bactériennes :

Les isolats bactériens ont montré des aspects culturaux variables, en fonction du milieu de culture, permettant de suspecter leur appartenance à un groupe bactérien ou à un autre.

➤ Sur le milieu Chapman :

Les colonies apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune, arrondies à bords régulier de 1 à 2 mm de diamètre

➤ Sur le milieu MacConkey :

- Colonies jaunâtres, lisses, arrondies, et régulier de 1.5 à 3mm de diamètre.
- Colonies jaunâtres, larges, muqueuses, bombées et brillantes de 3 à 4 mm de diamètre.
- Colonies jaunes rondes bombées de 0,1 à 0,5 mm de diamètre.

➤ Sur gélose au cétrimide :

Colonies rondes, lisses, bombées à contour réguliers, de 1 à 2 mm de diamètre avec diffusion d'une coloration verte et dégagement une odeur du jasmin caractéristique de *P. aeruginosa*.

2- Aspect microscopiques :

Après coloration de Gram, l'observation microscopique a montré la présence de cocci à Gram positif en diplocoque en grappes de raisin, ou des bacilles à Gram négatif droits, courts, moyens ou longs, épais ou fins, isolés ou regroupés en paires ou en chaînettes de longueur variable.

Parmi les 102 souches bactériennes collectées, 40 appartiennent au groupe des Gram positif (39%) et 62 au groupe des Gram négatif (61%).

3- Identification des souches :

Parmi les 40 souches appartenant au groupe des cocci à Gram positif, un nombre de 34 souches a été assigné à l'espèce *S.aureus* par la mise en évidence de la coagulase et la catalase qui les diffèrent des Streptocoques.

Le système miniaturisé API Staph a confirmé que ces 34 souches répondent réellement aux profils numériques spécifiques à l'espèce *Staphylococcus aureus*, montrant trois biotypes variables : 6336153 (63%), 6736153 (22%) et 6736053 (15%).

A partir de 62 isolats bactériens à Gram négatif, 45 ont donné une réaction oxydase négative (-), ce qui indique leur appartenance à la famille des entérobactéries et 17 ont été oxydase positive (+) indiquant leur appartenances au genre *Pseudomonas*. Les souches à oxydase négative ont été identifiées par API20 E et les isolats à oxydase positive par API NE (Tableau 8).

Tableau 9: Répartition de 62 souches à Gram négatif.

| Groupes | Espèces | Effectif de l'espèce | Pourcentage de l'espèce (%) |
|------------------------------------|------------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Les entérobactéries (n=45) | <i>E.coli</i> | 19 | 42.22 |
| | <i>Klebseilla pneumoniae</i> | 15 | 33.33 |
| | <i>Klebseilla oxytoca</i> | 01 | 2.22 |
| | <i>Proteus mirabilis</i> | 06 | 13.33 |
| | <i>Proteus vulgaris</i> | 04 | 8.88 |
| Genre <i>Pseudomonas</i> (n=17) | <i>P. aeruginosa</i> | 14 | 82.35 |
| | <i>P.fluorescens</i> | 03 | 17.65 |

4- Répartition des souches isolées :

4-1- Répartition des souches selon le sexe :

Cinquante-trois pourcent (53%) des souches de *S.aureus* ont été isolées du sexe masculin alors que quarante-sept (47%) proviennent du sexe féminin (Figure 24).

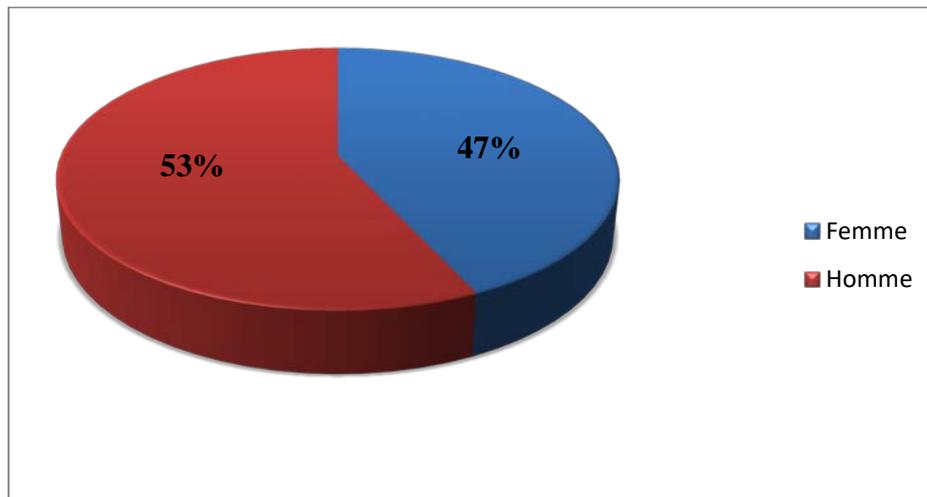


Figure 24 : Répartition des souches de *S.aureus* selon le sexe des patients.

Concernant les entérobactéries, soixante-deux (62%) souches proviennent du sexe féminin et trente-huit (38%) du sexe masculin (Figure 25).

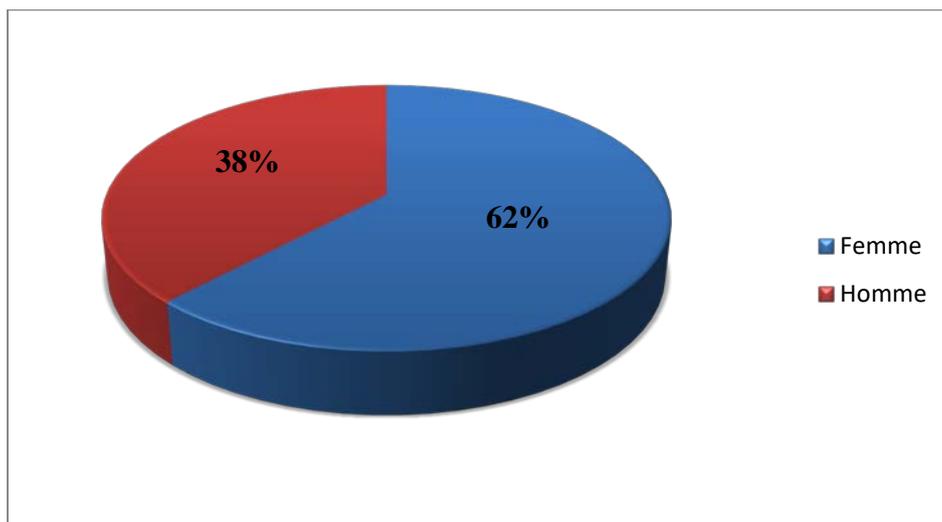


Figure 25 : Répartition des souches des entérobactéries selon le sexe des patients.

Le sexe masculin est le prédominant pour le genre *Pseudomonas* avec un pourcentage égal à 80% (Figure 26).

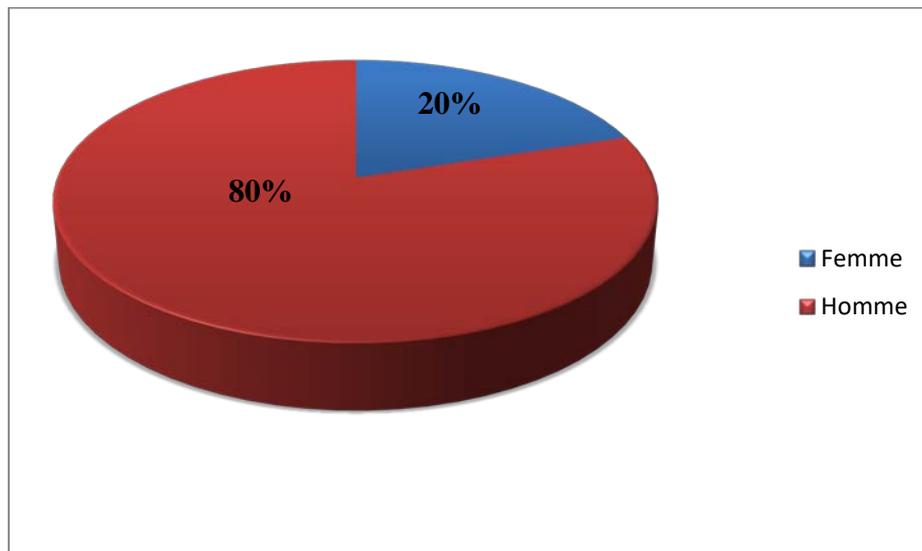


Figure 26 : Répartition des souches du genre *Pseudomonas* selon le sexe des patients.

4-2- Répartition des souches selon l'âge :

Les infections à *S.aureus* ont touché toutes les tranches d'âge avec des extrêmes variant entre 17 ans et 70 ans. Les tranches d'âges les plus touchées dans notre étude sont la population des personnes âgées de plus de 50 ans et les adultes entre 20 ans et 50 ans, avec un pourcentage de 42% (Figure 27).

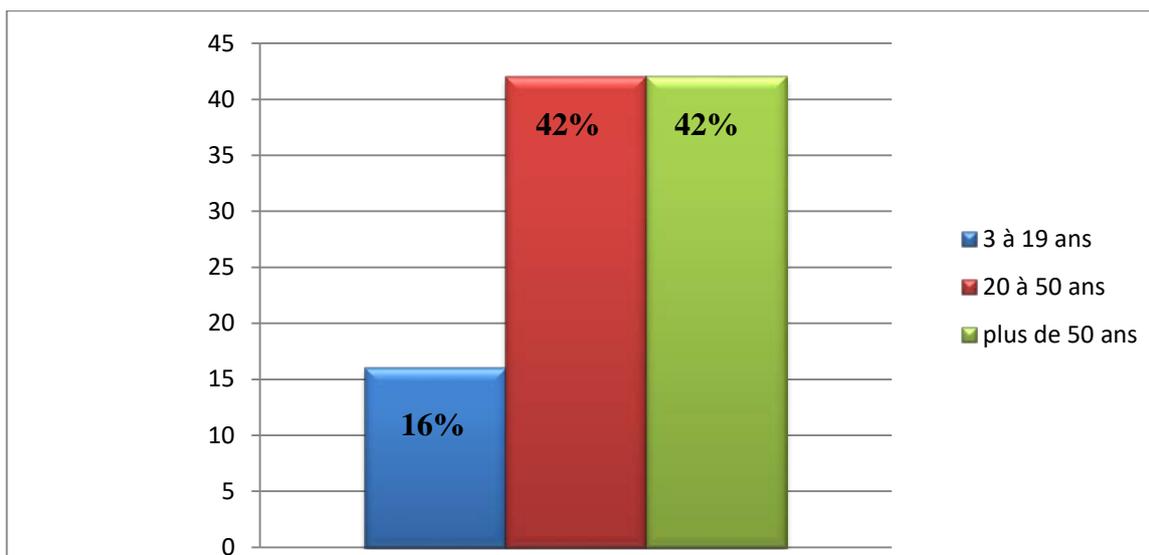


Figure 27 : Répartition des souches de *S.aureus* selon l'âge des patients.

La figure 28 montre que la fréquence la plus élevée des entérobactéries est signalé chez les adultes de 20 à 50 ans (46%), suivi par les sujets âgés (de plus 50 ans) qui est de 38%. Chez les enfants (de 3 à 19 ans) la fréquence est relativement faible par rapport aux deux premières tranches (15%).

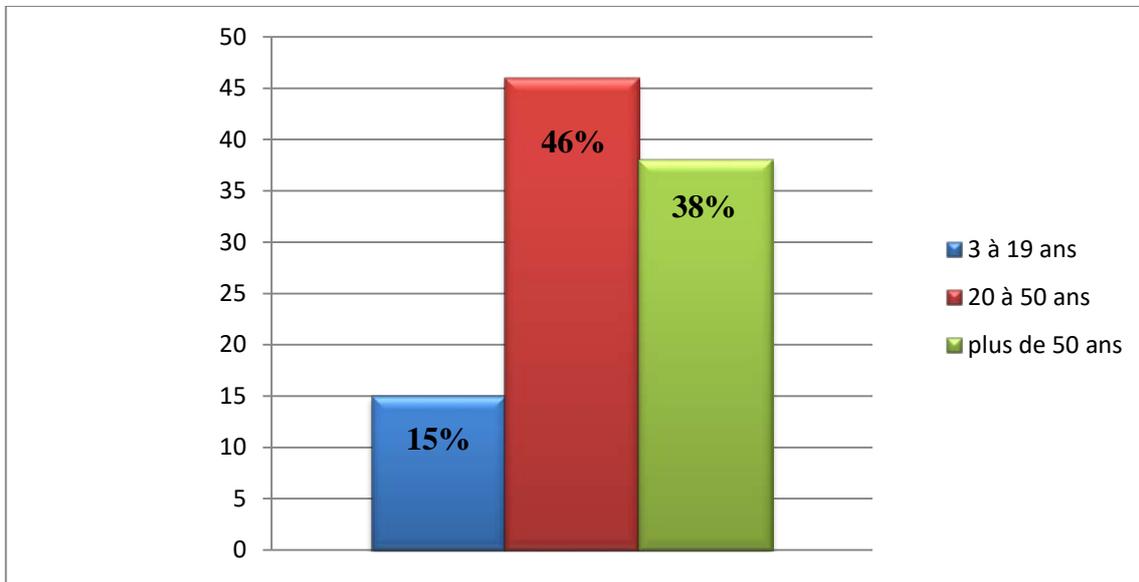


Figure 28 : Répartition des souches des entérobactéries selon l'âge des patients.

La tranche d'âge qui semble la plus touchée par le genre *Pseudomonas* dans notre étude est la population des personnes dont l'âge dépasse 50 ans soit un pourcentage de 80%. (Figure 29).

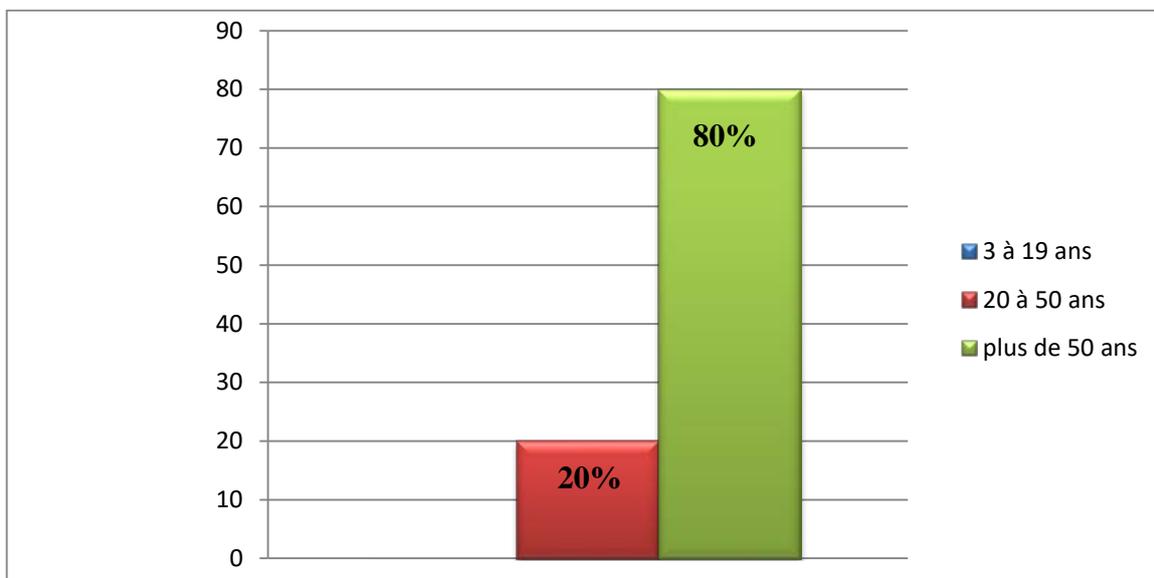


Figure 29 : Répartition des souches de *Pseudomonas* selon l'âge des patients.

4-3- Répartition des souches selon la nature du prélèvement :

Cinquante-trois pourcent (53%) de *S.aureus* ont été isolées de pus, 10 souches (47%) des urines (figure 30).

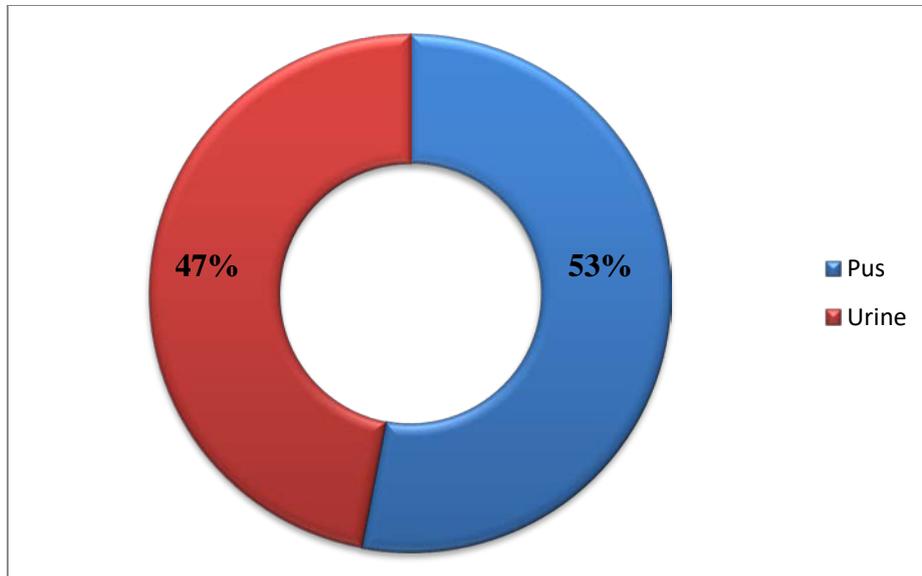


Figure 30 : Répartition des souches de *S.aureus* selon la nature de prélèvement.

Nous avons noté pour les souches des entérobactéries que les urines constituent le prélèvement le plus répandu avec un pourcentage de 76%, suivit par le pus avec 24% (Figure 31).

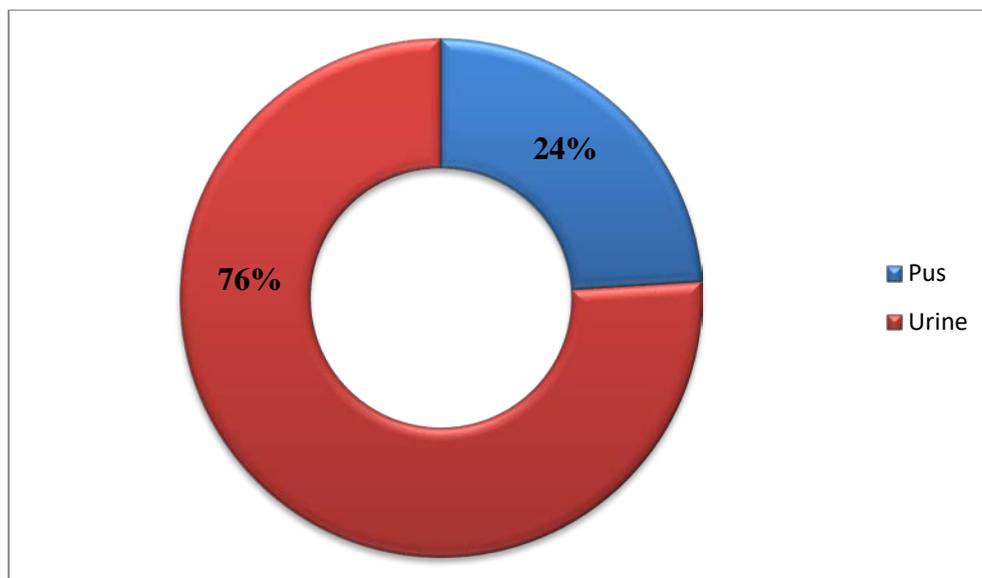


Figure 31 : Répartition des souches des entérobactéries selon la nature de prélèvement.

Dans notre étude, nous avons observé que 80% des souches appartenant au genre *Pseudomonas* ont été isolées à partir de pus et 20% des urines (figure 32).

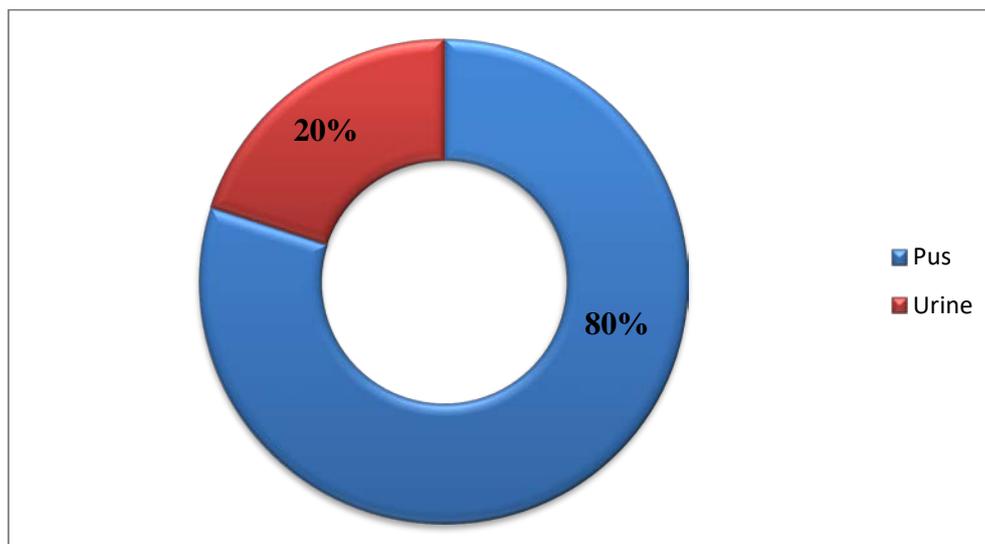


Figure 32 : Répartition des souches de *Pseudomonas* selon la nature de prélèvement.

5- Test de sensibilité aux antibiotiques :

Parmi les 102 souches collectées, 36 souches bactériennes les plus résistantes aux antibiotiques ont été sélectionnées, ces souches appartiennent aux espèces suivantes : 19 *Staphylococcus aureus*, 4 *E.coli*, 4 *K.pneumoniae*, 4 *P.mirabilis*, et 5 *P.aeruginosa*.

La provenance des souches sélectionnées pour l'étude de l'activité antibactérienne selon le sexe, l'âge et la nature des prélèvements est indiquée dans le tableau 8 (voir annexe).

5-1- Résistance des souches de *S.aureus* aux antibiotiques :

Les résultats de l'antibiogramme des 19 souches de *S.aureus* (Figure 33) en utilisant la méthode de diffusion sur milieu gélosé, ont révélé des niveaux de résistances très élevés aux différentes familles d'antibiotique testées, particulièrement aux β -lactamines et aux aminosides.

➤ Les β -lactamines :

Toutes des souches ont été résistantes à la pénicilline, on note aussi des niveaux de résistances très élevés vis-à-vis des autres β -lactamines avec un taux de 76% vis-à-vis de l'oxacilline et 68% vis-à-vis de la céfoxitine.

➤ **Les aminosides :**

Les souches ont montré une résistance très importante pour les aminosides, traduisant un taux de résistance de 89 % pour la kanamycine et la gentamycine suivi par un taux de 73. % pour l'amikacine.

➤ **Les macrolites :**

On note une résistance assez élevée pour les macrolites : 43% vis-à-vis la pristinamycine, 31% vis-à-vis l'érythromycine et un taux de 21% pour la lincomycine.

➤ **Les glycopeptides :**

Trois isolats ont montré une résistance vis-à-vis la vancomycine avec un taux de 15%.

➤ **Les cyclines :**

La résistance à la tétracycline a été remarquée chez 68% des souches.

➤ **Autres antibiotiques :**

La résistance à l'ofloxacine et la fosfomycine était également importante avec un taux égal à 58%.

La rifampicine et le chloramphénicol ont présenté respectivement des pourcentages de résistance de 21% et 26%.

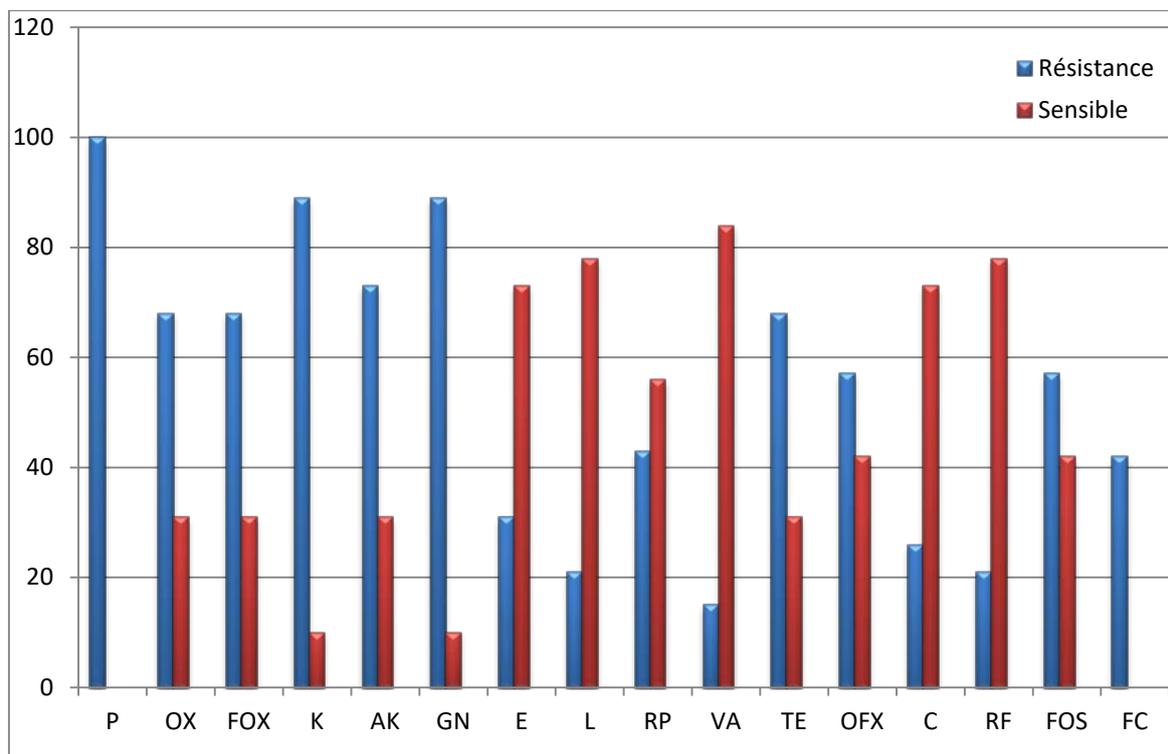


Figure 33: Sensibilité des 19 souches de *S. aureus* aux antibiotiques testés.

5-2- Résistance des souches d'entérobactéries aux antibiotiques :

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques des 12 souches appartenant à la famille des entérobactéries sont illustrés dans l'histogramme (Figure 34).

➤ Les β -lactamines :

Durant cette étude, les entérobactéries ont montré un taux de résistance très élevé vis-à-vis les 7 β -lactamines testées.

- La résistance à l'amoxicilline, l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique et la ticarcilline a été observée chez 100% des souches.
- la céftazidime et la céfoxitine ont présenté respectivement des taux de résistance de 84% et 53%.
- Bien que les souches, ont montré une résistance assez élevée exprimant un taux de 38% pour l'imipénème et la céfotaxime.

➤ Les aminosides :

Concernant les aminosides, on observe une résistance assez marquée pour la gentamicine de 38%, en revanche toutes les souches (100%) étaient sensibles à L'amikacine.

➤ Les quinolones :

En analysant les profils de résistance aux antibiotiques des 12 souches étudiées, on note une résistance de 58% vis-à-vis l'acide nalidixique et un taux de résistance le plus faible a été observé pour la ciprofloxacine (15%).

➤ Les autres antibiotiques :

Pour les autres antibiotiques testés, la fosfomycine s'est montré le plus efficace avec un taux de sensibilité de 100%, suivie du Co-trimoxazole (46%). Concernant la colistine, une activité a été maintenue sur 7% des souches.

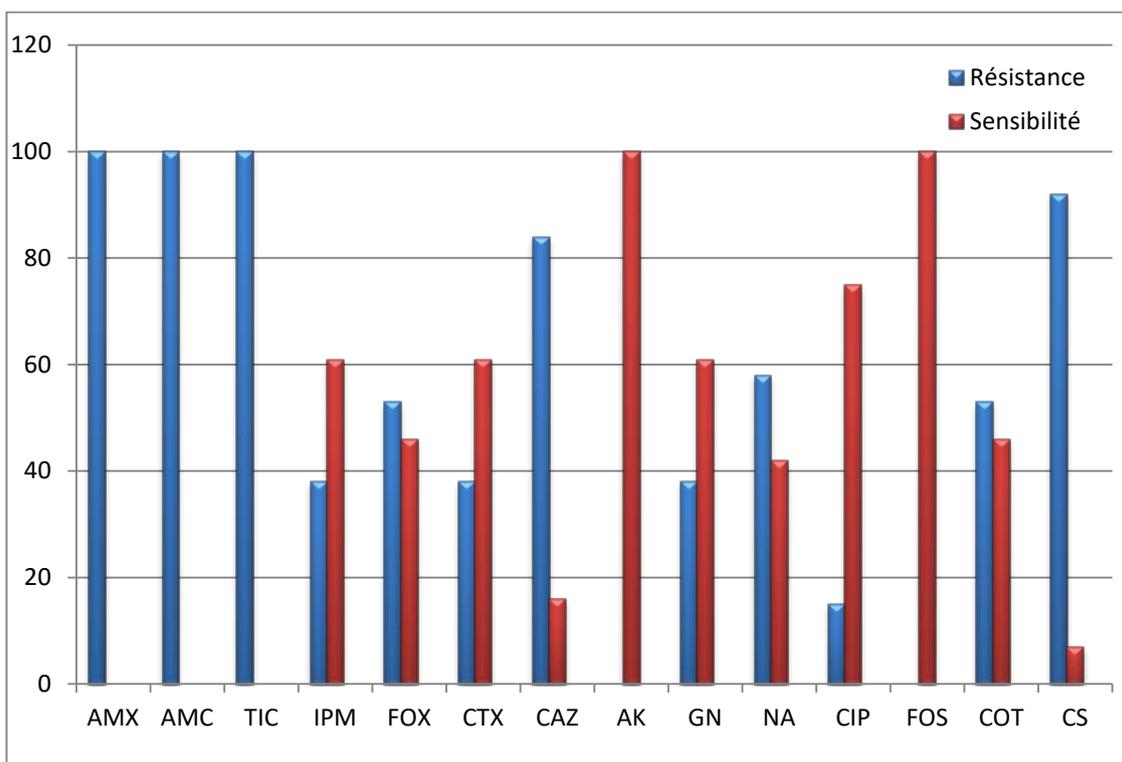


Figure 34: Sensibilité des entérobactéries aux antibiotiques testés.

5-3- Résistance des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques :

Les résultats du test de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* aux 11 antibiotiques choisis sont présentés dans la figure 35.

➤ Les β -lactamines :

La totalité des souches sélectionnées ont montré une résistance à la pipéracilline et la céftazidime.

Un taux de résistance très élevé (80%) a été observé vis-à-vis l'aztréonam et la ticarcilline et un pourcentage de 40% vis-à-vis de l'imipénème.

➤ Les aminosides :

Pour les aminosides, La tobramycine s'est montré le plus efficace avec un taux de sensibilité de 80%, suivie de la gentamicine et l'amikacine (60%).

➤ Les quinolones :

La résistance à la ciprofloxacine a été observée chez 20% des souches testées.

➤ Les autres antibiotiques :

Une résistance assez remarqué vis-à-vis la colistine avec un taux de 20%. En revanche, aucune souche n'a été résistante à la fosfomycine.

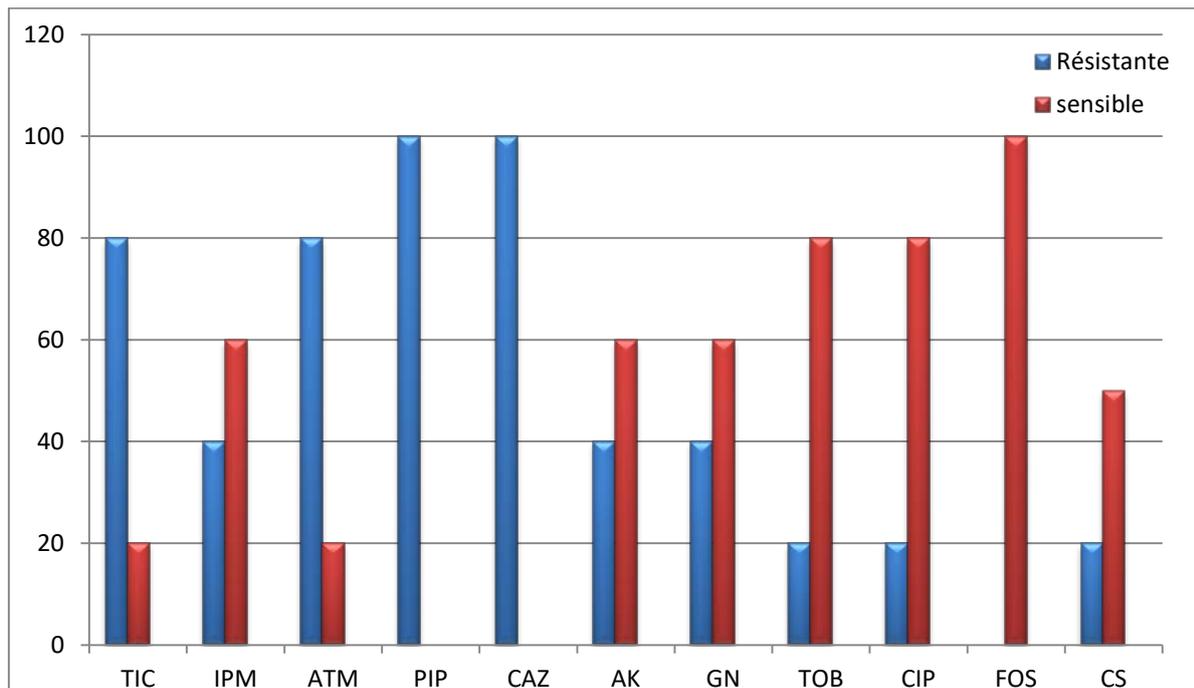


Figure 35: Sensibilité des souches de *P.aeruginosa* aux antibiotiques testés.

6- Détection de *S.aureus* méthicillino-résistant:

La recherche phénotypique des souches SARM par la méthode de diffusion du disque d'oxacilline (1µg) a montré que parmi les 19 souches de *S.aureus* sélectionnées, 08 souches (42%) ont présenté des zones d'inhibitions autour du disque d'oxacilline inférieur à 10 mm, ce qui indique leur résistantes à la méthicilline (figure 36).

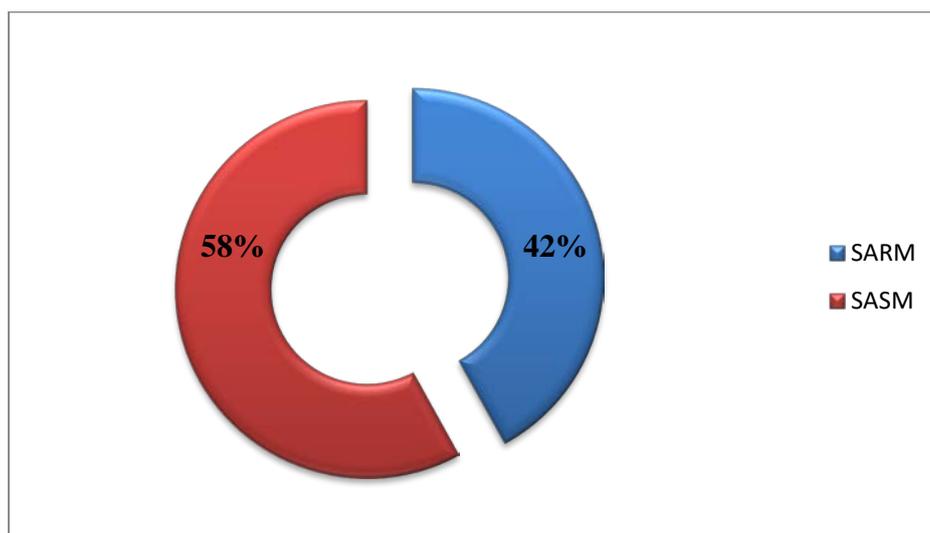


Figure 36: Répartition des 19 souches *S.aureus* sélectionnées selon leur résistance et sensibilité à la méthicilline.

7- Extraction des huiles essentielles :

7-1- Propriétés organoleptiques :

Les feuilles des deux plantes étudiées ont été soumises à une hydrodistillation dans un appareil de type Clenvenger pendant 3 heures. L'huile essentielle d'*Origanum vulgare* obtenue est hautement volatile de couleur jaune, d'une odeur aromatique forte et saveur fortement piquante. Concernant la plante *Eucalyptus globulus*, l'huile essentielle obtenue est de couleur jaune pâle, d'une odeur aromatique forte et saveur piquante (figure 37 et 38).



Figure 37 : Extraction de l'HE d'*O. vulgare*.



Figure 38 : Extraction de l'HE d'*E. globulus*.

7-2- Les rendements d'extraction :

L'hydrodistillation de 100g des feuilles sèches d'*Origanum vulgare* provenant de la montagne Houara de la wilaya de Guelma a donné un rendement en huile essentielle égale à 2.9%, et celle des feuilles d'*Eucalyptus globulus* provenant de la région Boumelek d'El Kala a donné un rendement de 2.25%.

8- Évaluation de l'activité antibactérienne :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles issues des deux plantes aromatiques de l'est algérien, *Eucalyptus globulus* d'El kala et *Origanum vulgare* de Guelma a été effectuée en utilisant trois différentes méthodes : la méthode des disques, la méthode des puits et la méthode des microatmosphères.

8-1- Évaluation de l'activité antibactérienne des HE d'*Eucalyptus globulus* :

8-1-1- La méthode des disques ou aromatoigramme :

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de la plante *Eucalyptus globulus* sur 20 souches appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus* sont regroupés dans le tableau 10. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type de deux mesures.

Suivant le diamètre de la zone d'inhibition exprimé en (mm) autour de chaque disque, la lecture des résultats a été faite comme suit (Elaissi et al., 2011 ; Djabou et al., 2013) :

(-) : résistante pour un diamètre inférieur à 8mm

(+) : sensible pour les diamètres entre 8 et 14mm

(++) : très sensible pour les diamètres entre 14 et 20mm

(+++): extrêmement sensible pour les diamètres égales ou supérieurs à 20mm.

D'après les valeurs enregistrées, l'huile essentielle obtenue à partir des feuilles d'*E.globulus* montre un effet antibactérien considérable contre la majorité des souches de *S.aureus* sensible à la méthicilline ainsi que les SARM. Les diamètres d'inhibitions obtenues varient entre 8.0 ± 0.0 et 12.0 ± 0.0 mm pour le volume de $5\mu\text{l}$ et entre 8.5 ± 0.7 et 16.0 ± 1.4 mm pour $10\mu\text{l}$ d'HE (figure 39).

Tableau 10 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis de 20 souches de *S. aureus* par la méthode des disques.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | | 5 μl | 10 μl | 5 μl | 10 μl |
| <i>S.aureus</i> ATTC29233 | 0.0 \pm 0.0 | 9.5 \pm 0.70 | 12.0 \pm 0.0 | + | + |
| <i>S.aureus</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 10.0 \pm 1.41 | 13.0 \pm 1.4 | + | + |
| <i>S.aureus</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 10.5 \pm 2.12 | 12.5 \pm 0.0 | + | + |
| <i>S.aureus</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 9.0 \pm 0.0 | 14.0 \pm 1.8 | + | ++ |
| <i>S.aureus</i> 4 | 0.0 \pm 0.0 | 9.5 \pm 0.7 | 13.0 \pm 0.0 | + | + |

| | | | | | |
|--------------------|---------|-----------|-----------|---|----|
| <i>S.aureus</i> 5 | 0.0±0.0 | 10.0±0.0 | 16.0±1.4 | + | ++ |
| <i>S.aureus</i> 6 | 0.0±0.0 | 13.5±0.5 | 16.0±1.4 | + | ++ |
| <i>S.aureus</i> 7 | 0.0±0.0 | 8.5±0.7 | 12.0±0.0 | + | + |
| <i>S.aureus</i> 8 | 0.0±0.0 | 9.5±0.0 | 12.0±1.4 | + | + |
| <i>S.aureus</i> 9 | 0.0±0.0 | 10.5±0.7 | 16.0±0.0 | + | ++ |
| <i>S.aureus</i> 10 | 0.0±0.0 | 9.0±0.0 | 14.5±0.7 | + | ++ |
| <i>S.aureus</i> 11 | 0.0±0.0 | 10.0±0.0 | 14.0±0.0 | + | + |
| SARM 45 | 0.0±0.0 | 8.0±0.0 | 10.0±0.0 | - | + |
| SARM 58 | 0.0±0.0 | 10.0±1.41 | 12.5±2.1 | + | + |
| SARM 47 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 9.5±2.1 | - | + |
| SARM 40 | 0.0±0.0 | 0.0±0.0 | 8.5±0.7 | - | + |
| SARM 05 | 0.0±0.0 | 9.0±0.0 | 14.5±0.7 | + | ++ |
| SARM 41 | 0.0±0.0 | 8.0±0.0 | 14.5±0.7 | + | ++ |
| SARM 59 | 0.0±0.0 | 12.0±0.0 | 15.5±0.7 | + | ++ |
| SARM 23 | 0.0±0.0 | 10.0±1.41 | 15.0±1.41 | + | ++ |

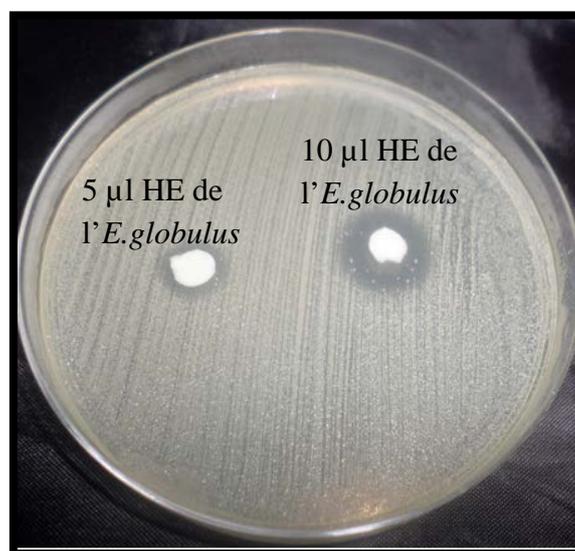


Figure 39 : Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des disques.

Les données des zones d'inhibitions de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sur 14 souches appartenant au groupe des entérobactéries ont été déterminées et regroupées dans le tableau 11. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type de deux mesures.

Les résultats obtenus indiquent que l'huile essentielle de cette plante affiche un grand potentiel antibactérien contre la totalité des entérobactéries testées qui ont montré des zones d'inhibitions allant de 11.0 ± 1.41 et 24.0 ± 1.41 mm pour $5 \mu\text{l}$ d'HE et entre 15.5 ± 0.70 et 34.0 ± 1.41 mm pour $10 \mu\text{l}$ (figure 40).

Tableau 11 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis de 14 souches d'entérobactéries par la méthode des disques.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|----------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | | 5 μl | 10 μl | 5 μl | 10 μl |
| <i>E.coli</i> ATTC29233 | 0.0 \pm 0.0 | 20.0 \pm 1.41 | 31.5 \pm 2.12 | ++ | +++ |
| <i>E.coli</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 11.0 \pm 1.41 | 15.5 \pm 0.70 | + | ++ |
| <i>E.coli</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 13.0 \pm 1.41 | 25.5 \pm 0.70 | + | ++ |
| <i>E.coli</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 16.0 \pm 1.41 | 25.5 \pm 0.70 | ++ | +++ |
| <i>E.coli</i> 4 | 0.0 \pm 0.0 | 24.0 \pm 1.41 | 30.0 \pm 1.41 | +++ | +++ |
| <i>K.pneumoniae</i> ATCC10031 | 0.0 \pm 0.0 | 22.5 \pm 0.70 | 34.0 \pm 1.41 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 15.0 \pm 1.41 | 31.0 \pm 2.82 | ++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 16.0 \pm 1.41 | 21.5 \pm 2.12 | ++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 18.5 \pm 2.12 | 32.5 \pm 0.70 | ++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 4 | 0.0 \pm 0.0 | 18.0 \pm 1.70 | 29.5 \pm 0.70 | ++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 11.0 \pm 1.41 | 18.5 \pm 0.70 | + | ++ |
| <i>P.mirabilis</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 12.5 \pm 0.70 | 19.5 \pm 0.70 | + | ++ |
| <i>P.mirabilis</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 15.0 \pm 1.41 | 19.5 \pm 2.12 | ++ | ++ |
| <i>P.mirabilis</i> 4 | 0.0 \pm 0.0 | 15.0 \pm 1.41 | 20.5 \pm 1.41 | ++ | +++ |



Figure 40: Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis la souche *E.coli* 4 par la méthode des disques.

Les résultats de la sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa* à l'huile essentielle de la plante *E.globulus* par la méthode des disques sont représentés dans le tableau 12. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type de deux mesures.

Selon les valeurs obtenues, trois souches de *P.aeruginosa* c'est montré sensible à l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (10.5 ± 0.70 et 12.0 ± 1.41 mm pour 5 μ l d'HE et entre 11.5 ± 0.7 et 13.0 ± 0.70 mm pour 10 μ l d'HE) (figure 41).

Tableau 12 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis de 06 souches appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode des disques.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|---|------------------------|--------------------------|-----------------|-------------------------|------------|
| | | 5 μ l | 10 μ l | 5 μ l | 10 μ l |
| <i>P.aeruginosa</i> <i>ATTC27853</i> | 0.0 \pm 0.0 | 12.0 \pm 1.41 | 13.0 \pm 0.70 | + | + |
| <i>P.aeruginosa</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 11.0 \pm 0.0 | 12.5 \pm .70 | + | + |
| <i>P.aeruginosa</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | - | - |
| <i>P.aeruginosa</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | - | - |
| <i>P.aeruginosa</i> 4 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | - | - |

| | | | | | |
|-----------------------|---------|-----------|-----------|---|---|
| <i>P.aeruginosa</i> 5 | 0.0±0.0 | 10.5±0.70 | 11.5±0.70 | + | + |
|-----------------------|---------|-----------|-----------|---|---|

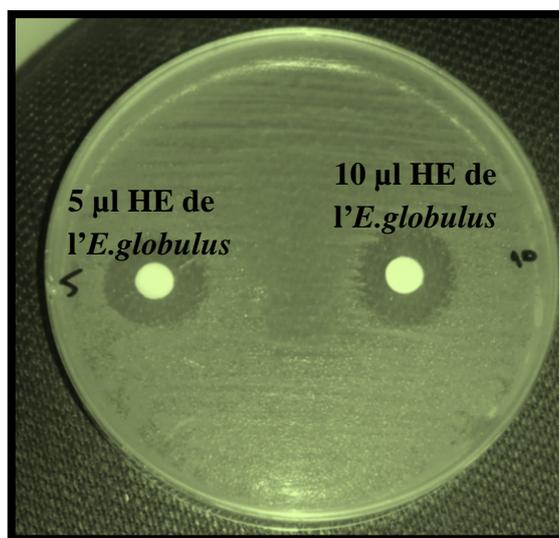


Figure 41 : Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis la souche *P.aeruginosa* ATTC27853 par la méthode des disques.

8-1-2- La méthode des micro-atmosphères :

Pour la méthode des micro-atmosphères, aucune zone d'inhibition n'a été enregistrée vis-à-vis les 40 souches testées.

8-1-3- La méthode des puits :

Toutes les souches testées se sont montrées totalement résistantes à l'huile essentielle de la plante *Eucalyptus globulus* en utilisant la méthode des puits.

8-2- Évaluation de l'activité antibactérienne de L'HE d'*Origanum vulgare*:

L'étude de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* a été évaluée par les trois méthodes précédentes.

8-2-1- La méthode des disques ou aromatoigramme :

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* contre les souches *Staphylococcus aureus* sont regroupés dans le tableau 13. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type. La lecture des résultats se fait de la même façon décrite précédemment.

L'essence des feuilles d'*Origanum vulgare* de la zone de Guelma a montré un potentiel effet antibactérien sur toutes les souches de *S.aureus* testées inclus les 8 souches SARM. Les diamètres d'inhibitions sont compris entre 21.5 ± 0.70 et 53.5 ± 2.12 mm pour $5\mu\text{l}$ d'HE et entre 33.5 ± 3.53 et 82.5 ± 3.53 mm pour $10\mu\text{l}$ d'HE (figure 42).

Tableau 13: Diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 20 souches de *Staphylococcus aureus* par la méthode des disques.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|---------------------------|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | | 5 μl | 10 μl | 5 μl | 10 μl |
| <i>S.aureus</i> ATTC29233 | 0.0 \pm 0.0 | 21.5 \pm 0.70 | 38.0 \pm 1.41 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 52.0 \pm 0.00 | 71.0 \pm 1.70 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 27.0 \pm 1.41 | 40.0 \pm 0.00 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 22.5 \pm 2.12 | 40.0 \pm 0.00 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 4 | 0.0 \pm 0.0 | 29.0 \pm 0.00 | 55.5 \pm 3.53 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 5 | 0.0 \pm 0.0 | 28.0 \pm 1.41 | 39.5 \pm 0.70 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 6 | 0.0 \pm 0.0 | 21.5 \pm 2.12 | 33.5 \pm 3.53 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 7 | 0.0 \pm 0.0 | 30.0 \pm 0.00 | 41.5 \pm 1.41 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 8 | 0.0 \pm 0.0 | 44.0 \pm 0.0 | 70.5 \pm 0.70 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 9 | 0.0 \pm 0.0 | 48.0 \pm 1.41 | 75.0 \pm 0.00 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 10 | 0.0 \pm 0.0 | 41.5 \pm 2.12 | 60.0 \pm 0.00 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 11 | 0.0 \pm 0.0 | 31.5 \pm 2.12 | 66.5 \pm 2.12 | +++ | +++ |
| SARM 45 | 0.0 \pm 0.0 | 51.0 \pm 1.41 | 72.5 \pm 3.53 | +++ | +++ |
| SARM 58 | 0.0 \pm 0.0 | 30.0 \pm 0.0 | 50.5 \pm 0.70 | +++ | +++ |
| SARM 47 | 0.0 \pm 0.0 | 25.5 \pm 0.70 | 46.0 \pm 0.0 | +++ | +++ |
| SARM 40 | 0.0 \pm 0.0 | 26.0 \pm 1.41 | 61.0 \pm 1.41 | +++ | +++ |
| SARM 05 | 0.0 \pm 0.0 | 31.5 \pm 0.70 | 55.0 \pm 0.00 | +++ | +++ |
| SARM 41 | 0.0 \pm 0.0 | 30.0 \pm 0.00 | 70.5 \pm 0.70 | +++ | +++ |
| SARM 59 | 0.0 \pm 0.0 | 53.5 \pm 2.12 | 82.5 \pm 3.53 | +++ | +++ |
| SARM 23 | 0.0 \pm 0.0 | 46.0 \pm 1.41 | 57.0 \pm 2.82 | +++ | +++ |

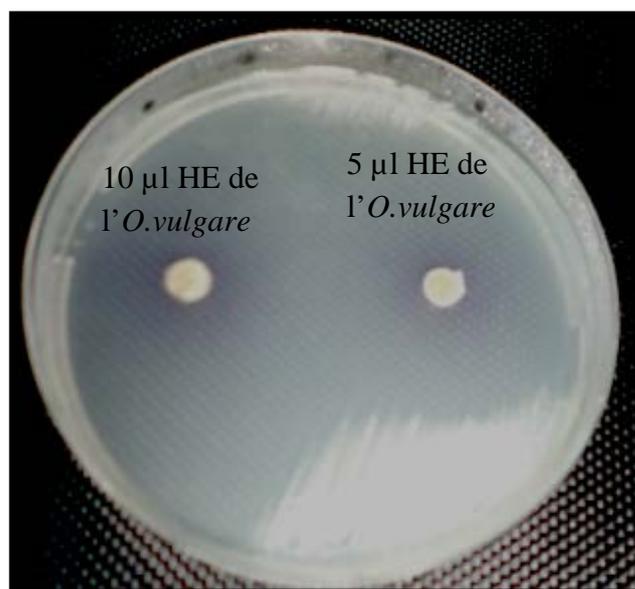


Figure 42: Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des disques.

Les résultats des tests de la sensibilité des souches d'entérobactéries sélectionnées à l'huile essentielle *O.vulgare* par la méthode d'aromatogramme sont indiqués dans le tableau 14. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type de deux mesures.

L'huile essentielle de cette espèce locale exerce une activité antibactérienne puissante sur la totalité des entérobactéries étudiées, avec un intervalle de diamètres d'inhibition qui varie entre de 19.5 ± 2.12 et 49.5 ± 0.70 mm pour $5\mu\text{l}$ d'HE et entre 36.0 ± 1.41 et 72.5 ± 3.53 mm pour $10\mu\text{l}$ d'HE (figure 43).

Tableau 14: Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 14 souches d'entérobactéries par la méthode des disques.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|----------------------------|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | | 5 μl | 10 μl | 5 μl | 10 μl |
| <i>E.coli</i> ATTC29233 | 0.0 \pm 0.0 | 49.5 \pm 0.70 | 80.0 \pm 0.00 | +++ | ++++ |
| <i>E.coli</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 35.0 \pm 1.41 | 69.5 \pm 0.70 | +++ | +++ |
| <i>E.coli</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 35.0 \pm 1.41 | 69.5 \pm 3.53 | +++ | ++ |
| <i>E.coli</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 31.0 \pm 1.41 | 47.0 \pm 2.82 | +++ | +++ |

| | | | | | |
|----------------------------------|---------|-----------|-----------|-----|-----|
| <i>E.coli</i> 4 | 0.0±0.0 | 39.0±1.41 | 71.5±3.53 | +++ | +++ |
| <i>K.pneumoniae</i> ATCC10031 | 0.0±0.0 | 32.0±1.41 | 72.5±3.53 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 1 | 0.0±0.0 | 28.0±1.41 | 50.0±0.00 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 2 | 0.0±0.0 | 22.0±1.41 | 33.5±2.12 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 3 | 0.0±0.0 | 19.5±2.12 | 36.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 4 | 0.0±0.0 | 22.5±2.12 | 36.5±2.12 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 1 | 0.0±0.0 | 38.0±0.70 | 59.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 2 | 0.0±0.0 | 41.0±1.41 | 52.0±0.00 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 3 | 0.0±0.0 | 42.0±1.41 | 60.5±2.12 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 4 | 0.0±0.0 | 40.0±1.41 | 52.0±2.82 | +++ | +++ |



Figure 43 : Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche *E.coli* 03 par la méthode des disques.

Les diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne de l'essence de la plante *O.vulgare* contre les souches de *P.aeruginosa* sont regroupés dans le tableau 15. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type de deux mesures.

D'après les résultats obtenus, l'essence d'*O.vulgare* a enregistré un effet inhibiteur très important contre les six souches de *P.aeruginosa* connues par leur grande résistance aux agents antibactérien, dont les zones inhibitions allant de 20.5±0.70 et 35.5±0.70 mm pour 5µl d'HE et entre 24.5±0.70 et 50.0±1.41 mm pour 10µl d'HE (figure 44).

Tableau15 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 06 souches appartenant à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode des disques.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|---|------------------------|-----------------------------|-----------|----------------------------|------|
| | | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl |
| <i>P.aeruginosa</i> <i>ATTC27853</i> | 0.0±0.0 | 35.5±0.70 | 50.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 1 | 0.0±0.0 | 21.0±1.41 | 30.5±.70 | +++ | +++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 2 | 0.0±0.0 | 21.0±1.41 | 28.5±0.70 | +++ | +++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 3 | 0.0±0.0 | 20.5±0.70 | 24.5±0.70 | + | +++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 4 | 0.0±0.0 | 21.0±1.41 | 31.0±1.41 | ++ | +++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 5 | 0.0±0.0 | 30.0±0.00 | 42.5±3.53 | +++ | +++ |

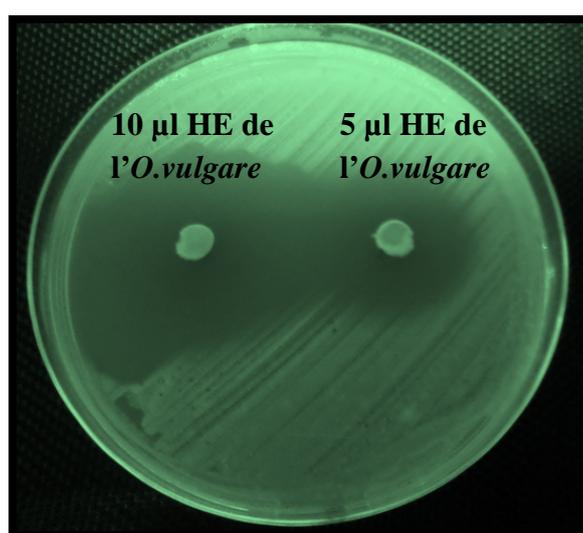


Figure 44 : Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche *P.aeruginosa* 01 par la méthode des disques.

8-2-2- La méthode des microatmosphères :

Les résultats de la sensibilité des souches de *S.aureus* à l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* par la méthode des microatmosphères sont représentés dans le tableau 16. La présence d'une activité antibactérienne se traduit par l'inhibition de la croissance de l'inoculum. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type de deux mesures.

Toutes les souches appartenant à l'espèce *S.aureus* testées ont été inhibées par l'huile essentielle d'*O.vulgare* montrant des zones d'inhibitions très importantes (10.0 ± 0.0 à 28.5 ± 2.12 mm pour $5\mu\text{l}$ d'HE et entre 15.0 ± 1.41 à 38.0 ± 1.41 mm pour $10\mu\text{l}$ d'HE) (figure 45).

Tableau 16 : Diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 20 souches de *S. aureus* par la méthode des microatmosphères.

| Souches | Zones d'inhibitions (mm) | | Inhibition de la croissance de l'inoculum. | |
|------------------------------|-----------------------------|------------------|---|------------------|
| | 5 μl | 10 μl | 5 μl | 10 μl |
| <i>S.aureus</i> ATTC29233 | 16.5 \pm 0.70 | 21.5 \pm 0.70 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 1 | 21.5 \pm 0.70 | 32.0 \pm 2.82 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 2 | 23.0 \pm 1.41 | 30.0 \pm 0.00 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 3 | 22.5 \pm 0.70 | 29.0 \pm 0.70 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 4 | 10.0 \pm 1.41 | 20.0 \pm 0.00 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 5 | 26.0 \pm 1.41 | 35.5 \pm 0.70 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 6 | 21.5 \pm 0.70 | 29.0 \pm 1.41 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 7 | 10.0 \pm 0.00 | 15.0 \pm 1.41 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 8 | 23.5 \pm 2.12 | 38.0 \pm 1.41 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 9 | 19.0 \pm 1.41 | 25.0 \pm 1.41 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 10 | 10.5 \pm 0.70 | 19.0 \pm 1.41 | I | I |
| <i>S.aureus</i> 11 | 14. \pm 1.41 | 19.5 \pm 0.70 | I | I |
| SARM 45 | 21.0 \pm 1.41 | 30.5 \pm 0.70 | I | I |
| SARM 58 | 21.0 \pm 1.41 | 34.5 \pm 0.70 | I | I |
| SARM 47 | 20.5 \pm 0.70 | 36.0 \pm 1.41 | I | I |
| SARM 40 | 21.0 \pm 1.41 | 31.0 \pm 1.41 | I | I |
| SARM 05 | 16.5 \pm 0.70 | 25.0 \pm 0.70 | I | I |
| SARM 41 | 28.0 \pm 1.41 | 35.5 \pm 2.12 | I | I |
| SARM 59 | 28.5 \pm 2.12 | 36.5 \pm 3.53 | I | I |
| SARM 23 | 13.0 \pm 1.41 | 25.5 \pm 0.70 | I | I |

I : Inhibition de la croissance de l'inoculum.

AI : Absence d'inhibition de l'inoculum.

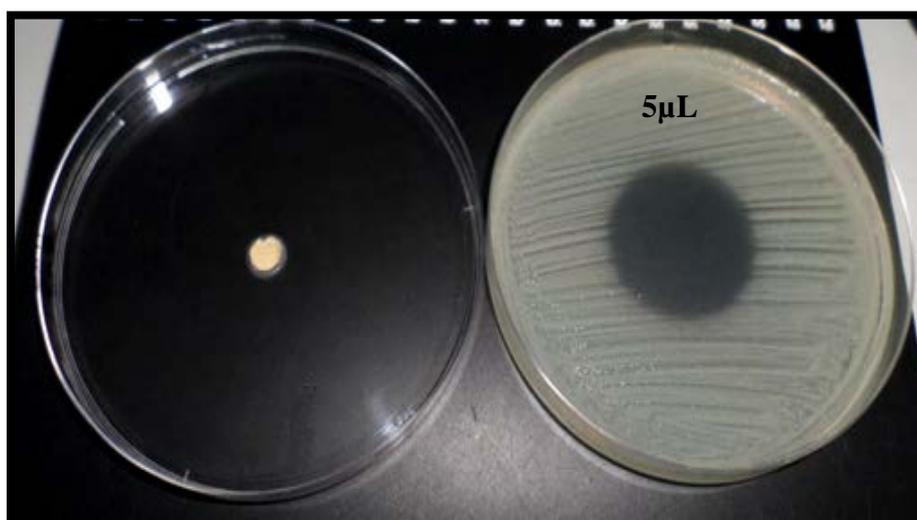


Figure 45: Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des microatmosphères.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle des feuilles de la plante *Origanum vulgare* sur 14 souches appartenant au groupe des entérobactéries sont regroupés dans le tableau 17. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type de deux mesures.

L'huile essentielle de cette espèce exerce un effet inhibiteur considérable sur la majorité des entérobactéries étudiées. Les plus sensibles sont *Klebsella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*, alors que les moins sensibles sont les souches appartenant à l'espèce *Escherichia coli* (figure 46).

Tableau 17: Diamètres des zones d'inhibition de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 14 souche d'entérobactéries par la méthode des microatmosphères.

| Souches | Zones d'inhibitions (mm) | | Inhibition de la croissance de l'inoculum. | |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------|---|------|
| | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl |
| <i>E.coli</i> <i>ATTC29233</i> | 11.5 \pm 2.12 | 21.5 \pm 2.12 | I | I |
| <i>E.coli</i> 1 | 0.0 \pm 0.00 | 9.5 \pm 0.70 | AI | I |
| <i>E.coli</i> 2 | 9.5 \pm .70 | 21.0 \pm 1.41 | I | I |
| <i>E.coli</i> 3 | 0.0 \pm 0.00 | 11.0 \pm 1.41 | AI | I |

| | | | | |
|----------------------------------|-----------|-----------|---|---|
| <i>E.coli</i> 4 | 9.5±0.70 | 17.0±1.41 | I | I |
| <i>K.pneumoniae</i> ATCC10031 | 11.0±1.41 | 21.5±2.12 | I | I |
| <i>K.peumoniae</i> 1 | 10.0±1.41 | 19.0±1.41 | I | I |
| <i>K.peumoniae</i> 2 | 12.0±1.41 | 21.0±1.41 | I | I |
| <i>K.peumoniae</i> 3 | 10.0±1.41 | 17.0±1.41 | I | I |
| <i>K.peumoniae</i> 4 | 11.0±2.12 | 21.5±2.12 | I | I |
| <i>P.mirabilis</i> 1 | 12.0±1.41 | 19.0±1.41 | I | I |
| <i>P.mirabilis</i> 2 | 11.0±1.41 | 19.5±0.70 | I | I |
| <i>P.mirabilis</i> 3 | 10.0±1.41 | 20.5±0.70 | I | I |
| <i>P.mirabilis</i> 4 | 11.5±0.70 | 17.0±1.41 | I | I |

I : Inhibition de la croissance de l'inoculum.

AI : Absence d'inhibition de l'inoculum.



Figure 46: Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche *E.coli* 02 par la méthode des microatmosphères.

Les résultats de l'effet antibactérien de l'essence d'*Origanum vulgare* contre les souches de *P.aeruginosa* par la méthode des microatmosphères sont indiqués dans le tableau 18. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type de deux mesures.

P.aeruginosa semble être l'espèce la plus résistante à l'huile essentielle d'*O.vulgare*, dont l'inhibition de la croissance bactérienne a été remarquée que pour trois souches (figure47).

Tableau 18 : Diamètres des zones d'inhibition de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 6 souches de *P.aeruginosa* par la méthode des microatmosphères.

| Souches | Zones d'inhibitions (mm) | | Inhibition de la croissance de l'inoculum. | |
|---|-----------------------------|-----------|---|------|
| | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl |
| <i>P.aeruginosa</i> <i>ATTC27853</i> | 9.5±0.70 | 13.5±1.41 | I | I |
| <i>P.aeruginosa</i> 1 | 0.0±0.00 | 0.0±0.00 | AI | AI |
| <i>P.aeruginosa</i> 2 | 0.0±0.00 | 0.0±0.00 | AI | AI |
| <i>P.aeruginosa</i> 3 | 0.0±0.00 | 0.0±0.00 | AI | AI |
| <i>P.aeruginosa</i> 4 | 10.5±0.70 | 16.5±0.70 | I | I |
| <i>P.aeruginosa</i> 5 | 11.0±0.00 | 12.5±3.53 | I | I |

I : Inhibition de la croissance de l'inoculum.

AI : Absence d'inhibition de l'inoculum.

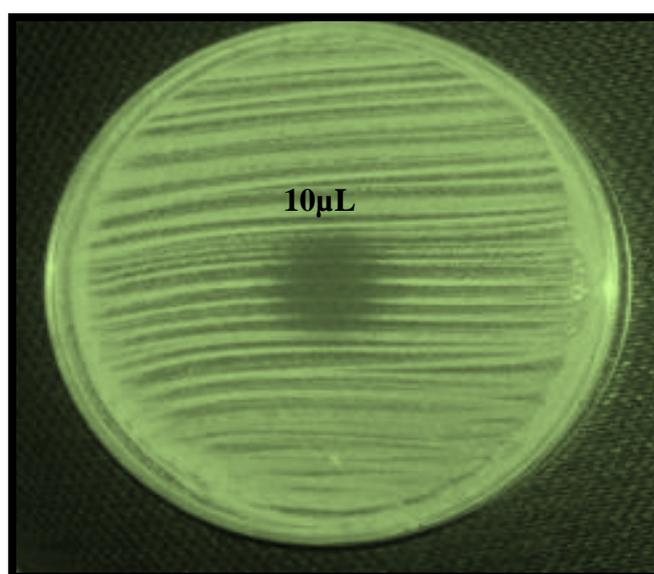


Figure 47: Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche *P.aeruginosa* 05 par la méthode des microatmosphères.

8-2-3- La méthode des puits :

Les diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* contre les vingt souches de *S. aureus* testées par la méthode des puits sont regroupés dans le tableau 19. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne \pm écart type de deux mesures. La lecture des résultats se fait de la même façon décrite précédemment pour la méthode des disques.

Les résultats indiqués dans le tableau montrent un potentiel effet antibactérien de l'HE issue des feuilles d'*O.vulgare* contre 100% de souches de *S.aureus* testées. Les diamètres d'inhibitions obtenues varient de 12.0 ± 1.41 à 59.0 ± 1.41 mm pour $5\mu\text{l}$ d'HE et entre 14.0 ± 1.41 à 63.5 ± 2.12 mm pour $10\mu\text{l}$ d'HE (figure48).

Tableau 19 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 20 souches appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus* par la méthode des puits.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|---------------------------|------------------------|--------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | | 5 μl | 10 μl | 5 μl | 10 μl |
| <i>S.aureus</i> ATTC29233 | 0.0 \pm 0.0 | 24.0 \pm 1.41 | 36.0 \pm 1.41 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 1 | 0.0 \pm 0.0 | 35.0 \pm 1.41 | 54.5 \pm 0.70 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 2 | 0.0 \pm 0.0 | 12.0 \pm 1.41 | 14.0 \pm 1.41 | + | ++ |
| <i>S.aureus</i> 3 | 0.0 \pm 0.0 | 26.5 \pm 2.12 | 53.0 \pm 2.82 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 4 | 0.0 \pm 0.0 | 26.0 \pm 1.41 | 35.0 \pm 0.00 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 5 | 0.0 \pm 0.0 | 24.0 \pm 1.41 | 31.5 \pm 2.12 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 6 | 0.0 \pm 0.0 | 29.0 \pm 1.41 | 37.5 \pm 2.82 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 7 | 0.0 \pm 0.0 | 12.5 \pm 0.70 | 37.0 \pm 1.41 | + | +++ |
| <i>S.aureus</i> 8 | 0.0 \pm 0.0 | 59.0 \pm 1.41 | 60.0 \pm 1.41 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 9 | 0.0 \pm 0.0 | 25.0 \pm 1.41 | 38.0 \pm 2.82 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 10 | 0.0 \pm 0.0 | 34.0 \pm 1.41 | 45.5 \pm 2.12 | +++ | +++ |
| <i>S.aureus</i> 11 | 0.0 \pm 0.0 | 21.0 \pm 1.41 | 26.5 \pm 2.12 | +++ | +++ |
| SARM 45 | 0.0 \pm 0.0 | 19.5 \pm 0.70 | 25.5 \pm 0.70 | ++ | +++ |
| SARM 58 | 0.0 \pm 0.0 | 13.5 \pm 0.70 | 21.0 \pm 1.41 | ++ | +++ |
| SARM 47 | 0.0 \pm 0.0 | 23.5 \pm 0.70 | 29.5 \pm 0.70 | +++ | +++ |

| | | | | | |
|---------|---------|-----------|-----------|-----|-----|
| SARM 40 | 0.0±0.0 | 46.0±1.41 | 63.5±2.12 | +++ | +++ |
| SARM 05 | 0.0±0.0 | 26.0±1.41 | 38.0±2.82 | +++ | +++ |
| SARM 41 | 0.0±0.0 | 49.0±1.41 | 62.5±3.53 | +++ | +++ |
| SARM 59 | 0.0±0.0 | 26.0±0.70 | 33.5±2.12 | +++ | +++ |
| SARM 23 | 0.0±0.0 | 21.0±1.41 | 27.5±2.82 | +++ | +++ |

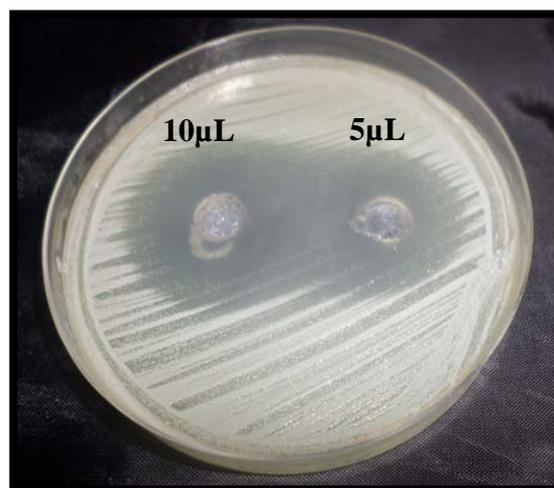


Figure 48: Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche SARM 45 par la méthode des puits.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* contre les souches d'entérobactéries par la méthode des puits sont regroupés dans le tableau 20.

Selon les résultats obtenus, les entérobactéries sont montrées extrêmement sensible à cette essence locale, dont les zones d'inhibitions ont été comprises entre 19.0±1.41 à 36.0±1.41 mm pour 5µl d'HE et entre 24.0±1.41 à 56.0±1.41 mm pour 10µl d'HE (figure 49).

Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle d'*O.vulgare* vis-à-vis de 14 souches appartenant au groupe des entérobactéries par la méthode des puits.

| Souches | DMSO (control négatif) | Zones d'inhibitions (mm) | | Sensibilité bactérienne | |
|----------------------------|------------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|------|
| | | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl |
| <i>E.coli</i> ATTC29233 | 0.0±0.0 | 32.5±2.12 | 41.0±1.41 | +++ | ++++ |

| | | | | | |
|----------------------------------|---------|-----------|-----------|-----|-----|
| <i>E.coli</i> 1 | 0.0±0.0 | 24.0±1.41 | 28.5±2.12 | +++ | +++ |
| <i>E.coli</i> 2 | 0.0±0.0 | 36.0±1.41 | 56.0±1.41 | +++ | ++ |
| <i>E.coli</i> 3 | 0.0±0.0 | 31.0±1.41 | 34.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>E.coli</i> 4 | 0.0±0.0 | 41.0±1.41 | 46.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>K.pneumoniae</i> ATCC10031 | 0.0±0.0 | 19.0±1.41 | 36.0±1.41 | ++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 1 | 0.0±0.0 | 24.0±1.41 | 31.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 2 | 0.0±0.0 | 31.5±2.12 | 43.5±2.12 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 3 | 0.0±0.0 | 25.5±0.70 | 34.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>K.peumoniae</i> 4 | 0.0±0.0 | 21.0±1.41 | 31.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 1 | 0.0±0.0 | 21.0±1.41 | 24.0±1.41 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 2 | 0.0±0.0 | 23.0±1.41 | 29.0±0.00 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 3 | 0.0±0.0 | 31.0±1.41 | 36.5±2.12 | +++ | +++ |
| <i>P.mirabilis</i> 4 | 0.0±0.0 | 29.0±0.00 | 39.0±1.41 | +++ | +++ |



Figure 49: Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche *K.pneumoniae* 2 par la méthode des puits.

Les résultats de l'effet antibactérien de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis-à-vis les 6 souches appartenant à l'espèce *Pseudomona aeruginosa* en utilisant la méthode des puits sont indiqués dans le tableau 21.

La majorité des souches du bacille pyocyanique ont montré une sensibilité importante pour l'HE testée, dont les zones d'inhibitions varient entre 10.5 ± 0.70 à 20.5 ± 0.70 mm pour 5 μ l d'HE et entre 12.0 ± 1.41 à 36.0 ± 1.41 mm pour 10 μ l d'HE (figure 50).

Tableau 21: Diamètres des zones d'inhibitions de l'HE d'*O.vulgare* contre les six souches de *P. aeruginosa* par la méthode des puits.

| Souches | Zones d'inhibitions (mm) | | Inhibition de la croissance de l'inoculum. | |
|---|-----------------------------|-----------------|---|------------|
| | 5 μ l | 10 μ l | 5 μ l | 10 μ l |
| <i>P.aeruginosa</i> <i>ATTC27853</i> | 20.5 ± 0.70 | 36.0 ± 1.41 | +++ | +++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 1 | 13.5 ± 2.12 | 18.5 ± 2.12 | + | ++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 2 | 0.0 ± 0.00 | 0.0 ± 0.00 | - | - |
| <i>P.aeruginosa</i> 3 | 0.0 ± 0.00 | 0.0 ± 0.00 | - | - |
| <i>P.aeruginosa</i> 4 | 19.5 ± 0.70 | 25.0 ± 1.41 | ++ | +++ |
| <i>P.aeruginosa</i> 5 | 10.5 ± 0.70 | 12.0 ± 1.41 | + | + |

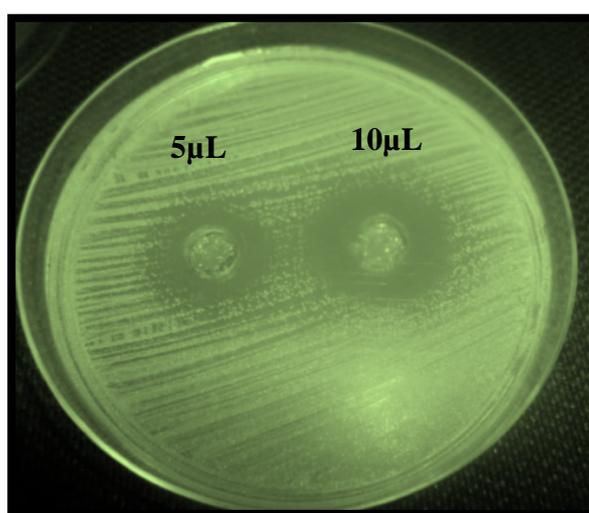


Figure 50 : Exemple de l'effet antibactérien de l'HE d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche *P.aeruginosa* 1 par la méthode des puits.

8-3- Détermination des CMI et CMB des huiles essentielles:

Les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales bactéricides doivent être estimées avant d'utiliser une molécule bioactif comme agent antibactérien, dans le but de définir les frontières de l'acceptabilité sensorielle et l'efficacité antibactérienne des huiles essentielles.

Les CMI et CMB de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* ont été évalué par la méthode de dilution en milieu solide (tableau 22).

D'après les résultats obtenus dans le tableau 22, les valeurs des CMI et CMB des souches de *S.aureus* varient respectivement entre 200 à 500 µg/ml et entre 300 à 500 µg/ml. Concernant les entérobactéries, les valeurs ont été entre 100 à 400 µg/ml pour la CMI et entre 200 à 500 µg/ml pour la CMB.

Notant que les valeurs des CMI et CMB des souches de *P.aeruginosa* sont comprises entre 300 à 400 µg/ml pour la CMI et entre 300 à 500 µg/ml pour la CMB.

Les rapports CMB /CMI indiquent des valeurs inférieurs à 4, ce qui prouve l'effet bactéricide de l'huile essentielle d'*E.globulus* sur toutes les souches bactériennes testées.

Tableau 22 : Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis de 40 souches testées.

| Souches bactériennes | CMI (µg/ml) | CMB (µg/ml) | CMB/CMI |
|---------------------------|-------------|-------------|---------|
| <i>S.aureus</i> ATTC29233 | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>S.aureus</i> 1 | 200 | 500 | 2.50 |
| <i>S.aureus</i> 2 | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>S.aureus</i> 3 | 400 | 400 | 1.00 |
| <i>S.aureus</i> 4 | 400 | 500 | 1.26 |
| <i>S.aureus</i> 5 | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>S.aureus</i> 6 | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>S.aureus</i> 7 | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>S.aureus</i> 8 | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>S.aureus</i> 9 | 300 | 500 | 1.60 |
| <i>S.aureus</i> 10 | 500 | 500 | 1.00 |

| | | | |
|-------------------------------|-----|-----|------|
| <i>S.aureus 11</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>SARM 45</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>SARM 48</i> | 400 | 500 | 1.25 |
| <i>SARM 47</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>SARM 40</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>SARM 05</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>SARM 41</i> | 400 | 500 | 1.25 |
| <i>SARM 59</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>SARM 23</i> | 400 | 500 | 1.25 |
| <i>E.coli ATTC29233</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>E.coli 1</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>E.coli 2</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>E.coli 3</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>E.coli 4</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>K.pneumoniae ATCC10031</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>K.pneumoniae 1</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>K.pneumoniae 2</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>K.pneumoniae 3</i> | 400 | 500 | 1.25 |
| <i>K.pneumoniae 4</i> | 400 | 500 | 1.25 |
| <i>P.mirabilis 1</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>P.mirabilis 2</i> | 300 | 500 | 1.66 |
| <i>P.mirabilis 3</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>P.mirabilis 4</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>P.aeruginosa ATTC27853</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>P.aeruginosa 1</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>P.aeruginosa 2</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>P.aeruginosa 3</i> | 500 | 500 | 1.00 |
| <i>P.aeruginosa 4</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>P.aeruginosa 5</i> | 500 | 500 | 1.00 |

Les résultats des CMI et CMB de l'huile essentielle extraite d'*Origanum vulgare* sont présentées dans le tableau 23.

Les valeurs des CMI de *S.aureus* varient de 100 à 200 µg/ml, alors les CMB allant de 200 à 400 µg/ml. Les entérobactéries ont enregistré des CMI allant de 100 à 300 µg/ml et des CMB entre 200 à 400 µg/ml.

Concernant les six souches de *P.aeruginosa* testées, les valeurs des CMI et CMB ont été respectivement : 200 à 300 µg/ml et 300 à 400 µg/ml

D'après les résultats obtenues, le rapport CMB /CMI de toute les souches est compris entre 1 à 2.5 (inférieur à 4), ce qui confère à l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* un pouvoir bactéricide vis-à-vis des souches testées.

Tableau 23 : Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de l'huile essentielle d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 40 souches testées.

| Souches bactériennes | CMI (µg/ml) | CMB (µg/ml) | CMI/CMB |
|---------------------------|-------------|-------------|---------|
| <i>S.aureus ATTC29233</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>S.aureus 1</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>S.aureus 2</i> | 100 | 300 | 3.00 |
| <i>S.aureus 3</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>S.aureus 4</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>S.aureus 5</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>S.aureus 6</i> | 100 | 300 | 3.00 |
| <i>S.aureus 7</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>S.aureus 8</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>S.aureus 9</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>S.aureus 10</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>S.aureus 11</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>SARM 45</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>SARM 48</i> | 100 | 300 | 3.00 |
| <i>SARM 47</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>SARM 40</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>SARM 05</i> | 200 | 300 | 1.50 |

| | | | |
|-------------------------------|-----|-----|------|
| <i>SARM 41</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>SARM 59</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>SARM 23</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>E.coli ATTC29233</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>E.coli 1</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>E.coli 2</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>E.coli 3</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>E.coli 4</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>K.pneumoniae ATCC10031</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>K.pneumoniae 1</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>K.pneumoniae 2</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>K.pneumoniae 3</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>K.pneumoniae 4</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>P.mirabilis 1</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>P.mirabilis 2</i> | 200 | 400 | 2.00 |
| <i>P.mirabilis 3</i> | 100 | 200 | 2.00 |
| <i>P.mirabilis 4</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>P.aeruginosa ATTC27853</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>P.aeruginosa 1</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>P.aeruginosa 2</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>P.aeruginosa 3</i> | 300 | 400 | 1.33 |
| <i>P.aeruginosa 4</i> | 200 | 300 | 1.50 |
| <i>P.aeruginosa 5</i> | 200 | 300 | 1.50 |

9- Tests de synergie:

9-1- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées :

Une combinaison entre les deux huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* sont testées sur huit souches de SARM pour déterminer une éventuelle synergie.

Les résultats obtenus sont exprimés en mesurant les diamètres des zones d'inhibitions autour des disques, comparés aux diamètres des deux huiles essentielles obtenus isolément (tableau 24).

Les effets antimicrobiens des associations de ces extraits, comme pour les associations aux antibiotiques, sont définis en réponse aux interactions de manières suivantes:

- **Indifférence:** l'activité d'un extrait n'est pas affectée par l'autre: $(A + B) = \text{effet A ou effet B}$.
- **Addition:** l'effet de l'association des extraits est égal à la somme des effets de chaque extrait étudiée isolément: $(A + B) = \text{effet A} + \text{effet B}$.
- **Synergie:** l'effet est significativement supérieur à la somme de chaque extraits étudiée isolément: $(A + B) > \text{effet A} + \text{effet B}$.
- **Antagonisme:** l'association diminue l'activité. Elle est inférieure à la somme des effets de chaque extrait pris séparément: $(A+B) < \text{effet A ou effet B}$ (Saffidine K., 2015).

Des activités antibactériennes significatives sont obtenues en combinant l'huile essentielle d'*E.globulus* et l'huile essentielle d'*O.vulgare*, les zones d'inhibition sont supérieures à celles des fractions testées isolément ce qui confère l'effet synergique de nos huiles essentielle.

Tableau 24: Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de la combinaison des deux HE d'*E.globulus* et *O.vulgare* contre les SARM.

| Souches bactériennes | HE d' <i>E.globulus</i> (5µl) | HE d' <i>O.vulgare</i> (5µl) | Combinaison des HE d' <i>E.globulus</i> et <i>O.vulgare</i> 5µl /5µl |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------|--|
| SARM 45 | 08.0±0.0 | 51.0±1.41 | 60.5±0.70 |
| SARM 48 | 10.0±1.41 | 30.0±0.0 | 42.0±1.41 |
| SARM 47 | 0.0±0.0 | 25.5±0.70 | 31.0±0.0 |
| SARM 40 | 0.0±0.0 | 26.0±1.41 | 34.5±0.70 |
| SARM 05 | 08.0±0.0 | 31.5±0.70 | 41.0±0.0 |
| SARM 41 | 08.0±0.0 | 30.0±0.0 | 42.5±0.70 |
| SARM 59 | 12.0±0.0 | 53.5±0.70 | 66.5±0.70 |
| SARM 23 | 10.0±1.41 | 46.0±1.41 | 59.5±0.70 |

9-2- Synergie entre les huiles essentielles des plantes étudiées et l'oxacilline (1 µg) :

D'après les résultats obtenus dans le tableau 25, un effet synergique relativement élevé a été distingué pour les huit SARM testées en combinant l'oxacilline et l'HE *Eucalyptus globulus*, avec des zones d'inhibitions allant de 18.5±0.70 à 22.5±0.70 mm. Une importante synergie a été constatée par la combinaison de l'oxacilline et l'huile essentielle d'*O. vulgare*, avec des diamètres d'inhibitions compris entre 56.0±1.41 à 87.5±0.70 mm, les zones d'inhibition obtenues dans les deux cas sont supérieures à celles de l'antibiotique testé seul (figure 51).

Tableau 25: Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de la combinaison d'oxacilline avec des deux huiles essentielles étudiés.

| Souches bactériennes | Oxacilline seul (1µg) | Combinaison OX / HE <i>E.globulus</i> (5µl) | Combinaison OX / HE <i>O.vulgare</i> (5µl) |
|----------------------|-----------------------|---|--|
| SARM 45 | 0.00 | 19.5±0.70 | 79.5±0.70 |
| SARM 48 | 0.00 | 21.5±0.70 | 60.5±0.70 |
| SARM 47 | 0.00 | 18.5±0.70 | 56.0±1.41 |
| SARM 40 | 0.00 | 18.5±0.70 | 69.0±1.41 |
| SARM 05 | 0.00 | 21.0±0.0 | 65.0±1.41 |
| SARM 41 | 0.00 | 22.5±0.70 | 76.5±0.70 |
| SARM 59 | 0.00 | 20.5±0.70 | 87.5±0.70 |
| SARM 23 | 0.00 | 28.0±1.41 | 65.0±0.00 |

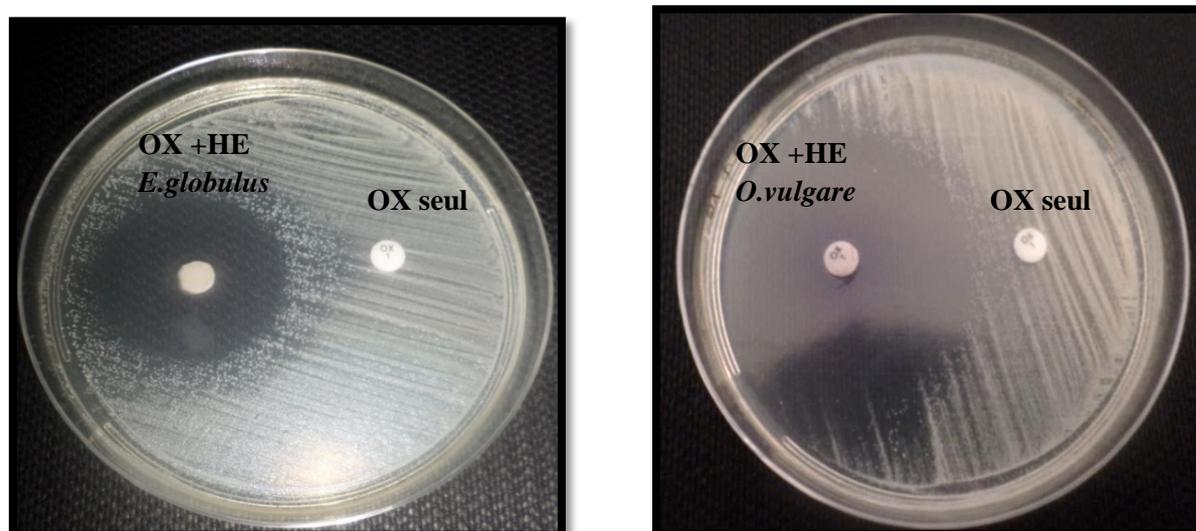


Figure 51 : Exemple de l'effet synergique obtenu par de la combinaison oxacilline /huile essentielle vis-à-vis la souche SARM 23.

10- Extraction des extraits aqueux :

10-1- Rendements d'extraction des extraits aqueux :

Les rendements d'extractions des deux espèces végétales *Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* en utilisant la macération avec l'eau bouillante sont indiqués dans le tableau 26.

Tableau 26 : Rendements d'extraction des extraits aqueux pour les deux plantes étudiées.

| Plantes | Etat de l'extrait | Rendement |
|----------------------------|-------------------------------|-----------|
| <i>Eucalyptus globulus</i> | Liquide marron clair | 50.5±0.70 |
| <i>Origanum vulgare</i> | Liquide visqueux marron foncé | 45.5±3.53 |

Les valeurs des rendements représentent la moyenne de deux mesures.

11- Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux :

L'activité antibactérienne de l'extrait aqueux de la plante d'*Eucalyptus globulus* a été mise en évidence par la méthode de diffusion en disques. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus contre les 40 souches sont regroupés dans le tableau 27. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type de deux mesures. La lecture des résultats se fait de la même façon décrite précédemment pour la méthode des disques.

Selon les valeurs obtenues, des effets antibactériens significatifs et variables ont été obtenus avec l'extrait aqueux des feuilles d'*E.globulus*, aussi bien sur les bactéries à Gram positif que les Gram négatives. L'espèce *Staphylococcus aureus* montré une forte sensibilité à l'EAQ aussi bien élevée que l'huile essentielle de la même plante, avec des diamètres d'inhibition allant de 13.5±0.70 à 25.5±0.70 mm (figure 52).

L'extrait aqueux d'*E.globulus* exerce des activités antibactériennes significatives contre la totalité des entérobactéries testées, dont les zones d'inhibitions obtenues comprennent entre 09.0±0.00 à 23.5±0.70 mm.

D'autre part, toutes les souches appartenant à l'espèce *P.aeruginosa* ont été inhibées par l'extrait aqueux d'*E.globulus* mieux que l'huile essentielle (11.5±0.00 à 16.5±0.70 mm).

De manière générale, l'extrait aqueux d'*E.globulus* montre un effet antibactérien plus élevé que l'huile essentielle issue de la même plante contre *S.aureus* et *P.aeruginosa*, en revanche

une activité moins importante que l'HE contre les entérobactéries. Nous notons aussi plus que le volume de l'extrait augmente l'activité antibactérienne devient plus élevée.

Tableau 27: Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis de 40 souches testées par la méthode des disques.

| Souches bactériennes | 5µl | 10µl | 15µl | 20µl |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| S.aureus ATTC29233 | 17.50±0.70 | 19.00±1.41 | 20.5±0.70 | 22.5±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 1 | 15.50±0.70 | 17.00±0.00 | 19.50±0.70 | 21.5±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 2 | 13.50±0.70 | 15.00±0.00 | 17.50±0.70 | 19.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 3 | 16.00±0.00 | 17.00±0.00 | 19.00±1.41 | 21.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 4 | 14.00±0.00 | 15.50±0.70 | 17.00±0.00 | 19.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 5 | 14.00±1.41 | 19.00±1.41 | 21.50±0.70 | 23.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 6 | 13.00±0.00 | 15.50±0.70 | 17.50±0.70 | 20.5±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 7 | 15.50±0.70 | 19.50±0.70 | 21.50±0.70 | 23.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 8 | 17.00±0.00 | 19.00±0.00 | 20.5±0.70 | 22.50±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 9 | 14.00±0.00 | 16.00±0.00 | 18.50±0.70 | 21.50±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 10 | 25.50±0.70 | 31.50±0.70 | 33.50±0.70 | 36.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 11 | 18.00±0.00 | 20.00±0.00 | 22.50±0.70 | 24.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 45 | 15.00±0.00 | 20.00±0.00 | 21.50±0.70 | 23.00±1.41 |
| <i>SARM</i> 58 | 16.50±0.70 | 20.50±0.70 | 22.50±0.70 | 25.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 47 | 13.50±0.70 | 15.00±0.00 | 17.50±0.70 | 20.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 40 | 16.00±0.00 | 19.50±0.70 | 21.50±0.70 | 23.00±1.41 |
| <i>SARM</i> 05 | 16.00±0.00 | 19.50±0.70 | 22.50±0.70 | 24.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 41 | 15.50±0.70 | 20.00±0.00 | 22.50±0.70 | 25.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 59 | 15.00±0.00 | 17.00±0.00 | 18.50±0.70 | 23.00±1.41 |
| <i>SARM</i> 23 | 16.50±0.70 | 20.00±0.00 | 22.50±0.70 | 25.50±0.70 |
| <i>E.coli</i> ATCC 29233 | 18.50±0.70 | 21.00±1.41 | 22.50±0.70 | 23.50±0.70 |
| <i>E.coli</i> 1 | 14.00±1.41 | 15.00±1.41 | 16.50±0.70 | 18.50±0.70 |
| <i>E.coli</i> 2 | 16.00±1.41 | 20.50±0.70 | 21.50±0.70 | 23.00±1.41 |
| <i>E.coli</i> 3 | 13.50±0.70 | 15.00±1.41 | 17.50±0.70 | 19.50±0.70 |
| <i>E.coli</i> 4 | 15.50±0.70 | 17.00±1.41 | 19.50±0.70 | 22.50±0.70 |
| <i>K.pneumoniae</i> | 13.00±1.41 | 16.00±0.00 | 17.50±0.70 | 19.50±0.70 |

| | | | | |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>ATCC10031</i> | | | | |
| <i>K.pneumoniae 1</i> | 10.00±1.41 | 13.50±0.70 | 15.00±1.41 | 17.00±1.41 |
| <i>K.pneumoniae 2</i> | 09.50±0.70 | 12.50±0.70 | 14.00±1.41 | 16.50±0.70 |
| <i>K.pneumoniae 3</i> | 09.50±0.70 | 11.50±0.70 | 13.50±0.70 | 15.00±1.41 |
| <i>K.pneumoniae 4</i> | 09.00±0.00 | 10.50±0.70 | 13.00±1.41 | 15.00±1.41 |
| <i>P.mirabilis 1</i> | 13.50±0.70 | 14.00±1.41 | 15.50±0.70 | 16.50±0.70 |
| <i>P.mirabilis 2</i> | 12.50±0.70 | 13.50±0.70 | 14.00±1.41 | 15.50±0.70 |
| <i>P.mirabilis 3</i> | 11.50±0.70 | 12.50±0.70 | 14.00±1.41 | 15.00±1.41 |
| <i>P.mirabilis 4</i> | 12.50±0.70 | 14.50±0.70 | 15.50±0.70 | 16.50±0.70 |
| <i>P.aeruginosa ATTC27853</i> | 11.00±0.00 | 12.50±0.70 | 13.50±0.70 | 14.50±0.70 |
| <i>P.aeruginosa 1</i> | 10.00±1.41 | 11.50±0.70 | 13.00±0.00 | 15.50±0.70 |
| <i>P.aeruginosa 2</i> | 09.00±0.00 | 10.00±1.41 | 11.50±0.70 | 13.00±1.41 |
| <i>P.aeruginosa 3</i> | 09.50±1.41 | 10.50±0.70 | 12.50±0.70 | 13.50±0.70 |
| <i>P.aeruginosa 4</i> | 10.50±0.70 | 11.50±0.70 | 12.00±0.00 | 13.50±0.70 |

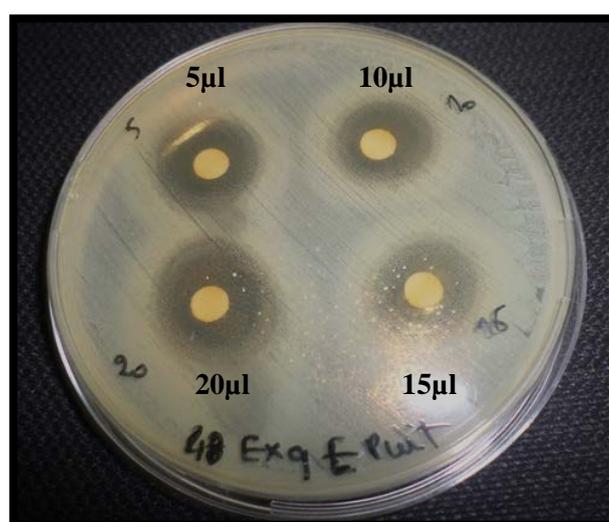


Figure 52: Exemple de l'effet antibactérien de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis la souche SARM 40.

Les diamètres des zones d'inhibitions de l'activité antibactérienne des extraits aqueux d'*Origanum vulgare* contre les 40 souches testées par la méthode des disques sont regroupés dans le tableau 28. Les données ont été exprimées sous forme de moyenne ± écart type de

deux mesures. La lecture des résultats se fait de la même façon décrite précédemment pour la méthode des disques.

L'analyse des données a montré que l'extrait aqueux des feuilles d'*O.vulgare* est moins actif que l'huile essentielle vis-à-vis des bactéries Gram positives aussi bien sur les Gram négatives. En effet, l'extrait aqueux génère une activité considérable contre les souches de *S.aureus* (09.5 ± 0.70 à 22.0 ± 1.41 mm).

Les entérobactéries et *P.aeruginosa* ont montré une sensibilité presque similaire avec des zones d'inhibitions respectivement entre 11.0 ± 1.41 à 19.5 ± 0.70 mm et 10.0 ± 0.00 à 15.5 ± 0.70 mm. Nous remarquons que les zones d'inhibitions deviennent plus importantes avec l'augmentation du volume de l'extrait (figure 53).

Tableau 28 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'extrait aqueux d'*Origanum vulgare* vis-à-vis de 40 souches testées par la méthode des disques.

| Souches bactériennes | 5µl | 10µl | 15µl | 20µl |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| S.aureus ATTC 29233 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 | 17.00±1.41 | 18.5±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 1 | 13.50±0.70 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 | 18.5±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 2 | 11.50±0.70 | 13.50±0.70 | 15.50±0.70 | 17.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 3 | 12.50±0.70 | 14.00±0.00 | 16.50±2.12 | 20.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 4 | 09.50±0.70 | 10.50±0.70 | 12.00±0.00 | 14.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 5 | 14.00±1.41 | 15.50±0.70 | 16.50±0.70 | 19.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 6 | 12.00±0.00 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 | 18.5±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 7 | 12.50±0.70 | 15.50±0.70 | 17.50±0.70 | 21.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 8 | 11.50±0.70 | 13.50±0.70 | 15.50±0.70 | 19.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 9 | 13.00±0.00 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 | 20.50±0.70 |
| <i>S.aureus</i> 10 | 12.50±0.70 | 13.50±0.70 | 15.50±0.70 | 17.00±1.41 |
| <i>S.aureus</i> 11 | 11.00±0.00 | 12.50±1.41 | 14.50±0.70 | 17.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 45 | 10.00±0.00 | 12.50±0.70 | 14.50±0.70 | 17.00±1.41 |
| <i>SARM</i> 58 | 11.50±0.70 | 13.50±0.70 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 47 | 13.50±0.70 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 | 19.50±0.70 |
| <i>SARM</i> 40 | 10.00±0.00 | 11.50±0.70 | 12.50±0.70 | 14.00±1.41 |
| <i>SARM</i> 05 | 11.00±0.00 | 12.50±0.70 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 |

| | | | | |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| <i>SARM 41</i> | 12.50±0.70 | 14.00±0.00 | 15.50±0.70 | 17.50±0.70 |
| <i>SARM 59</i> | 11.50±0.70 | 14.00±0.00 | 15.50±0.70 | 17.00±1.41 |
| <i>SARM 23</i> | 10.50±0.70 | 12.00±0.00 | 13.50±0.70 | 15.50±0.70 |
| <i>E.coli ATCC 29233</i> | 13.50±0.70 | 15.50±0.70 | 16.50±0.70 | 18.50±0.70 |
| <i>E.coli 1</i> | 12.00±1.41 | 14.00±1.41 | 15.50±0.70 | 17.50±0.70 |
| <i>E.coli 2</i> | 11.00±1.41 | 12.50±0.70 | 14.50±0.70 | 16.00±1.41 |
| <i>E.coli 3</i> | 12.50±0.70 | 14.00±1.41 | 16.50±0.70 | 17.50±0.70 |
| <i>E.coli 4</i> | 11.50±0.70 | 13.00±1.41 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 |
| <i>K.pneumoniae ATCC10031</i> | 12.00±1.41 | 13.00±0.00 | 15.50±0.70 | 18.50±0.70 |
| <i>K.pneumoniae 1</i> | 11.00±1.41 | 13.50±0.70 | 15.00±1.41 | 18.00±1.41 |
| <i>K.pneumoniae 2</i> | 11.50±0.70 | 13.50±0.70 | 14.00±1.41 | 16.50±0.70 |
| <i>K.pneumoniae 3</i> | 11.50±0.70 | 14.50±0.70 | 15.50±0.70 | 17.00±1.41 |
| <i>K.pneumoniae 4</i> | 13.00±0.00 | 14.50±0.70 | 16.00±1.41 | 18.00±1.41 |
| <i>P.mirabilis 1</i> | 14.50±0.70 | 16.00±1.41 | 17.50±0.70 | 19.50±0.70 |
| <i>P.mirabilis 2</i> | 11.50±0.70 | 13.50±0.70 | 14.50±0.70 | 16.50±0.70 |
| <i>P.mirabilis 3</i> | 12.50±0.70 | 13.50±0.70 | 15.00±1.41 | 17.00±1.41 |
| <i>P.mirabilis 4</i> | 11.50±0.70 | 13.50±0.70 | 15.50±0.70 | 17.50±0.70 |
| <i>P.aeruginosa ATTC27853</i> | 11.00±0.00 | 12.50±0.70 | 14.50±0.70 | 15.50±0.70 |
| <i>P.aeruginosa 1</i> | 11.00±1.41 | 12.50±0.70 | 14.00±0.00 | 15.50±0.70 |
| <i>P.aeruginosa 2</i> | 10.00±0.00 | 11.00±1.41 | 12.50±0.70 | 13.00±1.41 |
| <i>P.aeruginosa 3</i> | 10.50±1.41 | 11.50±0.70 | 12.50±0.70 | 14.00±1.41 |
| <i>P.aeruginosa 4</i> | 10.00±1.41 | 11.50±0.70 | 12.50±0.70 | 13.50±0.70 |

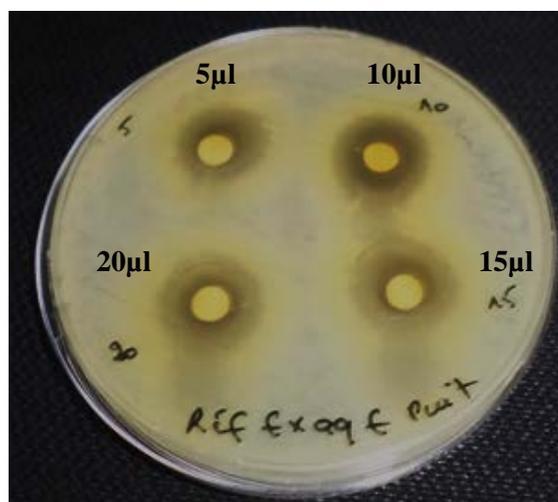


Figure 53 : Exemple de l'effet antibactérien de l'extrait aqueux d'*Origanum vulgare* vis-à-vis la souche *S.aureus* ATTC 29233.

DISCUSSION

Notre travail a porté sur l'isolement, l'identification et l'évaluation de la résistance de 102 souches isolées à partir de différents établissements de santé de la wilaya d'Annaba. Ainsi que, sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits (huile essentielle et extrait aqueux) de deux plantes aromatiques de l'est algérien : *Eucalyptus globulus* d'El Kala et *Origanum vulgare* de Guelma.

Pour cela, notre étude a été faite selon la procédure suivante:

❖ Identification des souches :

Les souches isolées ont été identifiées par le système API (BIO Mérieux) : API Staph, API 20E, API NE. Parmi un total de 102 souches cliniques, une fréquence d'isolement de 61% (62 souche) des bacilles à Gram négatif, suivie d'un taux de 39% (40 souche) pour les cocci à Gram positif. Nos résultats concordent avec ceux retrouvés dans des études récentes, à Guelma (Bouguenoun., 2017), à l'ouest algérien, Oran (Dali., 2015), au Maroc (Quassimi., 2010) et en Inde (Sahu et al., 2016).

Parmi un total de 40 souches de CGP identifiées, un nombre de 34 souches (54,85%) appartient à l'espèce *S.aureus* révélant 3 biotypes différents avec prédominance du biotype 6336153 chez 63% des souches suivie par le biotype 6736053 chez 22% des souches et le biotype 6736053 chez 15% des souches. Ces résultats sont en accords avec d'autres études (Touaitia et al., 2015 ; Rebiahi et al., 2011) qui ont confirmé la prédominance du biotype 6336153 suivis par le biotype 6736053 dans les infections causées par le germe *S. aureus*.

L'analyse des BGN identifiés par API système, montre une prédominance des entérobactéries avec un taux de 72% (45), suivie par le genre *Pseudomonas* avec un pourcentage égale à 28% (17), ces pourcentages concordent avec ceux obtenus à Guelma (Bouguenoun., 2017), au Maroc (Elouennas., 2008) et en France (Zogheib et Bupont., 2005). En revanche, d'autres études ont montré la fréquence des *Pseudomonas* par rapport aux BGN (Mesli., 2014; Zenati et al., 2014 ; Sefraoui., 2015 et Dali., 2015).

L'analyse des espèces identifiées par rapport à l'ensemble des souches d'entérobactéries isolées, indique une nette prédominance de l'espèce *E.coli* avec un taux de 42,22%, suivie de *K. pneumoniae* (33,33%), après *P.mirabilis* et *P.vulgaris* avec des taux respectifs de 15,33% et 8,88%, alors que *K.oxytoca* vient en dernière position avec un pourcentage de 2,22%. Ces

résultats sont similaires à ceux retrouvés dans le 17^{ème} rapport du AARN en 2016 qui rapporte la prédominance d'*E.coli* avec un taux de 54%, suivie par *K.pneumoniae* (17,45%) et après *P.mirabilis* avec un pourcentage égale à 5,6%, nos résultats sont similaires aussi avec ceux retrouvés par Messai et al en 2007.

Concernant le genre *Pseudomonas*, l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* reste la plus dominante (82,35%) suivie par *P. fluorescens* (17,65%), comme cela a été rapporté par plusieurs études (Touati et al., 2015 ; Mesli., 2014 ; Bakour et al., 2013 ; Zenati et al., 2015).

❖ **Prévalence des souches :**

La prévalence des femmes infectées par les souches de *S.aureus*, des entérobactéries et de *P.aeruginosa* est supérieure à celle des hommes avec des taux respectifs de 53%, 62% et 80%.

Dans notre étude le facteur d'âge a révélé des taux différents d'une espèce à l'autre. Concernant les infections causées par les souches appartenant à l'espèce *S.aureus*, les tranches d'âge les plus touchées sont la catégorie des adultes de 20 à 50 ans et la catégorie des personnes âgées de plus de 50 ans par un pourcentage similaire égale à 42%. Pour les entérobactéries, la tranche d'âge la plus touchée est de 20 à 50 ans suivie par la tranche des personnes âgées, alors que chez les *Pseudomonas* la catégorie la plus touchée est les personnes âgées dont l'âge dépasse 50 ans avec un taux égal à 80.

La relation entre le taux des infections cliniques, le sexe et l'âge diffère en fonction de la raison sous-jacente aigue pour l'hospitalisation. Certaines étude ont rapporté un risque plus élevé pour les infections cliniques chez le sexe masculin (Dalé., 2015 ; Bouguenoun., 2017), alors que d'autres s'opposent à ces résultats (Kakupa., 2016).

Les caractéristiques des patients influent sur le risque de développement de diverses infections cliniques. Les personnes âgées sont les plus à risque de développer des infections cliniques, peut-être d'une part, à cause d'immuno-sénescence, le déclin du système immunitaire et d'autre part, la prévalence très élevée de comorbidités. Le sexe joue également un rôle dans le développement de certaines infections cliniques (Eckenrode et al., 2014 ; Bouguenoun., 2017)

Dans une étude rétrospective, Eckenrode et al. ont trouvé qu'il n'y avait pas un risque accru d'ensemble des infections cliniques chez les patients âgés hospitalisés et qu'il n'y a aucune

relation globale entre l'âge et les taux des infections cliniques et que le risque lié au sexe varie en fonction de la cause d'admission à l'hôpital (Eckenrode et al., 2014 ; Bouguenoun, 2017).

La distribution de CGP en fonction des sites de prélèvements révèle que les souches de *S.aureus* sont essentiellement retrouvées dans les prélèvements de pus (53%) suivie par les prélèvements des urines (47%), nos résultats sont similaires avec ceux retrouvés par (Touati et al., 2014) cependant s'opposent à d'autres études qui ont rapporté une prévalence dominante de *S.aureus* dans les urines (Masrouri et al., 2005).

Concernant les entérobactéries, les infections urinaires prédominent les infections cliniques (76%), suivie par les infections des sites opératoires (24%). Ceci concorde avec les données présentées par Amazian et al en 2010 dans une étude sur les pays du bassin méditerranéen et aussi avec le 17^{ème} rapport de l'AARN en 2016.

D'une autre part, le bacille pyocyanique occupe une place prépondérante dans les infections cutanées dont les grands brûlés avec une prévalence de 80%, suivi par les infections du tractus urinaire. Ceci est comparable à ce qui a été retrouvé dans l'étude de Nyaledome en 2016.

❖ **Résistance aux antibiotiques :**

➤ **Résistance des souches de *S.aureus* aux antibiotiques :**

Les tests de sensibilité aux antibiotiques révèlent la présence d'une résistance très importante de 19 souches de *S.aureus* isolées. Actuellement il n'existe pas une définition universelle précise à la multi résistance aux antibiotiques. Certains auteurs définissent les bactéries multi résistantes comme des bactéries résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques (Siegel et al., 2007), et d'autres auteurs qualifiant une bactérie multi résistante, lorsqu'elle résiste au moins à trois molécules d'antibiotiques (Schwarz et al., 2010).

Les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline (SARM), sont apparues dans les années 60 peu de temps après l'introduction de la méthicilline dans la thérapeutique clinique et depuis, les SARM ont été considéré comme un pathogène nosocomial sérieux et courant dans les milieux hospitaliers ainsi que les établissements de soins à long terme dans le monde entier (EARS-Net., 2014).

Dans notre étude, la recherche phénotypique des souches SARM a détecté la présence de 8 souches de SARM parmi 19 souches multi résistantes avec un taux égale à 42,1%. Ce pourcentage est presque similaire à celui obtenue par Touatia et al en 2015 à Annaba (44,6%),

par contre moins important à celui obtenue par Alioua et al en 2014 (62,2%) et plus élevé que celui rapporté par Bouguenoun en 2016 à Guelma (24%).

En Algérie, le taux de SARM est en augmentation avec 4,5% en 2002 (Kesah et al., 2006) 33,2% en 2004 (Ramdani-Bouguessa et al., 2006), 45% en 2006 (Bekhoucha et al., 2009) et de 62,2% en 2014 (Alioua et al., 2014).

- **Bêtalactamines :**

Toutes nos souches ont été résistantes à la pénicilline, ces résultats obtenus sont similaires à ceux retrouvés par Rebiahi et al en 2011, Basset et al en 2013 et Touatia et al en 2015.

Concernant l'oxacilline et la céfoxitine, les taux de résistance sont respectivement 76% et 68%, ces taux sont plus élevés à ceux indiqués par le 17^{ème} rapport du AARN en 2016 qui montre un pourcentage de résistance égale à 37,34%, par contre inférieur à d'autres études qui ont trouvés une total résistance de *S.aureus* à ces deux molécules (Basset et al., 2015 et Touatia et al., 2015).

Cette résistance élevée des souches de *S.aureus* aux bêtalactamines pourrait être expliqué par l'acquisition de plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques (Hiramatsu., 2001 ; Abbanat et al., 2008). Selon Daurel et Leclercq (2008), 80 % à 95 % des souches produisent une pénicillinase qui inactive la pénicilline G et l'ampicilline, rendant leurs indications obsolètes dans le cadre d'une infection à *S. aureus*. Une hyperproduction de pénicillinase peut être responsable de l'hydrolyse des pénicillines M, céphalosporines et des carbapénèmes, mais le mécanisme le plus connu pour que les *S. aureus* acquiert une résistance à la méticilline et à tous les autres agents β -lactames est l'expression du gène *mecA* exogène. Ce gène, code pour une variante de la protéine de liaison à la pénicilline PLP2' (PLP2a) avec une faible affinité pour les β -lactamines, empêchant ainsi l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire par ces molécules. (EARS-Net., 2014).

- **Les aminosides :**

Dans la présente étude, les taux de résistance de *S.aureus* aux aminosides ont été très élevés, notant un pourcentage de 89% vis-à-vis la gentamycine et la kanamycine et celui contre l'amikacine est de 73%. Nos pourcentages sont supérieurs à celui retrouvés par l'AARN en 2016 dont les taux de la gentamycine, la kanamycine et l'amikacine ont été respectivement 25,64%, 48,14% et 18,76%.

L'analyse de la résistance des SARM aux aminosides en Algérie montre que les taux sont absolument en progression, actuellement, le taux de la résistance vis-à-vis de la gentamycine est de 33,65% et celui contre la kanamycine est de 52,04% (AARN., 2014), plus récemment à Annaba, Touaitia a décrit des taux de 60% et 100% vis-à-vis de la kanamycine et la gentamycine respectivement (Touaitia, 2016).

- **Les macrolides :**

Avec un taux de résistance à l'érythromycine de 31%, notre résultat est plus élevé à celui rapporté par Bouguenoun en 2016 avec un taux de 28%, mais il reste inférieur à ce qui a été rapporté par Alioua en 2015 (64,1%).

Ce taux de résistance relativement élevé peut être expliqué par le fait que le traitement des infections à Staphylocoques fait appel essentiellement à cet antibiotique, avec bien sûr la disponibilité de ces médicaments sur le marché algérien et leur accessibilité sans prescription médicale (Alioua., 2015).

Les résultats montrent que la résistance à l'érythromycine a été souvent associée à celle de la lincomycine (21%) ce qui nous incite à penser au même mécanisme de résistance (MLSB) qui confère la résistance aux Macrolides, Lincosamides et Streptogramines (Bismuth et Leclercq .,2000). On note aussi que notre taux de résistance à la lincomycine est significativement supérieur à ce qui a été rapporté par Touaitia et al en 2015(9 %) , mais reste inférieur à celui de Bouguenoun en 2016 (39 %). La résistance à cette molécule chez les SARM varie d'un pays à un autre allant de 10% en 2003 au Liban jusqu'à 93.9% aux Etats Unis (Ouchenane et al., 2001; Gus et al., 2009).

La lincomycine n'est pas un antibiotique largement utilisé en Algérie pour le traitement des infections à SARM, ce qui peut expliquer le peu de résistance retrouvée comparativement aux autres pays (Touaitia., 2016).

Le taux de résistance de nos souches de *S.aureus* vis-à-vis de la pristinamycine était de 43%. Ce taux est très important par rapport à celui indiquée par Bouguenoun en 2016 (6%), cependant ce taux concorde avec celui retrouvé dans les études de précédentes (Touaitia., 2016 ; Alioua., 2014).

- **Glycopeptides :**

Dans notre étude, l'antibiogramme a révélé une moyenne de 15% des souches de *S.aureus* ont présenté une résistance vis-à-vis la vancomycine. Ce taux de résistance est inférieur à celui obtenu par Bouguenoun en 2016 à Guelma, mais plus important à celui obtenu par Touaitia et al en 2015 qui ont isolé des *S.aureus* cliniques avec résistance intermédiaire à la vancomycine à Annaba.

La résistance aux glycopeptides chez *S. aureus* pourrait être liée à une diversité de mécanismes moléculaires. Ces souches ont une paroi épaissie résultant d'une réorganisation complexe du métabolisme du peptidoglycane liée probablement à des mutations dans de multiples gènes. Ces réorganisations pourraient empêcher l'accès de la vancomycine à sa cible. Une autre hypothèse non exclusive serait l'hyperproduction de précurseurs du peptidoglycane agissant comme autant de leurres pour les glycopeptides (Joly-Guillou et al., 2004).

L'augmentation des SARM dans les hôpitaux algériens a favorisé l'intégration des glycopeptides dans les schémas thérapeutiques permettant l'élimination de ces souches, ces molécules étaient jusqu'à ces dernières années préservées du phénomène de résistance. D'autres auteurs ont déclaré que l'augmentation des SARM a accompagné l'utilisation abusive de la vancomycine (Awad et al, 2007).

- **Cyclines :**

Les souches de *S.aureus* ont montré un niveau de résistance important vis-à-vis la tétracycline où seulement 33% des souches ont été sensibles. Ce taux de résistance est supérieur à celui retrouvé par Basset et al en 2015 à Guelma, mais reste inférieur à celui rapporté par Touaitia et al en 2015 à Annaba.

- **Autres :**

Les autres antibiotiques testés ont gardé une considérable activité antimicrobienne sur les isolats de SARM et SASM révélant des taux de résistance inférieur à 27%, mis à part l'ofloxacin et la rifampicine (58%). Ces résultats obtenus concordent avec ceux rapportés par le 17^{ème} rapport de l'AARN en 2016 à travers les hôpitaux d'Algérie.

➤ **Résistance des entérobactéries aux antibiotiques :**

A partir des résultats de l'antibiogramme des entérobactéries de notre collection, 12 souches multirésistantes aux molécules testées (4 *E.coli*, 4 *K.pneumoniae*, 4 *Proteus mirabilis*) ont été ciblé pour l'étude de l'activité antibactérienne des extraits de plantes étudiées.

• **Bêtalactamines :**

L'étude de la résistance des entérobactéries sélectionnées révèle des taux de résistance totale pour l'amoxicilline, l'amoxicilline+acide clavulanique et la ticarcilline. Ces résultats sont supérieurs à ceux retrouvés par Debabza en 2015 à Annaba (l'amoxicilline (99%), l'amoxicilline+acide clavulanique (81,91%) et la ticarcilline (89,91%)) et également plus élevés à ceux indiqués dans le 17^{ème} rapport d'AARN en 2016.

Une faible activité de la céftazidime (84%) et la céfoxtine (53%) a été remarquée. Ces taux de résistance sont supérieurs à ceux retrouvés par Djahida en 2011 (céftazidime (47,1%) et la céfoxtine (29,5%)), mais reste inférieurs à ceux observés dans une autre étude (Debabza ; 2015).

Le taux de résistance le plus faible pour les souches des entérobactéries est observé avec 38% pour l'imipénème et la céfotaxime. Pour l'imipénème, on note une augmentation remarquable du taux de résistance en comparant nos résultats avec d'autres études (Djahida., 2011 ; Debabza., 2015)

La résistances des entérobactéries aux carbapénèmes n'est pas limitée à la production de carbapénémases, mais peut impliquer d'autres mécanismes, y compris des changements structurels dans la membrane externe et/ou l'hyperproduction d'AmpC en plus des BLSE (Uz et al., 2014).

• **Les aminosides :**

L'amikacine présente une bonne activité sur toutes les souches avec une sensibilité totale, contrairement à la gentamicine qui reste plus au moins inactive avec une résistance égale à 38%. Selon les résultats obtenus et plusieurs études, l'amikacine reste la molécule la plus efficace avec 100% de souches sensibles (Gangoue Piebouji., 2004; Wu et al., 2007 ; Djahida., 2011)

- **Les quinolones :**

L'analyse du profil d'antibiorésistance des entérobactéries montre un pourcentage de résistance assez important de l'acide nalidixique (58%). Ce taux de résistance exprimé par nos souches est plus élevé par rapport à celui rapporté par plusieurs études (Debabza., 2015 ; Djahida., 2015).

En revanche, la ciprofloxacine permet une récupération de l'activité de l'antibiotique soit 75% des souches sensibles, mais ce taux reste plus faible à celui rapporté par Debabza en 2015.

- **Autres :**

Toutes nos souches ont montré une résistance totale à la fosfomycine. Concernant cette molécule, Debabza en 2015 a rapporté un taux de résistance inférieur à celui trouvé dans notre travail. Une activité moins importante est détectée pour la co-trimexazole avec 46%. Ce taux reste supérieur à celui décrit dans la littérature par plusieurs études (Ammari et al., 2001; Kahlmeter., 2003; Guneyssel et al., 2009 ; Debabza .,2015)

En ce qui concerne la colistine, c'est l'une des molécules gardant le taux de sensibilité le plus élevé (93%) sur toutes les espèces appartenant à la famille des entérobactériaceae. Cela est vraisemblablement lié à une moindre utilisation de cet antibiotique en pratique courante (Mahamat et al., 2006 ; Rbahia et al,2015).

- **Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques :**

Au vu des résultats obtenus, nous avons constaté que les antibiotiques ont montré une grande hétérogénéité des souches. Généralement, les souches du bacille pyocyanique ont exprimé une résistance à tous les antibiotiques des différentes familles, mais à des degrés variables d'une souche à l'autre.

- **Bêtalactamines :**

Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques ont montré que les souches de *P.aeruginosa* sont totalement résistantes à deux antibiotiques : la pipéracilline et la céftazidime. Ce taux de résistance de 100% à la pipéracilline, dépasse largement celui rapporté par Nyaledome en 2016 qui étaient respectivement 26,80% et 37,7% . Cependant le taux de 100% à la céftazidime est supérieur à celui trouvé par Debabza., 2015 (80%) alors

qu'il dépasse largement celui rapporté par Liazid (2012) et Bouguenoun (2016) qui étaient respectivement 7,14% et 28%.

Une résistance très élevée a été constatée pour l'aztréonam et la ticarcilline exprimant un taux égal à 80%. Dans son étude, Debabza (2015) a rapporté des taux de résistance à ces deux antibiotiques supérieurs à ceux trouvés dans notre étude.

Le taux de résistance le plus faible dans notre travail est observé avec 40% à l'imipénème. Ce pourcentage de résistance est supérieurs à celui rapporté dans plusieurs études (Nyaledome., 2016 ; Debabza., 2015), mais reste inférieur à celui rapporté par Bouguenoun (2016) à Guelma qui était 100%.

La résistance à la ticarcilline est due probablement à un mécanisme non enzymatique, elle est liée à l'association d'une faible perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* associée à une hyper expression du phénomène d'efflux. Elle confère souvent un faible niveau de résistance aux β -lactamines anti-Pseudomonas autre l'imipénème. Elle touche essentiellement la ticarcilline puis l'aztréonam (Cavallo et al., 1998). Quant à la résistance à l'imipénème, elle est souvent liée à une perte de la porine D2 (OprD) et couplée à une faible hydrolyse par la céphalosporinase périplasmique (Bricha et al., 2009).

- **Les aminosides :**

Les trois molécules testées (tobramycine, amikacine, gentamycine) présentent une bonne activité sur les souches de *P.aeruginosa* avec une sensibilité comprise entre 80% pour la tobramycine et 60% pour l'amikacine et la gentamycine. Ces taux sont supérieurs à celui rapporté par Liazid en 2012.

- **Les quinolones :**

La ciprofloxacine s'est montré active, dont 80% des souches ont été sensibles à cette molécule. Ce résultat est supérieur à celui retrouvé par Liazid (2012) (10%), cependant inférieur à celui noté dans étude de Bouguenoun en 2016 (57%).

- **Autres :**

L'analyse des résultats obtenus nous a permis de constater que la fosfomycine est très efficace avec une sensibilité totale. Cette sensibilité est largement supérieur par rapport à celle obtenue par plusieurs études (Debabza., 2015 ; Bouguenoun., 2016 ; Nyaledom., 2016). Nous avons

noté aussi une bonne activité de la colistine avec un taux de sensibilité égal à 80%, contrairement à d'autres études qui ont montré une sensibilité totale à cet antibiotique (Debabza., 2015 ; Bouguenoun., 2016 ; Nyaledome., 2016).

A partir de nos résultats, les antibiotiques les plus actifs sur nos isolats de *P.aeruginosa* sont par ordre décroissant : la fosfomycine (active sur 100% des souches), la colistine - la ciprofloxacine - la tobramycine (80%) et enfin l'amikacine - la gentamycine et l'impénème (60%).

❖ Rendements d'extraction des huiles essentielles :

Les rendements moyens en huiles essentielles ont été calculés par rapport à la plante séchée. *Origanum vulgare* de la montagne Houara de la région de Guelma a fourni un rendement de 2,9% révélant sa richesse en molécules bioactifs. Ce résultat est légèrement supérieur à celui rapporté par Bouhadouda et al en 2016 avec un rendement de 2,52% de la même espèce récoltée dans la région Nechemya de Guelma, mais plus élevé à ceux trouvés par Semra et al en 2013 de la wilaya de Constantine et Sahraoui et al en 2017 de la région de Sétif, dont les rendements sont estimés respectivement 2,2 et 2,5%. En revanche, un rendement plus élevé était estimé à 4,8% par Bendahou et al (2008) de la région de Tlemcen.

Il ressort aussi que le rendement moyen en HE de l'espèce *Eucalyptus globulus* récoltée de la région de Boumelek d'EL Kale est de l'ordre de 2,25%. Cette productivité est très élevée à celle de Mulyaningsih et al. (2014) (0,71%) et meilleur que celle obtenue par Modeste et al. (2014) et Selvakumar et al. (2012) (0,72 à 0,82%).

Ces variations dans le rendement en huile essentielle des deux plantes peuvent être attribuées à plusieurs facteurs environnementaux prenant en compte que l'huile essentielle est un produit métabolique de cellules végétales et sa composition quantitative et qualitative peut être influencée par les conditions climatiques (notamment le type de climat, l'altitude, le taux d'exposition au soleil) le type de sol, le stade de croissance de la plante en question, le moment de la récolte et la méthode d'extraction (Besombes, 2008 ; Béjaoui et al., 2013 ; Bennadja et al., 2013).

❖ Évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles :

L'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum vulgare* et d'*Eucalyptus globulus* contre 36 souches multirésistantes aux antibiotiques et 4 souches de référence est

expérimentée par trois méthodes : la méthode de diffusion à partir d'un disque, la méthode des puits et la méthode des microatmosphères. Rappelons que nous avons utilisé deux volumes d'huile essentielle 5 et 10 μ l.

Les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu solide en exposant nos souches à diverses concentrations d'huile essentielle.

L'huile essentielle d'*O.vulgare* est plus active que celle d'*E.globulus*, elle a provoqué une puissante inhibition de croissance vis-à-vis la totalité des souches mutirésistantes testées en utilisant les trois méthodes précédentes, où les meilleures zones d'inhibitions ont été enregistrées par la méthode de diffusion à partir d'un disque ou l'aromatogramme. Contrairement, l'essence d'*E.globulus* a approuvé un pouvoir inhibiteur important seulement en utilisant la méthode des disques par contre aucune zone d'inhibition n'a été enregistré pour les deux autres méthodes. Ceci confirme que la méthode de diffusion à partir d'un disque est la méthode de référence pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles selon plusieurs auteurs (Benjilali et al., 1986 ; Satrani et al., 2007 ; Billerbeck et al., 2002 ; Pibiri et al., 2005 ; Mehani et al., 2014), parce qu'elle permet le contact direct de l'HE avec le microorganisme testé.

En se référant aux résultats présentés dans les tableaux du 9 au 20 nous constatons que les diamètres d'inhibition obtenus par le volume de 10 μ l d'HE pour les 41 souches testées sont supérieurs à ceux obtenus par le volume de 5 μ l, par conséquent l'accroissement du volume d'HE induit l'amélioration de son pouvoir inhibiteur. Ceci peut être expliqué par l'augmentation du pourcentage des molécules bioactives responsable de son effet antibactérien, dont on cite le carvacrol et le thymol pour le cas de l'HE de l'*O.vulgare* et le 1,8 cineole ou eucalyptol pour l'HE de l'*E.globulus*.

D'après les résultats obtenus, l'HE d'*E.globulus* est qualifié d'une bonne activité antibactérienne particulièrement large sur les différentes espèces bactériennes testées. Les niveaux de sensibilité des bactéries vis-à-vis cette essence sont relativement proches pour les souches de *S.aureus* et *P.aeruginosa* avec des diamètres qui varient respectivement entre 8,0 \pm 0,00 à 16,5 \pm 0,70 mm et entre 10,5 \pm 0,70 à 13,0 \pm 0,70 mm. Une sensibilité plus élevée a été remarquée par les entérobactéries, dont les diamètres d'inhibition pour les deux volumes 5 et 10 μ l ont été respectivement entre 11,0 \pm 1,41 à 24,0 \pm 1,41 mm et entre 15,5 \pm 0,70 à 30,0 \pm 1,41 mm.

Ces résultats constatés sont nettement plus élevés comparés aux précédents rapportant sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*E.globulus*. Elaissi et al. (2011) ont évalué l'activité antibactérienne de cette huile vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 ($7,7\pm 0,06$ mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 22753 ($8,2\pm 1,2$ mm) et *Escherichia coli* ATCC 25922 ($10,0\pm 0,00$ mm), Boulekbach-Makhlouf et al. (2013) de Sétif ont également évalué l'effet antibactérien de cette essence contre *S.aureus* ($8,67\pm 0,58$ mm) et *Klebsella pneumoniae* qui s'est montré résistance à cette HE.

Ainsi les travaux de Mekaddem-Draoui. (2011) sur l'HE d'*E. globulus* avec une composition en huile essentielle riche en 1,8 cinéol, ont démontré une activité antibactérienne relativement proche à nos résultats, dont les zones d'inhibition ont été comme suit *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 (16mm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 22853 (18mm), *E.coli* (20mm) et *Proteus mirabilis* (18mm).

Dans une autre étude de Bachir Raho. (2017), l'huile essentielle d'*E.globulus* a généré des diamètres d'inhibition supérieures à nos résultats, dont *S. aureus* a donné des larges zones d'inhibition allant de 69 à 75 mm, *P.aeruginosa* et *E.coli* ont donné un diamètre égal à 14mm.

Dans la présente étude, l'huile essentielle des feuilles d'*Origanum vulgare* récoltées de la région de Guelma a exercé un pouvoir inhibiteur très puissant, où la totalité des souches multirésistantes testées ont été extrêmement sensible à cette essence avec des diamètres d'inhibition supérieurs à 20mm.

Staphylococcus aureus semble être l'espèce la plus sensible avec des zones d'inhibition de $21,5\pm 0,70$ à $53,5\pm 2,12$ mm pour 5 μ l et de $33,5\pm 3,53$ à $82,5\pm 3,53$ mm pour 10 μ l. Les huit souches de SARM ont été également extrêmement sensibles à cette essence qui est plus efficace que l'antibiotique d'oxacilline.

Ces résultats sont nettement plus élevés comparés aux précédentes études sur l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*O.vulgare*. Imtara et al. (2018) du Maroc ont évalué l'effet antibactérien de cette HE vis-à-vis *Staphylococcus aureus*. Les résultats de cette étude ont donné un diamètre d'inhibition égale à $16,0\pm 1,41$ mm. Yotova et al. (2015) ont également décrit une zone d'inhibition inférieure à nos résultats ($29,10\pm 0,20$ mm).

Ainsi les travaux de Bouhadouda et al. (2016) sur l'HE d'*O.vulgare* avec un profil chimique riche en thymol (23,129%) et le carvacrol (20,312%), ont montré un pouvoir inhibiteur contre

Staphylococcus aureus relativement proche à nos résultats ($63,33 \pm 3,05$ mm pour un volume de $5 \mu\text{L}$ d'HE).

L'hypersensibilité de la souche *Staphylococcus aureus* peut s'expliquer probablement par la nature des parois des bactéries Gram (+) qui est dépourvue de membrane externe et qui semble être sensible aux changements environnementaux externes, tels que la température, le pH, et les extraits naturels (Balentine et al., 2006). En revanche, de rares travaux rapportent l'inexistence de lien apparent, ni aucune corrélation entre l'activité inhibitrice des essences aromatiques et la nature de la paroi bactérienne (Zaika, 1988, Boukhatem et al., 2014).

Les entérobactéries sont également extrêmement sensibles : *E.coli*, *K.pneumoniae* et *P.mirabilis* ont montré des zones d'inhibition allant de $19,5 \pm 2,12$ à $49,5 \pm 0,70$ mm pour un volume de $5 \mu\text{l}$ d'HE et de $33,5 \pm 2,12$ à $80,0 \pm 0,00$ mm pour $10 \mu\text{l}$.

Nos zones d'inhibition obtenues pour *E.coli* dépassent largement ceux rapportées par Imtara et al. (2018) et Mahfoud et al. (2017) qui étaient respectivement $32,5 \pm 3,54$ mm et $21,3$ à $32,6$ mm. Cependant le diamètre d'inhibition de la souche de référence *K.pneumoniae* ATCC10031 ($32,0 \pm 1,41$ mm) est inférieur à celui rapporté dans étude de Bouhadouda et al. (2016) dont le diamètre a été égal à $54,83 \pm 1,24$ mm.

Les quatre souches de *Proteus mirabilis* testées ont montré une hypersensibilité à l'essence d'*O.vulgare* avec des zones d'inhibition allant de $38,0 \pm 0,70$ à $42,0 \pm 1,41$ mm pour un volume de $5 \mu\text{l}$ d'HE. Ce résultat obtenu est presque similaire à celui rapporté par Bouhadouda et al en 2016 ($43,66 \pm 1,44$ mm pour $5 \mu\text{l}$ d'HE).

Contrairement à beaucoup d'études précédentes (Dorman et Dean., 2000 ; Sari et al., 2006 ; Bendahou et al., 2008 ; Béjaoui et al., 2013 ; Bouhadouda et al., 2016 ; Jnaïd et al., 2016), l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* s'est montré extrêmement sensible à l'essence d'*O.vulgare* avec une meilleure zone d'inhibition égale à $50,0 \pm 1,41$ mm.

Les valeurs des CMI des deux essences sont en accord avec les résultats obtenus dans le test préliminaire par la méthode de diffusion à partir d'un disque ou aromatogramme, autrement dit les bactéries ayant les diamètres d'inhibition les plus élevés sont celles qui possèdent les CMI les plus faibles, et les bactéries ayant les diamètres les plus faibles sont celles qui donnent les CMI les plus élevés.

Les rapports CMB/CMI des deux huiles d'*E.globulus* et *O.vulgare* sont entre 1 et 2,5 ce qui confirme que les deux huiles exercent un effet bactéricide sur toutes les souches bactériennes testées.

La bonne activité antibactérienne des deux huiles essentielles est due principalement à leur composition chimique. Concernant l'HE d'*E.globulus*, beaucoup d'études expérimentales indiquent que cette essence est caractérisée par une forte teneur en 1,8-cinéole apparaît comme constituant majoritaire. Ce composant essentiel est connu par son potentiel effet antibactérien vis-à-vis d'un grand nombre de bactéries (*E.coli*, *S.aureus* et *P.aeruginosa*), ce qui confère à l'HE d'*E.globulus* son effet d'antibiotique naturel (Manika et al., 2013 ;Mulyaningnih et al., 2010, Gilles et al., 2010).

Selon plusieurs travaux scientifiques (Cetin et al., 2011 ; Wallar et al., 2016 ; Gong et al., 2014 et Jnaid et al., 2016), le carvacrol et thymol ont été qualifié comme des composants majoritaires dans l'HE d'*O.vulgare*. Ces deux substances structurellement similaires semblent jouer un rôle synergique en rendant la membrane cellulaire perméable (Lambert et al., 2001). Le thymol a été précédemment décrit comme capable d'interrompre la membrane bactérienne, en affectant à la fois le gradient de pH et le flux d'électrons à travers la membrane (Helander et al., 1998 ; Lambert et al., 2001). On pense que le carvacrol forme des canaux à travers la membrane en s'intercalant entre les chaînes d'acides gras des phospholipides (Ultee et al., 1999). Cette déstabilisation de la membrane, augmenterait la fluidité membranaire, augmentant à son tour la perméabilité passive (Ultee et al., 2002).

❖ Tests de synergie :

Deux tests d'évaluation de l'effet synergique ont été effectués sur huit souches de SARM, le premier correspond à une combinaison entre les deux HE étudiées et le second s'agit d'une combinaison entre chaque huile essentielle et l'oxacilline.

La combinaison des deux HE d'*E.globulus* et *O.vulgare* a donné des diamètres d'inhibition supérieurs à la somme de chaque essence étudiée isolément, ce qui confirme la présence d'un effet synergique significatif à nos huiles essentielles.

Cet effet synergique est probablement dû à une complémentarité entre les composants chimiques majoritaires ou minoritaire présents dans chaque HE qui agissant en synergie ce qui permet l'augmentation du pouvoir bactéricide des HE, ou bien à la formation de

complexes entre les agents antibactériens contenus dans ces extraits, qui devient effective dans la lyse de la paroi cellulaire des microorganismes (Saffidine K., 2015).

Des activités antibactériennes variables et significatives sont obtenues vis-à-vis les SARM en combinant les essences des deux plantes étudiées à l'oxacilline. Les diamètres d'inhibition des combinaisons sont nettement supérieurs à ceux d'oxacilline seul qui n'a montré aucune zone d'inhibition de croissance. Le meilleur effet synergique est obtenu en combinant l'HE d'*O.vulgare* avec l'oxacilline. Cependant la combinaison d'HE d'*E.globulus*/OX présente un bon effet synergique mais reste inférieur à celle d'HE d'*O.vulgare*/OX.

L'effet synergique des combinaisons des extraits de plantes avec des antibiotiques peut être exploité pour améliorer l'activité d'antibiotique, ou bien réduire la dose d'antibiotique et minimiser ces effets indésirables.

A l'heure actuelle, les mécanismes par lesquels les composés chimiques des extraits agissent en synergie avec les antibiotiques ne sont pas encore élucidés, mais certains auteurs pensent qu'il s'agit d'un effet conjuguée sur la perméabilité de la membrane cytoplasmique des germes, facilitant l'influx des antibiotiques (Sibanda., 2007) ; ou bien l'inhibition des β -lactamases (Kusuda et al., 2006 ; Eumkeb et al., 2010).

❖ Rendements d'extraction des extraits aqueux :

Le calcul des rendements par rapport au poids total de la poudre d'*Eucalyptus globulus* et d'*Origanum vulgare* montre des proportions très élevées de l'ordre de $50,5 \pm 0,70$ et $45,5 \pm 3,53$ pour les deux plantes, respectivement.

Pour ces deux plantes, il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie étant donné que notre étude est la première à mettre en évidence les rendements en extraits aqueux de ces deux plantes aromatiques.

Les rendements peuvent être influencés par plusieurs paramètres et dépendent entre autre de la composition chimique et les caractéristiques physiques de la matière végétale ainsi que la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée (Lee et al., 2003 ; Dai et Mumper, 2010 ; Bouhadouda, 2016).

❖ Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits aqueux :

L'étude de l'effet antibactérien des extraits aqueux des deux plantes aromatiques : *Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* contre les 41 souches testées est expérimentée par la méthode des disques ou aromatogramme. Rappelons que nous avons utilisé quatre volumes d'EAq 5, 10, 15 et 20 μ l. Les extraits des deux plantes aromatiques de l'est algérien ont exercé un pouvoir inhibiteur important et relativement similaire contre la totalité des souches multirésistantes testées.

D'après les résultats obtenus, l'EAq d'*E.globulus* récolté de la région d'El Kala a approuvé une activité antibactérienne importante, où la totalité des souches multirésistantes testées ont été sensible à extrêmement sensible à cet extrait.

L'espèce *S.aureus* s'est montré la plus sensible avec des zones inhibition allant de $13,5\pm 0,70$ à $25,5\pm 0,70$ mm. Ces résultats sont nettement plus élevés comparés à d'autres études sur l'activité antibactérienne de l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus*. Sasikala et al. (2014) de l'Inde ont évalué l'effet antibactérien de cet extrait vis-à-vis *Staphylococcus aureus*. Les résultats de cette étude ont donné un diamètre égal à $10,0\pm 0,3$ mm. Amabye et al. (2016) ont également décrit un diamètre d'inhibition inférieur à nos résultats (15mm).

Ainsi les travaux de Bahbahani et al. (2013) de l'Iran sur l'extrait aqueux d'*Eucalyptus*, ont montré un pouvoir inhibiteur contre cette espèce bactérienne relativement proche à nos résultats (15 à 24,5 mm).

Les 14 souches d'entérobactéries se sont montrées également sensibles à cet extrait végétal montrant des diamètres d'inhibition de $9,0\pm 0,0$ à $23,5\pm 0,70$ mm. Nos zones d'inhibition obtenues pour les deux espèces *E.coli* et *K.pneumoniae* sont supérieures à ceux rapportées par Sasikala et al. (2014) et Amabye et al. (2016).

Contrairement à une précédente étude de Khan et al. (2009), l'espèce *P.aeruginosa* a approuvé une sensibilité importante à l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus* avec des zones d'inhibition allant de $11,5\pm 0,70$ à $16,5\pm 0,70$ mm.

Concernant l'extrait aqueux de la plante spontanée *Origanum vulgare*, un effet antibactérien assez élevé a été constaté vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées. Ce pouvoir antibactérien remarqué reste largement inférieur à l'HE de la même plante.

Les niveaux de sensibilité à cet extrait sont relativement proches pour les souches de *S.aureus*, les entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres qui varient respectivement de $9,5\pm 0,70$ à $22,0\pm 1,41$ mm, $11,0\pm 1,41$ à $19,5\pm 0,70$ mm et de $10,0\pm 0,00$ à $15,5\pm 0,70$ mm. Nos résultats obtenues pour les trois espèces *S.aureus*, *E.coli* et *K.pneumoniae* sont largement supérieures à ceux rapportés par Kandasamy et al. (2017) qui étaient respectivement $13,5\pm 0,70$, $10,9\pm 4,40$ et $6,9\pm 1,50$ mm. Bankova et Teodora. (2017) ont trouvé des résultats inférieurs à nos résultats concernant l'espèce *K.pneumoniae* ($14,25\pm 1,92$ mm) et *P.aeruginosa* ($11,75\pm 1,48$ mm).

Une étude réalisée sur l'extrait aqueux de la même espèce végétale par Chaudhry et al. (2009) sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebseilla pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* a montré une résistance totale de ces bactéries à l'extrait aqueux d'*Origanum vulgare*.

Le bon effet antibactérien prouvé par les deux extraits aqueux étudiés est attribué principalement à leur profil chimique qui n'est pas encore élucidé par des travaux scientifiques.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

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

Notre travail a porté sur l'isolement et l'évaluation des niveaux de la résistance aux antibiotiques de 102 souches provenant des établissements de santé de la wilaya d'Annaba.

Eucalyptus globulus récoltée de la région Boumelek (El Kala) en Mai 2013 et *Origanum vulgare* récoltée de la montagne Houara (Guelma) en Juin 2014 ont fait l'objet d'une étude phytochimique, une extraction de leurs huiles essentielles par hydrodistillation et une réalisation d'extraits aqueux ainsi qu'une évaluation de leur effet antibactérien.

Les résultats d'identification bactérienne par système API ont indiqué que sur les 102 souches collectées : 40 appartient au Gram positif dont 34 souches répondent aux profils numérique de l'espèce *S.aureus* et 62 appartiennent au Gram négatif dont 45 étaient des entérobactéries (19 *E.coli*, 15 *K.pneumoniae*, 1 *K.oxytoca*, 6 *P.mirabilis*, 4 *P.vulgaris*) ainsi 17 appartiennent au genre *Pseudomonas* (14 *P.aeruginosa* et 3 *P.fluorescens*).

Cette étude nous a révélé des taux inquiétants de la résistance bactérienne pour l'ensemble des souches isolées, 42% des souches de *S.aureus* ont été résistantes à la méthicilline, 87% et 73% respectivement des souches ont montré une résistance élevée à la gentamycine et l'amikacine. Ainsi que 15% des isolats avaient une résistance vis-à-vis la vancomycine.

La détermination des niveaux de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* montre une résistance considérablement élevée vis-à-vis des β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones.

Les pourcentages de la résistance vis-à-vis l'imipénème pour les souches d'entérobactéries et *P.aeruginosa* étaient respectivement de l'ordre de 38% et 40%, ces taux sont aussi alarmants, vu la rareté de ce phénotype en Algérie et la menace de la dissémination de cette résistance dans le monde.

Le rendement moyen d'extraction a été respectivement 2,25% et 2,9% pour les huiles essentielles, et de $50,5 \pm 0,70$ et $45,5 \pm 3,53$ pour les extraits aqueux d'*E.globulus* et *O.vulgare*.

L'ensemble des résultats obtenus in vitro montre que les deux plantes aromatiques récoltées de l'est algérien, *Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* ont exercé un pouvoir inhibiteur élevé sur la totalité des 36 souches multi résistantes testées.

Il est important de noter que l'huile essentielle d'*O.vulgare* s'est montrée plus puissante que l'huile essentielle d'*E.globulus*, alors que l'extrait aqueux d'*E.globulus* est plus efficace que son huile essentielle. Cependant, les combinaisons entre les deux huiles essentielles et chaque huile essentielle avec l'oxacilline effectués pour les SARM ont montré la présence d'un effet synergique.

En effet, cette sensibilité importante des souches bactériennes à ces extraits suggère leur possible exploitation en thérapie comme alternative aux antibiotiques, dont l'efficacité d'action se décroît de façon continue à cause de leurs utilisations anarchiques conduisant à la propagation des bactéries multirésistantes.

Enfin, cette activité antibactérienne exercée par les huiles essentielles et les extraits aqueux résulte principalement à leurs compositions chimiques, riches en molécules bioactives à pouvoir antibactérien.

Comme perspectives pour ce travail, il serait intéressant de :

- Identifier les supports génétiques chez les SARM ainsi que les souches d'entérobactéries et *Pseudomonas aeruginosa* résistantes à l'imipénème.
- Déterminer la composition chimique des huiles essentielles par CPG/MS et les extraits aqueux par HPLC/MS.
- Isoler les différents composants des HE et des EAq, afin de cibler la ou les substances responsables de leur effet antibactérien et la synergie entre les deux HE.
- Etudier l'activité antioxydante et l'éventuelle synergie entre les extraits aqueux des deux plantes.
- Utiliser ces extraits aromatiques pour la stérilisation de l'atmosphère des milieux hospitaliers vue leur volatilité.
- Evaluer l'utilisation de ces extraits en agroalimentaire pour augmenter la durée de conservation des produits alimentaires.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

A

-AARN : Réseau algérien de surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. (2014) Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Le 15ème rapport d'évaluation (de janvier à décembre 2014).

-Abbanat, D., Maciela, M., Bush, K. (2008) New agents in development for the treatment of bacterial Infections. *Current Opin Pharmac.*, 8:582–592.

-Alioua, M.A. (2014). Thèse de doctorat : Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie. Page 219.

-Amabye , T.G., Bezabh , M., Mekonen, F. (2016) Phytochemical and antimicrobial potentials leaves extract of *Eucalyptus globulus* oil from Maichew Tigray Ethiopia. *International journal of complementary and alternative medicine*. DOI:10.15406.

-Amazian, K., Rossello J., Castella, A., Sekkat, S., Terzaki, S., Dhidah, L., Abdelmoumène, T., Fabry, J., Les membres du réseau NosoMed. (2010) Prévalence des infections nosocomiales dans 27 hôpitaux de la région méditerranéenne. *Eastern Mediterranean Health Journal.*, 16 : 1070-1078.

-Ammari, H., Ramdani-Bouguessa, N. et Bellouni, R. (2001) Antibiothérapie dans les infections ORL. *Médecine du Maghreb.*, 91.

-API 20 E Manual (Mai 2010), Ver :Français. BioMérieux ; 13p. Repéré à : <file:///C:/Users/ASUS/Documents/ETUDE/Thèse/Articles%20et%20livres%20THESE/API20E2.pdf>.

-Arpinop., Prevôt, A, Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol A et Witier, P. (1995) Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Ed Masson, Paris.

-Association française de normalisation (AFNOR). (1986) Recueil des Normes Françaises « huiles essentielles ». 2 ème éd. Ed AFNOR, Paris.

-Avril,J,L ., Denis,F et Monteil,H. (2000) Bactériologie clinique. 3éme ed :Ellipes. Page : 310-311.

-Awad, S., Elhabash, S., Lee, L. (2007) Increasing incidence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft-tissue infections: reconsideration of empiric antimicrobial therapy. *Am J Surg.*, 194: 606-610.



-Baba, Aïssa. F. (1999) Encyclopédie des plantes utiles: Flore d'Algérie et du Maghreb. Librairie Moderne-Rouiba., 46-47, 194 - 195.

-Bachir, Raho,G. (2017) Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus oils. Antimicrobial and antiooxidant activities of essential oil of some medicinal plants of my region www.researchgate.net/publication/319057411.

-Baerwolf, S., Geffers, C., Behnke, M. (2002) Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. SHEA 2016.

-Bakkali F., Averbeek S., Averbeek D., Idaomar M. (2008) Biological effects of essential oils. *Food Chemical Toxicology.*, 46 :446-475.

-Bakour S., Touati A., Sahli F., Ameer A.A., Haouchine D., Rolain J.M. (2013) Antibiotic resistance determinants of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Algeria. *Diagn.Microbiol. Infect. Dis.*, 76: 529-531.

-Balentine CW., Crandall PG., O'Bryan CA., Duong DQ., Pohlman FW. (2006) The pre and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science.*, 73: 413-421.

-Bankova, R ., Popova, T.P. (2017) Antimicrobial activity in vitro of aqueous extracts of Oregano (*Origanum vulgare* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *International current microbiology applied sciences.*, 3 :1-12.

- Baser, K. H. C. (2002.) Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure Appl. Chem.*, 74: 527–545.
- Baser, K. H., Tümen G., Tabanca, N. and Demirci, F. (2001) Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Satureja wiedemanniana* (Lallem.). *Velen. Z. Naturforsch.*, 56c : 731-738.
- Baser, K.H.C., Buchbauer, G. (2010) *Handbook of essential oils: Science, Technology, and Applications*. Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America., 994.
- Basset, Patrick., Amhis, Wahiba., Blanc, Dominique. S. (2015) Changing molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an Algerian hospital. *J Infect Dev Ctries.*, 9(2):206-209.
- Baudoux, D. (2000) *L'aromathérapie: se soigner par les huiles essentielles*. Edition Atlantica.
- Behbahani, B.A., Yazdi, F.T., Mortazavi, A., Zendeboodi, F., Gholian, M.M., Vasiee, A. (2013) Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. on food infection and intoxication microorganisms in vitro. *Journal of paramedical sciences.*, 4 :89-99.
- Béjaoui, A., Chaabane, H., Jemli, M., Boulila, A. & Boussaid, M. (2013) Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *J. Med. Food.*, 16(12): 1115-1120.
- Bekhoucha, S.N., Cady, A., Gautier, P., Itim, F., Donnio, PY. (2009) A portrait of *Staphylococcus aureus* from the other side of the Mediterranean sea: molecular characteristics of isolates from Western Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 28:553-555.
- Belaiche, P. (1979) *Traité de phytothérapie et d'aromathérapie*. Tome 1 : l'aromatogramme .éd. Maloine. Paris.
- Belhattab, R., Larous, L., Figueiredo, A.C., Santos, P. A. G., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2005) *Origanum glandulosum* Desf. Grown Wild in Algeria: Essential oil composition and glycosidic bound volatiles. *Flavour and Fragrance J.*, 20: 209-212.
- Beloued, A. (1998) *Plantes médicinales d'Algérie*. Office Des Publications Universitaires. Alger.

- Bendahou, M., Muselli, A., Grignon-Dubois, M., Benyoucef, M., Desjobert, J.M., Bernardini, A.F. & Costa, J. (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum glandulosum* Desf. essential oil and extract obtained by microwave extraction: Comparison with hydrodistillation. *Food Chem.*, 106: 132-139.
- Benjlali, B., Tantaoui-elarki, A and Ismaili-alaoui M. (1986) Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plant. Méd. Phytothér.*,155-167.
- Benjlali, B. (2004) Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement à la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante à la commercialisation.,17-59
- Benjlali, B., Tantaoui-Elaraki, A., Ismaïli-Alaoui, M. et Ayadi, A. (1986) Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie.*, 20 (2): 155-167.
- Benkeblia, N. (2005) Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*).,37 : 263-268.
- Bennadja, S., Tlili Ait Kaki, Y., Djahoudi, A., Hadeif, Y. and Chefrour, A. (2013) Antibiotic activity of the essential oil of laurel (*Laurus nobilis* L.) on eight bacterial strains. *Journal of Life Sciences.*, 7(8) : 814-819.
- Berrehal, D., Boudiar, T., Hichem, L., Khalfallah, A., Kabouche, A., Al-Freihat, A., Ghannadi, A., Sajjadi, E., Mehrabani, M., Safaei-Ghomi, J. & Kabouche, Z. (2010). Comparative composition of four essential oils of *Oregano* used in Algerian and Jordanian folk medicine. *Nat. Prod. Commun.*, 5: 957 – 960.
- Besombes, C. (2008) Thèse de Doctorat : Contribution à l'étude des phénomènes d'extraction hydro-thermomécanique d'herbes aromatiques, Applications généralisées. Université de La Rochelle. France.
- Betts, T.J. (2001) Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *J. Chromatogr.*, 936 :33-46.

- Bigendako, J.(2004) Identification et zonage des Eucalyptus globulus au rwanda.chemonics international inc. Projet adar.,1 :331-337.
- Billerbeck, V.G., Roques, C., Vaniere, P and Marquier, P. (2002) Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles., 3 :248-251.
- Bismuth ,R., Leclercq, R.(2000) Staphylococcus aureus et antibiotiques, in Précis de Bactériologie clinique. Ed ESKA, 611-616.
- Bondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Giuseppe, R. (1993) Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Sicilian aromatic plants. Flavour Frag J,8: 234-338.
- Bouamer, A., Bellaghit, M., Mollay Amara (2004) Mémoire master : Etude comparative entre l'huile essentielle de la Menthe vert et la Menthe poivrée de la région de ouargla. Université Ouargla, Ouargla, Algérie.
- Bouguenoun Wided (2016) Thèse de Doctorat : Étude de la résistance aux antibiotiques des bactéries incriminées dans les infections nosocomiales et leur dissémination dans l'environnement hospitalier de la région de Guelma. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Bouhaddouda N, Aouadi S, Labiod R (2016). ation of Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oil and Methanolic Extract of Origanum vulgare L. ssp. glandulosum (Desf.) Ietswaart from Algeria. International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research., 8(1), 104-112.
- Bouhaddouda. N. (2016) Thèse de Doctorat : Activités antioxydante et antimicrobienne de deux plantes du sol local : Origanum vulgare et Mentha pulegium. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Boukhatem MN., Ferhat MA., Kameli AK., Saidi F., Taibi H., Teffahi D. (2014) Valorisation de l'essence aromatique du Thym (Thymus vulgaris L.) en aromathérapie anti-infectieuse. International Journal of Innovation and Applied Studies ., 8(4), 1418-1431.
- Boulekbache-Makhlouf, L ., Slimani, S., Khodir, M. (2012) Total phenolic content, antioxidant and antibacteriel activities of fruits of Eucalyptus globulus cultivated in Algeria. Industrial crops and products.,41, 85-89.
- Bowles, E.J. (2003) Chemistry of aromatherapeutic oils. Allen and Unwin. ISBN 174114051X.

-Bowles, E.J. (2003) The chemistry of aromatherapeutic oils. 3rd Ed. Allen & Unwin, Australia, 257.

-Bricha, S., Ounine K, Oulkheir S, EL Haloui NE, Attarassi B. (2009) Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*. Revue tunisienne d'infectiologie., 2, 7-14.

-Bruneton, J. (1999) Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème édition, Ed. TEC et DOC, Paris.

-Brut, S. (2004) Essential oil : their antibacterial proprieties and potential applications in foods. International Journal of Food and Microbiology., 94, 223-253.

-Buchanan, B.B., Gruissem W. & Jones, R.L. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists: Rockville., MD, 1367.



-Camille, Delarras. (2007) Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Ed : Lavoisier., 339-354.

-CANDY, G. (1977) Thèse de Doctorat : Investigation into Chemical Composition and potential of a selected number of Rhodesian eucalyptus Unpublished Thesis, Univ of Rhodesia, Dept of Pharmacy.

-Canillac, N., and Mourey, A. (2001) Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. Food Microbiol., 18,261-268.

-Cavallo, J.D., De Mouy, D., Fabre, R, Garrabe, E., Armengaud, M. (1995-1996) *Pseudomonas aeruginosa* en pratique de ville : étude AFORCOPIBIO. Méd mal infect., 28, 258-259.

-Cetin, B., Cakmakci, S., Cakmakci R. (2011). The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. Turk agric for., 35, 145-154.

- Chalchat, J.K., Carry, L. P., Menut, C., Lamaty, G., Malhuret, R., Chopineau, J. (1997) Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.*, 9, 67-75.
- Chami, F. (2005) Thèse de doctorat : Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés., Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc.
- Chapuis, J-P. (1997). Connaître et utiliser favorablement les huiles essentielles.
- Chaudhry, N.M.A., Saeed, S., Tariq, P. (2007). Antibacterial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against Gram negative Bacilli. *Pakistan journal of botanic.*, 2, 609-613.
- Christere, N.M., Pierre, Michel, J.D., Fabrice, F. B., Chantal, M.(2014) Potential use of *Eucalyptus globulus* essential oil against *Phytophthora colocasiae* the causal agent of taro leaf blight. *Eur J Plant Pathol* DOI 10.1007/s10658-014-0457-y.
- Chung, K.I., Lim, T.H., Koh, Y., Song, J.H., Kim, W.S., Choi, J., Mand Aush, Y.H. (1992) Nosocomial pneumonia in medico-surgical intensive care unit. *J Korean Med Sci.*, 7,241-251.
- Clarke, S. (2008) *Chemistry of essential oil*. 1st edition ELSEVIER. British., 302
- Collin, G. (2000) Quelques techniques d'extraction de produits naturels. *Info-essences.*, 13, 4-5.
- Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie (CA-SFM 2013). Repéré à : <http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm/CASFM2013vjuin.pdf>.
- Couic-Marinier, F., Lobstein, A. (2013) Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques.*, 52 (525), 18-21.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000) Natural products (Secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiology.



- Dai, J., Mumper, R.J. (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules.*, 15, 7313–7352.
- Dali, A.A. (2015) Thèse de doctorat : Infections nosocomiales a bactéries multirésistantes (BMR) en réanimation adultes a l’EHUO: Profile épidémiologique, facteurs de risque et facteurs pronostiques. Université d’Oran 1 Ahmed BENBELLA, Oran, Algérie.
- Daroui-Mokaddem Habiba. (2011)Thèse: Etude phytochimique et biologique des especes *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololus* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* ET *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Daurel, C., Leclercq, R. (2008) L’antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires.*, 407, 81-90.
- Deans, G.C., Noble, C.R., Mac Pherson, A., Penzes, L., Imre, G.S., Hofecker, G. (1994) *Skalicky Ageing Series*. Facultas Press, Vienna., 2, 173.
- Debabza Manel (2015) Thèse de Doctorat : Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.
- Dioman, S.A. (2008) Thèse de Doctorat : Epidémiologie des entérobactéries de beta-lactamases à spectre elargi au CHU du Point. Université de Bamako, Mali.
- Djabou, N., Lorenzi, V., Guinoiseau, E., Andreani, S., Giuliani, M.C., Desjobert, J.M., Bolla, J.M., Costa, J., Berti, L., Luciani, A., Muselli A. (2013) Phytochemical composition of Corsican *Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxigenic pathogens. *Food Control.*, 30, 354-363.
- Djahida Souna (2011) Thèse de Doctorat : Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbe. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen, Algérie.

-Dong, Y., Chellius, M.K., Brisse, S., Kozyrovska, G., Tripllet, E.W. (2003) Comparisons between two *Klebsiella*: the plant endophyt *K.pneumoniae* 342 and clinical isolate *K.pneumoniae* MGH78578. *J Symbiosis.*, 35, 247-259.

-Dorman, H.J.D., Deans S.G. (2000) Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 308–316.

-Duraffourd, C., D’Hervicourt, L., Lappraz, J.C. (1990) *Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Elements thérapeutiques synergiques. 2ème édition* Masson (Paris), 87.

-Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schkeufer, K.H., Stackebrandt, E. (2006) *The Prokaryotes: Bacteria:Firmicutes, Cyanobacteria.* 3 eme éd. Springer, New-York., Vol 4



-EARS-Net. (2014) *Surveillance report: Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network.*

-Eckenrode, S., Bakullari, A., Metersky, M.L., Wang, Y., Pandolfi, M.M., Galusha, D., Jaser, L., Eldridge N. (2014) The Association between Age, Sex, and Hospital-Acquired Infection Rates: Results from the 2009–2011 National Medicare Patient Safety Monitoring System. *J. Infection Control and Hospital Epidemiology.*, 35, S3-S9.

-Edwards, A. M., Massey, R.C. (2011) How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream. *Trends Microbiol.*, 19,184-190.

-El Hanbali, F., Akssira, M., Ezoubeiri, A., Gadhi, C.E., Mellouki, F., Benhrraf, A., Blazquez, A.M.,Boira, H. (2009) Chemical composition and antibacterial activity of essential oil *Pulicaria odora.*, 99, 399-401.

-El Kalamouni, C. (2010) *Thèse de doctorat : Caractérisation chimiques et biologiques d’extraits de plantes aromatiques oubliées de Midi-Pyrénées.* Université de Toulouse, France.

-ELDRIDGE, K., DAVIDSON, J., HARWOOD, C., VAN WYCK, G. (1993) *Eucalyptus domestication and breeding.* Clarendon Press, Oxford, p288.

-Ellaissi, A., Hadj, S. K., Mabrouk, S., Khouja M. L., Chemli, Ret Harzallah -Skhiri F. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species essential oils. Food chemistry., 1427-1434.

-Elouennass, M., Sahnoun, I., Zrara, A., Bajjou, T. Elhamzaoui, S. (2008) Épidémiologie et profil de sensibilité des isolats d'hémoculture dans un service de réanimation (2002–2005). Médecine et maladies infectieuses., 38, 18-24.

-Eumkeb, G., Sakdarat, S. and Siriwong, S. (2010) Reversing β -lactam antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* with galangin from *Alpinia officinarum* Hance and synergism with ceftazidime. Phytomedicine ., 18, 40–45.

-Eyquem, A .,Montagnier.L. (2000) Traité de microbiologie clinique., p 238.



-Farhat, A. (2010) Thèse de doctorat :Vapo-Diffusion assistée par Micro-ondes : Conception, Optimisation et Application. Université de Gabés, Tunisie.

-Fernandez, X., Daniel, C.B. (1988) Analyse des arômes. Technique d'ingénieur Fluck, Hans. Medical Plants.W.Foulsham et Co Lid. Garneroj ; huiles essentielles, techniques d'ingénieur. ISBN 0-572-00996-8.

-Fernandez, X., Kerverdo, S., Dunach, E., Curelier, L. (2002) Les hétérocycles dans la chimie des atomes. L'actualité chimique.

-Flandrois,J.P., Carret.G. (1997) Bactériologie médicale. Press universitaire de Lyon., 209-210.

-Fourment, P., Roques, H. (1941) Répertoire des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. Documents et Renseignements Agricoles, Bull. 61, Algérie.

-Fraillery, D. (2001) La mise au point de pneumonie à *Pseudomonas aeruginosa* chez les souris et l'utilisation à des fins d'immunoprévention passive.

-Franchomme, P., Pénéol D. (1990) L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges., 445 .



-Gachkar, L., Yadegari, D., Rezaei, M.B., Taghizadeh, M., Astaneh, S.A., Rasooli I. (2007) Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem.*, 102, 898-904.

-Gangoué Piéboji, J., Koulla-Shiro, S., Ngassam, P., Adiogo, D., Njine, T., Ndumbe, P. (2004) Antimicrobial resistance of Gram-negative bacilli isolates from inpatients and outpatients at Yaounde Central Hospital, Cameroon. *International J. Infect. Dis.*, 8,147-154.

-Garnero, J. (1991) Phytothérapie-aromathérapie. *Encycl. Méd. Nat*, p :20.

-Garrity, G.M, Johnson, K.L, Bell, J and Searles, D.B. (2002) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second ed. Springer-verlag, New York., 60.

-Ghestem, A., Seguin, E., Paris, M. et Orecchioni, A.M. (2001) *Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique, Pharmacognosie, Phytothérapie, Homéopathie*. Ed. TEC et DOC, Paris.

-Gille, M., Zhao, J., An, M ?, Agboola, S. (2010) Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry.*, 119, 731-737.

-Girault M., Bougeon J. L'aromatogramme. *Cahier de biothérapie*, 1971; n°29.

-Gong, H.Y., Liu, W.H., LV, G.Y., Zhou, X. (2014) Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of china and pakistan. *Revistz Brasileira de Farmacognisia.*, 24, 25-32.

Grimont, F., Grimont, P.A.D. (2002) *Enterobacter* In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : The Proteobacteria, Partie B : The Gammaproteobacteria*) USA, Springer., 2, 661-671.

-Guba, R. (2001) Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potentiel. International Journal of Aromatherapy .,11, 76-83.

-GUIGNARD, J.L. (2001) Abrégé Botanique Systématique Moléculaire, 12Ed Révisée .MASSON.

-Guignard, J. L., Dupont, F. (2004) Botanique: Systématique moléculaire. 13ème éd. Masson., 237.

-Guiraud, J.P. (1998) Microbiologie alimentaire. Ed Dunod., 255.

-Gulluce, M., Şahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A., Ozkan H. (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. Food Chem., 103,1449–1456.

-Guneysel, O., Onur, O., Erdede, M., Denizbasi A. (2009) Trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in urinary tract infections. The Journal of Emergency Medicine., 36(4), 338-341.

-Gus, W., Krucke, M., Deanna, E., Grimes, P.H., Richard, M., Thai, D., Dang, M.D, (2009) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*–containing cutaneous abscesses of patients with HIV. American Journal of Emergency Medicine., 27, 344–347.



-Habi, S. (2010) Thèse de Doctorat : Etude de la Métallo-résistance et de l'Halo-tolérance des Entérobactéries Isolées des Eaux de Surface de la Région de Sétif. Université Ferhat ABBAS, Sétif, Algérie.

-Hart, K.J., Yanez-Ruiz, D.R., Duval, S.M., McEwan, N.R., Newbold, C.J. (2008) Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology., 147 ,8-35.

-Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Leon, G.M.G., Atte, V.W. (1998) Characterization of the action of selected essential oils on gram negative bacteria. J. Agric. Food Chem., 46, 3590-3595.

-Hélène, Brossard., Guy, Leyral ,Odette, Terry. (2008) Activités technologiques. Ed :Scérén. ,112-119.

-Hiramatsu, K. (2001) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* : a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases* ., 1,147-155.

-Ietswaart, J. H. (1980) A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae), chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf.. In *Leiden Botanical series 4*, Leiden University Press: Le Hague.

I

-Imtara, H., Elamine, Y., Lyoussi B. (2018) Honey antibacterial effect boosting using *Origanum vulgare* L. essential oil. *Evidence based complementary medicine*. ID 7842583., 14.

-INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE FORESTIERE. (1996) *La forêt Algérienne*. Éditer par–Bainem-Alger février –mars., 10.

J

-Jnaid, Y., Yacoub, R., Al Biski, F. (2016) Antioxidant and antimicrobial activities of *Origanum vulgare*. *International food research journal*., 23(4),1706-1710.

-Joffin, J.N., Leyral, G. (2001).*Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques*. 3ème Edition, Bordeaux : CRDP d'Aquitaine., 320.

-Johnson, A.P. (2001) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *J Antimicrob Chemother.*, 66 Suppl 4, 43–8.

-Joly-Guillou, M.L. (2004) *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in ICU. *Réanimation*., 13,185–189.



- Kahlmeter, G. (2003.) An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECOSENS Project. *J Antimicrob Chemother.*, 51, 69-76.
- Kakupa, D.K., Muenze, P.K., Byl, B, Wilmet, M.D. (2016) Etude de la prévalence des infections nosocomiales et des facteurs associés dans les deux hôpitaux universitaires de Lubumbashi, République Démocratique du Congo: cas des Cliniques Universitaires de Lubumbashi et l’Hôpital Janson Sendwe. *Pan. Afr. Med. J.*, 24: 275.
- Khadri, sihem. (2009) Mémoire Magister : Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de l'ail cultivé (*Allium sativum*) de l'est Algérien vis-à-vis de différentes souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie.
- Kesah, C., Ben Redjeb, S., Odugbemi, T.O., Boye, C.S., Dosso, M., Ndinya Achola, J.O., Koulla-Shiro, S., Benbachir, M., Rahal, K., Borg, M. (2003). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in eight African hospitals and Malta. *Clin Microbiol Infect.* ,9(2),153-156.
- Khan, R., Islam, B., Akram, M., Shakil, S., Ahmed, A., Manazir ali, S., Siddiqui, M., Khan, A U. (2009) Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical Origin. *Molecules.*, 14 , 586-597.
- Kintzios, S.E. (2002) Profile of the multifaceted prince of the herbs. In: Kintzios S.E. *Oregano : The Genera Origanum and Lippia*. Ed. Taylor & Francis, London., 3–8.
- Kokkini, S. (1996) Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species .In Padulosi S. [Ed.], *Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano*. CIHEAM Publication 12, Italy., 389.
- Kovats, E. (1965) Gas chromatographie characterisation of organics substances in the retention index system. *Advances in chromatography.*, Chapitre 7229-297.

-Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T.O., Yoshida, T., Shiota, S., Tsuchiya, T., Tsuchiya, T., Hatano, T. (2006) Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* ., 70, 1423–31.



-Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P., Nychas, G.J.E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, 9, 453–462.

-Lamendin, H. (2004) Huiles essentielles en diffusion atmosphérique. *Chir. Dent. France.*, 1185, 78-80.

-Lee, K.G., Shibamoto, T. (2001) Antioxidant activities of volatile components isolated from *Eucalyptus* species. *J. Sci. Food Agr.*, 81, 1573-1597.

-Le Loir, Y., Gantier, M. (2010). *Staphylococcus aureus*. Lavoisier., 1-3.

-Lenotary, S.J., Hajslova, J. (2002) Application of gaz chromatography in food analysis. *Trends in analytical chemistry.*, 21 ,686-697.

-Liolios, C.C., G ortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I. (2009) Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *origanum dictamnus* L., 12 ,77-83.

-Lucchesi, M.E. (2005) Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et chimie. Université de la réunion, faculté des sciences et technologies. France.



-Mahamat, A., Lavigne, J.P., Bouziges, N., Daurès, J.P., Sottob, A. (2006) Profils de résistance des souches urinaires de *Proteus mirabilis* de 1999 à 2005 au CHU de Nîmes. *Pathologie Biologie.*, 54 , 456-461.

-Mahmoudi, Y. (1990) *La thérapeutique par les plantes communes en Algérie*. Palais du livre, Blida.

-Manika, N., Chanotiya, C.S., Negi, M.P.S., Bagchi, G.D. (2013) Capious shoots as a potential source for the production of essential oil in *Eucalyptus globulus*. *Industriel crops and products.*, 46, 80-84.

-Mastouri, M., Nour, M., Ben Nejma, M., Bouallegue, O., Hammami, M., Khedher, M. (2006) Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline: détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides. *Path. Biol.*, 54, 33-36.

-Mayachiew, P., Devahastin, S. (2008) Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. *Food Science and Technology.*, 41, 1153-1159.

-Mehani, Mouna., Ladjel, Segni. (2014) Biological Activity of Essential Oil of *Eucalyptus Camendulensis* on Some Fungi and Bacteria. *Journal of Engineering Research and Applications.*, 4, 71-73.

-Mesli, E. (2014) Thèse de doctorat : Etude multicentrique de la résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter baumannii*. Université Aboubekr Belkaid-Tlemcen (Algérie).

-Mesli, E., Berrazeg, M., Drissi, M., Bekkhoucha, S.N., Rolain, J.M. (2013) Prevalence of carbapenemase-encoding genes including New Delhi metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter* species, Algeria. *Int J Infect Dis.*, 17, 739–43.

-Messai, L., Achour, W., Ben Hassen, A. (2007) Profil épidémiologique des entérobactéries isolées chez des patients neutropéniques. *Pathologie Biologie.*, 55, 230-234.

-Miguel, M.G., Figueiredo, C., Costa, M.M., Martins, D., Duarte, J., Barroso, J. G., Pedro L.G. (2003) Effect of the volatile constituents isolated from *Thymus albicans*, *T. mastichina*, *T. carnosus* and *T. capiata* in sunflower oil. *Nahrung Food.*, 47 (6), 397-402.

-Modeste, L.S., Marie, A.B.B., Séverin, T.N., Lile, C. N. M., Pierre, M. J. D., Fabrice, F. B., Chantal, M. (2014) Potential use of *Eucalyptus globulus* essential oil against *Phytophthora colocasiae* the causal agent of taro leaf blight. *Eur J Plant Pathol* DOI 10.1007/s10658-014-0457-y.

-Mulyaningsih, M, Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, Jurgen., Wink, M. (2010) Synergistic properties of the terpenoids armadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine.*, 17 , 1061-1066.



-Naganuma, M., Hirose, S., Nakayama, Y., Nakajima, K., Someya T. (1985) A study of the phototoxicity of lemon oil. *Arch. Dermatol. Res.*, 278, 31-36.

Nathalie, K. (2016) Thèse de Doctorat : Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora* : qualité, efficacité et toxicité. UNIVERSITE DE LORRAINE, Nancy, France.

-Nixon, M., McCaw, M. (2001) *The Compleat distiller*. New Zealand: The Amphora Society.

-Nyaledome, A.I. (2016) Thèse de Doctorat : *Pseudomonas aeruginosa* : Epidémiologie et état actuel des résistances à l'hôpital militaire d'instruction Mohamed V. Université Ribat, Maroc.

O

-Oliveira, D.C., Tomasz, A., Lencastre H. (2002) Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet Infect. Dis.*, 3, 180-189.

-Ouchenane, Z., Smati, F., Rolain, J M., Raoult, D. (2011) Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Algeria. *Pathol. Biol.*, 59, 129132.

P

-Paolini, J. (2005) Thèse de doctorat : Caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/MS(IE/IC) et RMN du carbone 13 de *Citrus albidus* et deux *Asteraceae* endémique de corce *Eupatorium subsp Corsicum* et *Doronicum corsicum*. Italy.

-Paris, M., Hurabielle, M. (1981) *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie) Tome*. Ed. Masson., 339.

-Paster, N., Menasherov, M., Ravid, U., Juven, B. (1995). Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *J of Food Protection.*, 58, 81 - 85.

-Peron, L., Richard, H. (1992) *Epices et aromates, techniques et documentations* Lavoisier.

-Pibiri, M.C. (2005) Thèse de doctorat : Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. École polytechnique fédérale de Lausanne, France.

-Pichersky, E., Noel, J.P., Dudareva, N. (2006) Biosynthesis of plant volatils : nature diversity and ingenuity. *Science.*, 311, 808-811.

-Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Uberegger, E., Conte, L. S. (2002) Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *Salvia fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *Origanum indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *J. Science of FoodandAgriculture.*, 82, 1645-1651.

-Podschun, R., Fischer, A., Ullman, U. (2000) Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol.*, 49, 115-119.

-Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D. (2010) *Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université.*



-Qassimi, L. (2010) Thèse de doctorat : Épidémiologie des infections nosocomiales en milieu de réanimation (A propos de 147 cas). Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Fes, Maroc.

-Quézel, P., Santa S. (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

-Quezel, P., Santa, S. (1963) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridoniales. Tome II. Ed. CNRS, Paris.

-Qujeq, D., Davary, S., Moazzi, Z. & Mahjoub, S. (2011) Effect of *Urtica dioica* leaf extract on activities of nucleoside diphosphate kinase and acetyl coenzyme, a carboxylase, in normal and hyperglycemic rats. *Afr J Pharm and Pharmaco.*, 5,792-796.



- Rahili, G. (2002) Les huiles essentielles et leurs intérêt. La forêt algérienne n°4. Institut national de la recherche forestière. Bainem, Alger.
- Ramdani-Bouguessa, N., Bes, M., Meugnier, H., Forey, F., Reverdy, M.E., Lina ,G., et al (2006) Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains resistant to multiple antibiotics and carrying the Panton-Valentine leukocidin genes in an Algiers hospital. Antimicrob Agents Chemother., 50, 1083-1085.
- Rasheed, M.U., Ahmed, Z. (2010) Phenotypic methods of greater accuracy to detect the mecA gene product for the recognition of MRSA in resource constraint settings. Asian Paci J Tropic Med., 741-744.
- Rebiahi, S.A. (2012) Thèse de doctorat : Caracterisation de souches de Staphylococcus aureus et étude de Leur antibio-resistance au niveau du Centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Université Abou Baker Belkaied, Tlemcen, Algérie.
- Rebiahi, S.A., Abdelouahid, D.E., Rahmounb, M., Abdelali, S., Azzaoui, H. (2011) Emergence of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). Med Mal Infect.41:646-651 Reece RJ (2004). Analysis of Genes and Genomes, John Wiley & Sons, Ltd, England., 153-182.
- Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques (Janvier à Décembre 2016) Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques, 17ème rapport. Algérie. Repéré à : <http://www.sante.dz/aarn/documents/pdf/rapport17.pdf>
- Rhayour, K. (2002) Thèse de doctorat : Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur Esherichia coli, Bacillus subtilis et sur Mycobacterium phlei et Mycobacterium fortuitum. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc.
- Ruberto, G., Baratta, M. T. (2000) Afitioxidant activity of selected essential oil components in two lipids model systems. Food Chmistry., 69, 167 – 174.



-Saffidine, Karima. (2015) Thèse de Doctorat : Etude analytique et biologique des flavonoïdes extraits de *Carthamus caeruleus* L. et de *Plantago major* L. Université Farhat Abbas, Sétif, Algérie.

-Sahu, M.K., Siddharth, B., Choudhury, A., Vishnubhatla, S., Singh, S.P., Menon, R., Kapoor, P.M., Talwar, S., Choudhary, S., Airan, B. (2016) Incidence, microbiological profile of nosocomial infections, and their antibiotic resistance patterns in a high volume Cardiac Surgical Intensive Care Unit. *Ann. Card. Anaesth.*, 19, 281-287.

-Salle, J.L., Pelletier J. (1991) Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche., 19-45.

-Sasikala, S., Kalaimathi, J. (2014) Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Eucalyptus* sp leaf extract against clinical pathogens. *International journal of institutional pharmacy and life sciences*. ISSN :2249-6807.

-Satrani, B., Fougrach, H., Bourkhiss, B., Bousta, D., Talbi, M. (2007). Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.*,146, 85-96.

-Scheffer, J.J.C. (1996) Various methods for the isolation of essential oils. *Phytother. Res.*, 10:S6-S7.

-Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., Van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W. (2010) Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother.*, 65: 601–604.

-Sefraoui, I. (2015) Thèse doctorat : Etude de la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de différents hôpitaux de l'ouest algérien. Université Abou Baker Belkaïed- Tlemcen (Algérie).

-Seguin, E., 2001. Le préparateur en pharmacie « Botanique - Pharmacognosie - Phytothérapie Homéopathie ». Ed. O.P.U, Alger., 208

- Selvakumar, P., Edhaya, N.B., Dprakash, S. (2012) Studies on the antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globulus*. *Asian pacific journal of tropical biomedicine.*, 715-719.
- Semra, I., Benmerache, A., Chibani, S., Kabouche, A., Abuhamdah, S., Kabouche Z. (2013) Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Origanum glandulosum* Desf. from Algeria. *Der Pharmacia Lettre.*, 5(3), 381-385.
- Sibanda, T., Okoh, A. I. (2007) The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African Journal of Biotechnology.*, 6(25), 2886-2896.
- Sijelmassi, A. (1991). *Les plantes médicinales du Maroc*. 2^{ème} éd. Le fenec.
- Skoula, M., Gotsiou, P., Naxakis, G., Johnson C.B. (1999) A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochemistry.*, 52, 649–657.
- Smith, C.K., Moore, C.A., Alahi, E.N., Smart, A.T., Hotchkiss, S.A. (2000) Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde and cinnamic alcohol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 168, 189-99
- Spada, P., Perrino P. (1996) Conservation of *Oregano* species in national and international collections: an assessment. In: *Oregano: proceedings of the IPGRI International workshop on Oregano*, 8–12 May. Valenzano, Italy., 14–23.
- Sroka, Z. (2005). Antioxidative and Antiradical properties of plant phenolics. *Z. naturforsch C* 60, (11-12): 833-843.
- Surk, K.I., Nielsen P.V. (2003) Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal Applied Microbiology.*, 99: 665-674.

T

- Tenscher, E., Anton, R., Lobstein, A. (2005) Plantes aromatiques. Epices, aromates, condiments et huiles essentielles. Edition Tec&doc., 3-50/121-124.
- Touaitia, R., Boutefnouchet, N., Djahoudi, A. (2015) Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and/or intermediate susceptibility to vancomycin isolated from private laboratories in Annaba "Algeria". *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.*, 7,780-786.
- Touaitia, R. (2015) Thèse de Doctorat : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline : Emergence et mécanismes de résistance. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

V

- Ultee, A., Kets, E.P.W., Smid E.J. (1999) Mechanisms of action of carvacrol on the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Appl. Microbiol.*, 65(10), 4606-4610.
- Ultee, A., Smid, E.J. (2001) Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 373-378.
- Uz Zaman, T., Aldrees, M., Al Johani, S.M., Alrodayyan, M., Aldughashem, F.A., Balkhy, H.H. (2014) Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. *Int. J. Infect. Dis.*, 28,186–92.



-Valnet, J. (1984) Aromathérapie. Traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. Editeur. Paris, 544.

-Valnet, J. (2003) Les huiles essentielles, une santé toute naturelle. Phytothérapie de la recherche à la pratique., 1(1): 12.

-Van Den Dool, H., Kratz, P.D.A. (1963) Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography J. Chromatogr., 11, 463-471.

-Vokou, D., Kokkini, S., Bessiere, J. M. (1993) Geognaphic variation of Greek Oregano (*O. vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. Biochem. System. Ecol., 21, 287-295.



-Waller, S.B., Madrid, I.M., Ferraz,V., Picoli,T. (2016) Cytotoxicity and anti-sporothix brasiliensis activity of the *Origanum majorana* Linn.oil. Brazilian journal of microbiology., 47,896-901.

-Wichtel, M., Anton R. (1999) Plantes thérapeutiques: tradition, pratiques officinales, science et thérapeutiques. Ed. Tec et Doc.

-Wu, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Yan, J.J. (2007) Prevalence of plasmid-mediated quinolones resistance determinants QnrA, QnrB, and QnrS among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese hospital., 51(4), 1223-1227.

Y

-Yahyaoui, N. (2005) Thèse de Magister : Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de Menthe Spicata L sur *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera, Bostrychidae) et *Tribolium confusum* (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae). INA, El-Harrach, Algérie.

-Yotova, I., Ignatova-Ivanova, Ts. (2015) In vitro study of antibacterial activity of *Origanum vulgare*. International journal of research studies in biosciences., 3, 65-69.

Z

-Zaika, L.L. (1988) Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. Journal of food safety., 9(2), 97-118.

-Zani, F., Massimo, G., Benvenuti, S., Bianchia, A., Albasinia, A., Melegari, M., Vampa, G., Bellotti, A., Mazza, P. (1991) Studies on the genotoxicity of essential oils with *Bacillus subtilis* rec-Assay and *Salmonella* /Microsome Reversion assay. *Planta Medica*., 51, 237-241.

-Zemmouri, H. (2015) Thèse de Doctorat : Etude des activités biologiques et effets comparatifs de *Borago officinalis* & *Urtica dioica* sur l'inflammation bronchique dans un modèle d'asthme expérimental chez les rats de la souche wistar. Université Badji Mokhtar, Annaba, Algérie.

-Zenasni Leila. (2014) Thèse de doctorat : Etude du polymorphisme chimique des huiles essentielles de *Thymus satureioides* Coss et d'*Origanum compactum* Benth du genre *Nepta* et évaluation de leur propriété antibactérienne. Université Mohammed-Agdal, Rebat. Maroc.

-Zenati, K., Touati, A., Bakour, S., Sahli, F., Rolain, J.M. (2015) Characterization of NDM-1 and OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* isolates from inanimate surfaces in hospital environment in Algeria. *J. Hosp. Infect.*, 92,19-26.

-Zogheib, E., Dupont, H. (2005) *Entérobactéries multirésistantes*. Elsevier SAS., 153-165.

AUTRES

<https://www.google.dz.soin-et-nature.com%2Fles-differentes-techniques-pour-obtenir-des-huiles-essentielles>.

<https://www.google.dz/ huile-essentielle2013.e-monsite.com%2Fpages%2Fi-1%2Fcat>.

<http://www.pranarom.com/informations/huiles-essentielles-footer-a>.

ANNEXES

Tableau 5: Famille des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour *S.aureus*.

| Famille | Antibiotique | Abréviation | charge du disque | Diamètres critiques | |
|----------------|-----------------|-------------|------------------|---------------------|------|
| | | | | S | R |
| Bêtalactamines | Pénicilline G | P | 6µg | ≥ 29 | < 29 |
| | Oxacilline | OX | 1µg | ≥ 20 | < 20 |
| | Céfoxitine | FOX | 30µg | ≥ 27 | < 25 |
| Aminosides | Kanamycine | K | 30UI | ≥ 15 | < 13 |
| | Amikacine | AK | 30µg | ≥ 15 | < 13 |
| | Gentamicine | GN | 15µg | ≥ 20 | < 20 |
| Macrolides | Erythromycine | E | 15UI | ≥ 22 | < 19 |
| | Lincomycine | L | 15µg | ≥ 21 | < 17 |
| | Pristinamycine | RP | 15µg | ≥ 22 | < 9 |
| Glycopeptides | Vancomycine | Va | 30µg | ≥ 17 | - |
| Cyclines | Tétracycline | TE | 30UI | ≥ 23 | < 21 |
| Autres | Ofloxacine | OFX | 5µg | ≥ 22 | < 22 |
| | Chloramphénicol | C | 30µg | ≥ 23 | < 23 |
| | Rifampicine | RF | 30µg | ≥ 29 | < 24 |
| | Fosfomycine | FOS | 50µg | ≥ 14 | < 14 |
| | Acide fusique | FC | 10µg | ≥ 24 | < 24 |

Tableau 6: Famille des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour les entérobactéries.

| Famille | Antibiotique | Abréviation | charge du disque | Diamètres critiques | |
|----------------|------------------------------------|-------------|------------------|---------------------|------|
| | | | | S | R |
| Bêtalactamines | Amoxicilline | AMX | 25µg | ≥ 21 | < 14 |
| | Ticarcilline | TIC | 75µg | ≥ 22 | < 18 |
| | Imipénème | IPM | 10µg | ≥ 24 | < 17 |
| | Amoxicilline+Acide clavulanique | AMC | 10µg | ≥ 21 | < 14 |
| | Céfotaxime | FOX | 30µg | ≥ 22 | <15 |
| | Céfotaxime | CTX | 30µg | ≥ 26 | < 23 |
| | Céftazidime | CAZ | 30µg | ≥ 26 | < 19 |
| Aminosides | Amikacine | AK | 30µg | ≥ 17 | < 15 |
| | Gentamicine | GN | 15µg | ≥ 18 | < 16 |
| Quinolones | Acide nalidixique | NA | 30µg | ≥ 20 | < 15 |
| | Ciprofloxacine | CIP | 5µg | ≥ 25 | < 22 |
| Autres | Fosfomycine | FOS | 50µg | ≥ 14 | < 14 |
| | Co-trimoxazole | COT | 25µg | ≥ 16 | < 10 |
| | Colistine | CS | 50µg | ≥ 15 | ≥ 15 |

Tableau 7: Famille des antibiotiques testés et leurs diamètres critiques pour *Pseudomonas*.

| Famille | Antibiotique | Abréviation | charge du disque | Diamètres critiques | |
|----------------|----------------|-------------|------------------|---------------------|------|
| | | | | S | R |
| Bêtalactamines | Ticarcilline | TIC | 75µg | ≥ 22 | < 18 |
| | Imipénème | IPM | 10µg | ≥ 24 | < 17 |
| | Aztréonam | ATM | 30µg | ≥ 27 | < 19 |
| | Pipéracilline | PIP | 30µg | ≥ 18 | < 12 |
| | Céftazidime | CAZ | 30µg | ≥ 19 | < 19 |
| Aminosides | Amikacine | AK | 30µg | ≥ 17 | < 15 |
| | Gentamicine | GN | 15µg | ≥ 16 | < 16 |
| | Tobramycine | TOB | 10µg | ≥ 16 | < 16 |
| Quinolones | Ciprofloxacine | CIP | 5µg | ≥ 25 | < 22 |
| Autres | Fosfomycine | FOS | 50µg | ≥ 14 | < 14 |
| | Colistine | CS | 50µg | ≥ 15 | ≥ 15 |

Tableau 8 : Provenance des souches sélectionnées selon le sexe, l'âge et la nature des prélèvements.

| Souches | Sexe | Age | Nature de prélèvements | Service | Espèce identifiée |
|---------|-------|-----|------------------------|---------------|-------------------|
| BM1 | Femme | 56 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM2 | Femme | 45 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM3 | Homme | 35 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM4 | Homme | 25 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM5 | Homme | 45 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM6 | Femme | 69 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM7 | Homme | 47 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |

| | | | | | |
|------|--------|-------|-------|---------------|---------------------|
| BM8 | Homme | 53 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM9 | Femme | 69 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM10 | Homme | 27 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM11 | Homme | 17 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM12 | Femme | 55 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM13 | Femme | 45 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM14 | Homme | 70 | Urine | Urologie | <i>S.aureus</i> |
| BM15 | Femme | 42 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM16 | Femme | 35 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM17 | Femme | 52 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM18 | Homme | 61 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM19 | Femme | 54 | Pus | Grands brûlés | <i>S.aureus</i> |
| BM20 | Femme | 27 | Urine | Gynécologie | <i>E.coli</i> |
| BM21 | Homme | 59 | Urine | Gynécologie | <i>E.coli</i> |
| BM22 | Femme | 51 | Urine | Urologie | <i>E.coli</i> |
| BM23 | Femme | 29 | Pus | Gynécologie | <i>E.coli</i> |
| BM25 | Homme | 47 | Urine | Urologie | <i>K.pneumoniae</i> |
| BM26 | Femme | 58 | Pus | Gynécologie | <i>K.pneumoniae</i> |
| BM27 | Homme | 60 | Urine | Urologie | <i>K.pneumoniae</i> |
| BM28 | Femme | 39 | Pus | Gynécologie | <i>K.pneumoniae</i> |
| BM29 | Enfant | 3 ans | Urine | Pédiatrie | <i>P.mirabilis</i> |
| BM30 | Enfant | 4 ans | Urine | Pédiatrie | <i>P.mirabilis</i> |
| BM31 | Femme | 38 | Urine | Urologie | <i>P.mirabilis</i> |
| BM32 | Femme | 52 | Urine | Urologie | <i>P.mirabilis</i> |
| BM33 | Homme | 58 | Pus | Grands brûlés | <i>P.aeruginosa</i> |
| BM34 | Femme | 62 | Pus | Grands brûlés | <i>P.aeruginosa</i> |
| BM35 | Homme | 70 | Pus | Grands brûlés | <i>P.aeruginosa</i> |
| BM36 | Homme | 42 | Pus | Grands brûlés | <i>P.aeruginosa</i> |
| BM37 | Homme | 59 | Pus | Grands brûlés | <i>P.aeruginosa</i> |

**ANNEXE DES
PUBLICATIONS
SCIENTIFIQUES**

Production scientifique :

Publications Internationales :

M.Bouras, N. Boutefnouchet Abbaci, S. Bennadja (2016) Antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globulus* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. International journal of pharmacognosy and phytochemical research 8(10) ;1717-1721.

M.Bouras, N. Boutefnouchet Abbaci, S. Bennadja (2016) In vitro Antibacterial proprieties of aqueous extract and essential oil of *Eucalyptus globulus* against multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients. Der Pharma Chemica 8(15) ;108-111.

Communications Internationales :

- 27^{ème}- forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB par la communication intitulée « étude de l'effet antibactérien des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* sp de l'est algérien sur *Staphylococcus aureus* »
- IV^{ème} congrès international de biotechnologie et valorisation des bio ressources par la communication intitulée « étude de l'effet antibactérien des extraits aqueux d'*Eucalyptus globulus* sp de l'est algérien sur *Staphylococcus aureus* »
- 3^{ème} journées internationales de chimie organiques de Annaba-JICOA'15 par la communication intitulée « Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Laurus nobilis* sur *Pseudomonas aeruginosa* »
- 42^{ème} journées d'études des équilibres entre phases université Paris Descartes par la communication intitulée « étude de l'activité antibactérienne d'une plante aromatique de l'est Algérien sur *Staphylococcus aureus* »
- IIV^{ème} congrès international de biotechnologie et valorisation des bio ressources par la communication intitulée « Antibacterial activity of aqueous extract and essential oil of *Eucalyptus globulus* against *Klebsiella pneumoniae* nosocomial strains »
- 1^{ère} Conférence internationale d'infectiologie d'Annaba par communication intitulée « Etude de l'activité antibactérienne des extraits aqueux d'*Origanum vulgare* de l'est algérien contre des souches de *Staphylococcus aureus* issues des infections urinaires »

RÉSUMÉS

Résumé

Dans le cadre de la valorisation des plantes médicinales et aromatiques de l'est algérien, nous avons entrepris un travail qui consiste à évaluer l'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits aqueux obtenus à partir des feuilles d'*Eucalyptus globulus* et *Origanum vulgare* vis-à-vis des souches multi résistantes aux antibiotiques.

Durant notre travail expérimental, nous avons collecté un total de 102 souches d'origine cliniques à partir de différents établissements hospitaliers de la ville d'Annaba, sur une période de 18 mois allant de mars 2013 à janvier 2015.

Les résultats d'identification bactérienne ont indiqué que sur les 102 souches collectées : 40 appartient au Gram positif dont 34 souches répondent aux profils numérique de l'espèce *S.aureus* et 62 appartiennent au Gram négatif dont 45 étaient des entérobactéries (19 *E.coli*, 15 *K.pneumoniae*, 1 *K.oxytoca*, 6 *P.mirabilis*, 4 *P.vulgaris*) ainsi 17 appartenant au genre *Pseudomonas* (14 *P.aeruginosa* et 3 *P.fluorescens*).

Les résultats de l'antibiogramme ont montré des taux de résistance bactérienne très élevés pour l'ensemble des souches isolées, 42% des souches de *S.aureus* ont été résistantes à la méthicilline, 87% et 73% respectivement des souches ont montré une résistance élevée à la gentamycine et l'amikacine. Ainsi que 15% des isolats avaient une résistance vis-à-vis la vancomycine.

La détermination des niveaux de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* montre une résistance considérablement élevée vis-à-vis les β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones.

Les pourcentages de la résistance vis-à-vis l'imipénème pour les souches d'entérobactéries et *P.aeruginosa* étaient respectivement de l'ordre de 38% et 40%, ces taux sont aussi alarmants, vue la rareté de ce phénotype en Algérie ainsi que dans la monde.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été testée sur 36 souches cliniques multi résistantes et quatre souches de référence par la méthode de diffusion en disque, la méthode des puits et la méthode des micro atmosphères. Les CMI et CMB ont été obtenues par la méthode de dilution en milieu solide.

Les résultats de l'activité antibactérienne sont exprimés sous formes de diamètres de zones d'inhibition. Les huiles essentielles ont révélé un pouvoir inhibiteur important vis-à-vis la

totalité des souches testées. Les rapports CMI/CMB obtenus par la méthode de dilution en milieu solide ont montré que les huiles essentielles étudiées sont dotées d'une action bactéricide vis-à-vis des souches testées.

La détermination de l'effet antibactérien des extraits aqueux a été expérimentée par la méthode de diffusion en disque. Les extraits aqueux étudiés ont été particulièrement efficaces contre toutes les souches bactériennes testées.

A l'issu de ce travail nous pouvons conclure que les huiles essentielles et les extraits aqueux d'*E.globulus* et *O.vulgare* de l'est algérien pourraient être exploités comme des phytomédicaments pour soulever le problème des infections causées par des bactéries multi résistantes aux agents chimiques disponibles.

Mots clés: activité antibactérienne, huiles essentielles, extraits aqueux, *Eucalyptus globulus*, *Origanum vulgare*.

Abstract

In the context of the valorisation of medicinal and aromatic plants in eastern Algeria, we have undertaken a study which consists in evaluating the antibacterial activity of essential oils and aqueous extracts obtained from the leaves of *Eucalyptus globulus* and *Origanum vulgare* against multidrug resistant strains of antibiotics.

During our experimental work, we collected a total of 102 strains of clinical origin from various hospital establishments in the city of Annaba over an 18month period from March 2013 to January 2015.

Bacterial identification results indicated that of the 102 strains collected: 40 belongs to Gram positive, of which 34 strains respond to the numerical profiles of the species *S. aureus* and 62 belongs to Gram negative, of which 45 were Enterobacteria (19 *E. coli*, 15 *K. pneumoniae*, 1 *K. Oxytoca*, 6 *P. mirabilis*, 4 *P. vulgaris*) thus 17 belong to the genus *Pseudomonas* (14 *P. aeruginosa* and 3 *P. fluorescens*).

The antibiogram results showed very high rates of bacterial multiresistance for all isolated strains, 42% of *S. aureus* strains were methicillin-resistant, 87% and 73% respectively of strains showed a High resistance to gentamycin and amikacin. As well as 15% of isolates had a sensitivity to voncomycine.

The determination of antibiotic resistance levels of enterobacteria and *Pseudomonas aeruginosa* showed a significantly high resistance to β -lactamines, aminosides, and fluoroquinolones.

The percentages of resistance to imipenem for strains of Enterobacteria and *P. aeruginosa* were respectively in the order of 38% and 40%, these rates are also alarming, in view of the rarity of this phenotype in Algeria and in the world.

The antibacterial activity of essential oils was tested on 36 multidrug-resistant clinical strains and four reference strains by the disc diffusion method, the well method, and the Microatmosphere method. The MICS and CMB were obtained by the solid-medium dilution method.

The results of antibacterial activity are expressed in the form of diameters of inhibition zones. Essential Oils revealed a significant inhibitory power to all strains tested. The CMI/CMB

ratios obtained by the solid-medium dilution method have shown that the essential oils studied are equipped with bactericidal action against the strains tested.

The determination of the antibacterial effect of aqueous extracts has been tested by the disc diffusion method. The aqueous extracts studied were particularly effective against all bacterial strains tested.

At the end of this study we can conclude that the essential oils and aqueous extracts of *Eucalyptus globulus* and *Origanum vulgare* of eastern Algeria could be exploited as phytomedicament to raise the problem of infections caused by multidrug-resistant bacteria to chemical agents available.

Keyword : Antibacterial activity, essential oils, aqueous extracts, *Eucalyptus globulus*, *Origanum vulgare*.

ملخص

في إطار ترمين النباتات الطبية العطرية للشرق الجزائري ' قمنا بإنجاز هذا العمل الذي يهدف الي تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيوت العطرية والمستخلصات المائية المتحصل عليها من أوراق *Eucalyptus globulus* و *evulgar* و *Origanum* ضد سلالات متعددة المقاومة للمضادات الحيوية.

خلال عملنا التجريبي قمنا بجمع 102 سلالة سريرية من مختلف المؤسسات الاستشفائية لولاية عنابة خلال 18 شهر من مارس الي جانفي 2015.

اشارت نتائج تحديد سلالات البكتيريا الي ان 102 سلالة التي تم جمعها: 40 ينتمي الي *marG fisop* منها 34 تحديديها يشير الي انها *Sthaphyloccus aureus* و 62 تنتمي الي *Gram négatif* منها 45 سلالة من *entérobactéries* و 17 الباقية تنتمي إلي *Pseudomonas*.

نتائج اختبار المقاومة للمضادات الحيوية وضحت نسب مرتفعة من المقاومة للسلالات المعزولة حيث 42 بالمئة من *Sthaphyloccus aureus* مقاومة ل *méthicilline* و 87.73 بالمئة علي التوالي مقاومة ل *Gentamycine* و *Amikacine* و كذلك 15 بالمئة كانت مقاومة ل *Vancomycine*.

مستويات المقاومة للمضادات الحيوية ل من *entérobactéries* و *Pseudomonas* وضح مقاومة تعتبر مرتفعة لكل من *senimatcalateB* و *aminosides* و *fluoroquinolones*.

نسب المقاومة ل *imipnème* لكل من *entérobactéries* و *Pseudomonas* كانت علي التواب 38 و 40 بالمئة وهي نسب جد مرتفعة لان هذا النوع من المقاومة نادر في الجزائر والعالم.

النشاط البكتيري للزيوت العطرية جرب علي 36 سلالة سريرية و اربعة سلالات مرجعية بواسطة طريقة الانتشار القرصي ' طريقة الثقوب وطريقة الاجواء الصغيرة.

التراكيز المثبطة الدني والتراكيز القاتلة الدني تم الحصول عليها بطريقة التخفيف المتسلسل في وسط صلب.

نتائج النشاط المضاد للبكتيريا تم تقديرها من خلال حساب قطر تثبيط لنم البكتيريا. الزيوت العطرية اظهرت مفعول تثبيط نمو مهم ضد جميع السلالات المختبرة.

نسب التراكيز المثبطة الدني علي التراكيز القاتلة الدني المتحصل عليها بطريقة التخفيف المتسلسل في وسط صلب ' اظهرت ان الزيوت العطرية المدروسة تكتسب عمل مثبط قاتل للنمو اتجاه جميع السلالات المختبرة.

البحث عن الفعل المضاد للبكتيريا للمستخلصات المائية تم تجريبه بطريقة الانتشار القرصي حيث المستخلصات المائية المدروسة أثبتت فعاليتها ضد السلالات المستخدمة في التجربة.

وفي نهاية هذا العمل نستطيع ان نختم بان الزيوت العطرية والمستخلصات المائية لكل من *tusEucalyp globulus* و *Origanum vulgare* للشرق الجزائري يمكن استغلالها كأدوية عشبية لحل مشكل الالتهابات الناتجة عن البكتيريا متعددة المقاومة للمواد الكيميائية المتوفرة.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للبكتيريا، الزيوت العطرية، المستخلصات المائية، *ptuEucalys globulus*

Origanum vulgare

Antibacterial Activity of Essential Oil and Aqueous Extract of *Eucalyptus globulus* Against Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus*

Marwa Bouras^{1*}, Naffisa Boutefnouchet Abbaci¹, Salima Bennadja²

¹Faculty of Nature and Life Sciences, Departement of Biochemistry, Biochimie and applied Microbiology Laboratory, University Badji Mokhtar of Annaba 23000, Algeria

²Medecin faculty, Departement of pharmacy, University Badji Mokhtar of Annaba 23000, Algeria

Available Online: 15th October, 2016

ABSTRACT

Objective: Our work was focused on the study of antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globulus* leaves, plant that is widespread in the Algerian traditional pharmacology.

Methods: The essential oil of this plant was obtained by hydrodistillation method and aqueous by decoction in volume of distilled water. The extracts were subjected to screening of their possible antibacterial activity in vitro against eleven strains of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* and eight strains methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated of different hospitalized patients, using agar disc diffusion method. Both minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration by agar dilution method. **Results:** The essential oil has demonstrated a considerable antibacterial activity against all strains tested with best inhibition zone equal to 16,0±1,41mm for methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* and 15,5±0,70mm for methicillin resistance *S. aureus*. Studied aqueous extract showed a good antibacterial activity higher than essential oil of some plant, when the best inhibition zone was 31,0±0,70mm for methicillin sensitive *S. aureus* and 20,5±0,70mm for methicillin resistance *S. aureus*. **Conclusion:** The results obtained showed that aqueous extract and essential oil of *Eucalyptus globulus* may be constitute a naturel antibiotic to exploited for raising problems of infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Essential oil, aqueous extract, *Eucalyptus globulus*, *Staphylococcus aureus*, hydrodistillation

INTRODUCTION

Aromatic and medicinal plant which push in the whole world have therapeutic virtues, because they produce certain bioactives molecules which react with other organisms in the environment, inhibiting bacterial or fungal growth. The molecules that can inhibit pathogens and have little toxicity to host cells are considered candidates for developing new antimicrobial drugs^{13,19}. Today, treatments by plants comeback on the first plan because the efficacy of medicaments such as antibiotics, considered as almost universel resolution of infectious diseases decreasing, in reason of usage general of this chemical agents and prescript on a large scale and sometimes inappropriate have causing the strong adaptability of bacterial strains and selection of multiresistants strains which cause a public health problem¹⁰. *Staphylococcus aureus* is one of opportunistic pathogens that cause severe and life threatening infections in immunocompromised patients. The Gram-positive Bacterium *S. aureus* is mainly responsible for post-operative wound infection, toxic shock syndrome and food poisoning^{2,6}. The *Eucalyptus*, a native genus from Australia belongs to *Myrtaceae* family and comprises about 900 species and subspecies^{15,17}. *Eucalyptus* species are also know to contain bioactive

products that display antibacterial, antifungal, analgesic, antioxidative and anti-inflammatory effects⁹. This research was conducted to evaluate the antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globulus* leaves were done twenty *S. aureus* strains isolated of different hospitalized patients by disc diffusion method and determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration by used agar dilution method.

MATERIALS AND METHODS

plant material

Fresh leaves of *Eucalyptus globulus* were collected from the region El- Kala (north east Algeria) during march 2013. Leaves were air-dried at room temperature (20-25°C) for one week and then stored in cloth paper bags.

Microbial strains

The essential oil and aqueous extract of *E. globulus* were tested against twenty strains of *Staphylococcus aureus*. These microorganisms were clinical isolates from different hospitalized patients having various infections. A pathologic source and antibiotic resistance of microorganisms was represented in table 1.

Table 1: pathologic sources and antibiotic resistance of microorganisms selected

| Microorganisms | Age | sex | Sources | Antibiotic resistance |
|-----------------------|-----|--------|-----------|---|
| <i>S. aureus</i> ATTC | - | - | ATCC29223 | Susceptible |
| <i>S. aureus</i> 12 | 56 | Female | Urine | P |
| <i>S. aureus</i> 34 | 45 | Female | Urine | P |
| <i>S. aureus</i> 01 | 35 | Male | Urine | P, Fos, K |
| <i>S. aureus</i> 60 | 25 | Male | Urine | P |
| <i>S. aureus</i> 25 | 45 | Male | Urine | Ox, P, E, RP |
| <i>S. aureus</i> 37 | 69 | Female | Wound | OX, P, Gn, K, TE |
| <i>S. aureus</i> 49 | 47 | Male | Wound | Ox,Fc, P |
| <i>S. aureus</i> 04 | 53 | Male | Urine | P, Fos |
| <i>S. aureus</i> 52 | 69 | Female | Wound | P, Gn, OFX, K, TE |
| <i>S. aureus</i> 28 | 27 | Male | Urine | P, Fos, K |
| <i>S. aureus</i> 27 | 17 | Male | Urine | P, Fos, K |
| MRSA45 | 55 | Female | Wound | OX, P, FC, FOX |
| MRSA58 | 45 | Female | Wound | OX, P, Fc, FOX, Gn, AK, OFX, K, E, TE, RP |
| MRSA47 | 70 | Male | Urine | OX, Fc, P, FOX, K |
| MRSA40 | 42 | Female | Wound | OX, Fc, P, FOX, Gn, AK, OFX, K, CD, Fos, TE, RD, RP |
| MRSA05 | 35 | Female | Wound | OX, Fc, P, FOX, Gn, C, K, E, CD, Fos, TE, RD, RP |
| MRSA 41 | 52 | Female | Wound | OX, Fc, P, FOX, Gn, AK, OFX, K, E, TE, RP |
| MRSA59 | 61 | Male | Wound | OX, P, FOX, OFX, K, E, TE |
| MRSA23 | 54 | Female | Wound | OX, Fc, P, FOX, Gn, AK, OFX, K, FosTE, RP |

S. aureus : *Staphylococcus aureus*, MRSA : Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus*

P : Penicillin, OX : Oxacillin, FOX : Cefoxitin, E : Erythromycin, Fc : Fusidic Acid, Fos : Fosfomicin, TE : Tetracyclin, RD : Rifampicin, RP : Pristinamycin, CD : Clindamycin, Gn : Gentamycin, AK : Amikacine, OFX : Ofloxacin, C : Chloromphenicol, K : Kanamycin

Extraction of aqueous extract

Ten grams of leaves powder were boiled with 200ml of distilled water for 20min with an occasional stirring. The decoction preparation was then filtered through a muslin cloth followed by filtration paper. The extract was kept at 4°C¹².

Extraction of essential oil

The essential oil was extracted by hydrodistillation method using a Clevenger type apparatus for 2h. The oil was conserved at 4°C until antibacterial activity testing^{1,14}. Yield was calculated according to dry weight of the plant materials by using following formula¹⁸:

$$\% \text{Yield} = \frac{\text{weight of oil}}{\text{weight of dried powder}} \times 100$$

Sensitivity test of essential oil and aqueous extract

The agar disc diffusion method was employed for determination of antibacterial activity of *E. globulus* essential oil and aqueous extract. The inoculums were suspended in sterile saline water and diluted according to 0.5 Mac Farland standard and then spread on a solid agar medium in Petri dishes (Mueller Hinton agar). Two filter discs (6mm in diameter) was deposited on the agar surface then impregnated by 5 and 10µl of essential and two discs by 5 and 10µl of aqueous extract and another by 10µl of

dimethylsulfoxid (DMSO) used as a negative control. The Petri dishes were incubated at 37°C for 24h^{3,4,20,22}.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by agar dilution method

minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of extracts was determined by agar dilution method described by Mayachiew and Davahastin. (2008). Different concentrations of extracts (1000,2000,3000,4000,6000,8000,10000µg/ml) were tested; 1ml of each concentration were mixed with 9ml of Mueller Hinton medium to obtain final concentrations (50, 100, 200,300,400,500 µg/ml) and poured into sterilized Petri dishes. Immediately after solidification the dishes were spot inoculated with 10µl of suspension containing 10⁶CFU/ml of bacterium. The inoculated dishes were incubated at 37°C for 24h. The MIC represent the lowest concentration inhibit any growth visible after 24h of incubation at 37°C. Furthermore, the MBC represent the lowest concentration of extract inhibit any growth visible after 5 days of incubation at 37°C^{18,16}.

RESULTS

The essential oils of *Eucalyptus globulus* leaves obtained have pale yellow color, and aromatic smell spicy with a density less than of water. The percentage yield was 2.25% for 100g of powder leaves. The antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *E. globulus* was represented in table 2. According to the width of the inhibition zone diameter expressed in mm, results were

Table 2: Antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* essential oil and aqueous extract using disc diffusion method.

| Bacterial strains | DMSO (10 μ l) | Oxacillin | Essential oil | | Bacterial sensitivity | | Aqueous extract | | Bacterial sensitivity | |
|---------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------|----------------------|----------------------|-----------------------|------------|
| | | | 5 μ l | 10 μ l | 5 μ l | 10 μ l | 5 μ l | 10 μ l | 5 μ l | 10 μ l |
| <i>S. aureus</i> ATTC2923 | 00,0 \pm 0,0 0 | - | 09,5 \pm 0,70 | 12,00 \pm 0,0 0 | + | + | 17,50 \pm 0,0 0 | 19,00 \pm 1,4 1 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 12 | 00,0 \pm 0,0 0 | 18,00 \pm 0,7 0 | 10,0 \pm 1,41 | 13,00 \pm 1,4 1 | + | + | 15,50 \pm 0,7 0 | 17,00 \pm 0,0 0 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 34 | 00,0 \pm 0,0 0 | 14,00 \pm 0,0 0 | 10,5 \pm 2,12 | 12,50 \pm 0,0 0 | + | + | 13,50 \pm 0,7 0 | 15,00 \pm 0,0 0 | + | ++ |
| <i>S. aureus</i> 01 | 00,0 \pm 0,0 0 | 13,00 \pm 1,4 1 | 09,00 \pm 0,0 0 | 14,00 \pm 1,8 2 | + | ++ | 16,00 \pm 0,0 0 | 17,00 \pm 0,0 0 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 60 | 00,0 \pm 0,0 0 | 17,00 \pm 0,0 0 | 09,50 \pm 0,7 0 | 13,00 \pm 0,0 0 | + | + | 14,00 \pm 0,0 0 | 15,50 \pm 0,7 0 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 25 | 00,0 \pm 0,0 0 | 10,00 \pm 1,4 1 | 10,00 \pm 0,0 0 | 16,00 \pm 1,4 1 | + | ++ | 14,00 \pm 1,4 1 | 19,00 \pm 1,4 1 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 37 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 13,5 \pm 0,50 0 | 16,00 \pm 1,4 1 | + | ++ | 13,00 \pm 0,0 0 | 15,50 \pm 0,7 0 | + | ++ |
| <i>S. aureus</i> 49 | 00,0 \pm 0,0 0 | 08,50 \pm 0,7 0 | 08,50 \pm 0,7 0 | 12,00 \pm 0,0 0 | + | + | 15,50 \pm 0,7 0 | 19,50 \pm 0,7 0 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 04 | 00,0 \pm 0,0 0 | 16,0 \pm 0,00 0 | 09,50 \pm 0,0 0 | 12,00 \pm 1,4 1 | + | + | 17,00 \pm 0,0 0 | 19,00 \pm 0,0 0 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 52 | 00,0 \pm 0,0 0 | 12,00 \pm 0,0 0 | 10,50 \pm 0,7 0 | 16,00 \pm 0,0 0 | + | ++ | 14,00 \pm 0,0 0 | 16,00 \pm 0,0 0 | ++ | ++ |
| <i>S. aureus</i> 28 | 00,0 \pm 0,0 0 | 11,00 \pm 0,0 0 | 09,00 \pm 0,0 0 | 14,50 \pm 0,7 0 | + | ++ | 25,50 \pm 0,7 0 | 31,00 \pm 0,7 0 | +++ | +++ |
| <i>S. aureus</i> 27 | 00,0 \pm 0,0 0 | 11,00 \pm 0,0 0 | 10,00 \pm 0,0 0 | 14,00 \pm 0,0 0 | + | + | 18,00 \pm 0,0 0 | 20,00 \pm 0,0 0 | ++ | +++ |
| MRSA45 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 08,00 \pm 0,0 0 | 10,00 \pm 0,0 0 | - | + | 15,00 \pm 0,0 0 | 20,00 \pm 0,0 0 | ++ | +++ |
| MRSA58 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 10,00 \pm 1,4 1 | 12,50 \pm 2,1 2 | + | + | 16,50 \pm 0,7 0 | 20,50 \pm 0,7 0 | ++ | +++ |
| MRSA47 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 00,00 \pm 0,0 0 | 09,50 \pm 2,1 2 | - | + | 13,50 \pm 0,7 0 | 15,00 \pm 0,0 0 | ++ | ++ |
| MRSA40 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 00,00 \pm 0,0 0 | 08,50 \pm 0,7 0 | - | + | 16,00 \pm 0,0 0 | 19,50 \pm 0,7 0 | ++ | ++ |
| MRSA05 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 09,00 \pm 0,0 0 | 14,50 \pm 0,7 0 | + | ++ | 16,00 \pm 0,0 0 | 19,50 \pm 0,7 0 | ++ | ++ |
| MRSA 41 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 08,00 \pm 0,0 0 | 14,50 \pm 0,7 0 | - | ++ | 15,50 \pm 0,7 0 | 20,00 \pm 0,0 0 | ++ | +++ |
| MRSA59 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 12,00 \pm 0,0 0 | 15,50 \pm 0,7 0 | + | ++ | 15,00 \pm 0,0 0 | 17,00 \pm 0,0 0 | ++ | ++ |
| MRSA23 | 00,0 \pm 0,0 0 | 00,0 \pm 0,00 0 | 10,00 \pm 1,4 1 | 15,00 \pm 1,4 1 | + | + | 16,50 \pm 0,7 0 | 20,00 \pm 0,0 0 | ++ | +++ |

appreciated as follows: not sensitive (-) for diameter equal to 8mm or below; sensitive (+) for diameter between 8 and 14mm; very sensitive (++) for diameter 14 to 20mm and extremely sensitive (+++) for diameter equal or larger than 20mm¹. DMSO: Dimethylsulfoxid, (-) not sensitive, (+): sensitive, (++) very sensitive, (+++): extremely sensitive. The values of MIC and MBC determined by agar dilution method were shown in the table 3. According to the values of MIC and MBC; the report CMB/CMI was calculated to determine bacteriostatic or bactericidal effect of extracts study. When this report is superior to 4, extract have a bacteriostatic effect, and bactericidal effect when it is less than or equal 4⁵.

DISCUSSION

The yield of essential oils was higher (2.25‰) than that obtained by Selvakumar P et al (0.72 to 0.8‰) and Manika N et al (1.7 to 2.1‰)^{14,18}. Difference with these yields compared to those previously reported in the literature for some aromatic plants such as *Eucalyptus* species collected in the other geographic areas in the world, could be attributed to some factors such as climate, nature of the soil, age of the tree, time of collection, mode of extraction⁷. The antibacterial activity of essential oil displayed considerable against different strains tested, but stayed lower than that of aqueous extract which showed highest antibacterial

Table 3: The values of MIC and MBC determined by agar dilution method.

| Bacterial strains | Essential oil | | | Aqueous extract | | |
|-------------------------------|---------------|------------|---------|-----------------|-------------|---------|
| | MIC (µg/ml) | MBC(µg/ml) | MBC/MIC | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml) | MBC/MIC |
| <i>S. aureus</i> ATTC29223 | 200 | 400 | 2,00 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>S. aureus</i> 12 | 200 | 500 | 2,50 | 300 | 400 | 1,33 |
| <i>S. aureus</i> 34 | 300 | 400 | 1,33 | 300 | 400 | 1,33 |
| <i>S. aureus</i> 01 | 400 | 400 | 1,00 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>S. aureus</i> 60 | 400 | 500 | 1,25 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>S. aureus</i> 25 | 300 | 400 | 1,33 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>S. aureus</i> 37 | 300 | 400 | 1,33 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>S. aureus</i> 49 | 200 | 300 | 1,50 | 300 | 400 | 1,33 |
| <i>S. aureus</i> 04 | 200 | 400 | 2,00 | 400 | 400 | 1,00 |
| <i>S. aureus</i> 52 | 300 | 500 | 1,60 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>S. aureus</i> 28 | 500 | 500 | 1,00 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>S. aureus</i> 27 | 200 | 300 | 1,50 | 400 | 400 | 1,00 |
| MRSA45 | 500 | 500 | 1,00 | 400 | 500 | 1,25 |
| MRSA58 | 400 | 500 | 1,00 | 400 | 500 | 1,25 |
| MRSA47 | 500 | 500 | 1,00 | 400 | 400 | 1,25 |
| MRSA40 | 500 | 500 | 1,00 | 400 | 500 | 1,25 |
| MRSA05 | 500 | 500 | 1,00 | 400 | 500 | 1,25 |
| MRSA 41 | 400 | 500 | 1,25 | 500 | 500 | 1,00 |
| MRSA59 | 500 | 500 | 1,00 | 400 | 400 | 1,00 |
| MRSA23 | 400 | 500 | 1,25 | 400 | 500 | 1,25 |

activity; this variability in antibacterial effect could be attributed to the chemical composition of these extracts.

The best inhibition of essential oil was observed with *S. aureus* 37 (13,50±0,50 for 5µl and 16,00±1,41 for 10µl) and for aqueous extract with *S. aureus* 28 (25,50±0,70 for 5µl and 31,00±0,70 for 10µl), but it stayed less important than with methicillin resistance *S. aureus* strains; where the highest activity of essential oil was observed against MRSA59 (12,00±0,00 for 5µl and 15,50±0,70 for 10µl) and with MRSA58 (16,50±0,70 for 5µl and 20,50±0,70 for 10µl) for aqueous extract. In general, the essential oil and aqueous extract of *E. globulus* had a superior inhibitory activity against twenty strains tested, compared with the best antibiotic used for treatment of infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus*: oxacillin. These results are in agreement with literature which reported that the Gram positive bacterium *S. aureus* was highly sensitive to the essential oils of *E. globulus* than Gram positive bacteria^{2,15,21}. The MIC and MBC of extracts showed varying values against twenty strains tested, the best MIC and MBC of essential oil and aqueous extract was respectively 200mg/ml and 300mg/ml. All reports MBC/MIC of two extracts were less than four which determine bactericidal effect of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globules* leaves.

CONCLUSION

Our results confirmed antibacterial proprieties of *Eucalyptus globulus* essential oil and aqueous extract. The aqueous extract has more effective antibacterial than essential oil extracted from the leaves of some plant, that showed potentiel inhibition against eleven strains of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* and eight strains methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. These extracts may be suggested as naturel antibiotic for

the treatment of infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus* after testing the toxic effects on human.

REFERENCES

- Ameur E, Karima HS, Samira M, Khouja ML, Rachid C, Fethia HS. Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species essential oils. Food chemistry 2011; 129:1427-1434.
- Bachir R, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2012:739-742.
- Bereket A, Samuel S, Feleke M. In vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Zehneria scabra* and *Ricinus communis* against *Escherichia coli* and methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Asian pacific journal of tropical biomedicine 2014; 4(10):816-820.
- Birgul O, Mari E, M. Kemal S, Arzu C, Mahmut C. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of *Laurus nobilis* seed oil. Journal of environment biology 2010; 31(5):637-641.
- Canillac N, Moureey A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea exceloa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and Coliform bacteria. Food Microbial 2001; 18:261-268.
- Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic erq. Nat Rev Microbial 2009; 7(9):629-641.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, Apers S, De Bruynet T, Hermans N, Totte J, Pieters L, Vlietinck AJ. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the democratic republic of

- Congo. Journal of ethnopharmacology 2002; 79:2013-220.
8. Derwich E, Benziane Z, Bouki A. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. Aut. J. Basic and APPL.Sci 2009;3(4):3818-3824.
 9. Durre S, Muhammad AR, Sana B, Gulshan B. Ferric reducing antioxidant power of essentials oils extracted from Eucalyptus and Curcuma species. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2012: 1633-1636.
 10. Hamilton M, JMT, Shah S. Activity of tea component epigallocatechin gallate and analogues against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. Journal of antimicrobial chemotherapy 2004; 46:847-863.
 11. Hanene Z, Sonda A, Amel B, Mahfoud M, Abdelfattah EF, Mohamed B. Chemical composition and antioxidant activity of *Borago officinalis L.* leaf extract growing in Algeria. Arabian journal of chemistry 2014.
 12. Lila BM, Sakina S, Khodir M. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. Industrial crops and products 2013; 41:85-89.
 13. Manika N, Chanotiya CS, Negi MPS, Bagchi GD. Capious shoots as a potential source for the production of essential oil in *Eucalyptus globulus*. Industrial crops and products 2013; 46:80-84.
 14. Martin G, Jian Z, Min A, Samson A. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. Food Chemistry 2010; 119:731-737.
 15. Mayachiew P, Devahastin S. Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. Food science and technology 2008; 41:1153-1159.
 16. Pereira V, Dias C, Vasconcelos MC, Rosa E, Saavedra MJ. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). Industrial crops and products 2014; 52:1-7.
 17. Selvakumar P, Edhaya NB, Dprakash S. Studies on the antidiarrhoeal activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globulus*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine 2012:715-719.
 18. Sengul M, Yildiz H, Gungor N, Cetin B, Eser Z, Ercilis S. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. Pakistan journal of pharmaceutical sciences 2009;41:85-89.
 19. Sheeba E. Antibacterial activity of *Scilanthus surattense* burm. F.J Sci Eng Tech 2010;6(1):1-4.
 20. Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. Food chemistry 2011; 126:228-235.
 21. Uddin N, Rahman A, Ahmed NU, Rana S, Akter R, Masudul AM, Chowdhury A. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial properties of *Eclipta alba* ethanol extract. Int J Biol Med Res 2010; 1(4):341-346.



***In vitro* antibacterial proprieties of aqueous extract and essential oil of *Eucalyptus globulus* against multi-resistant *Klebseilla pneumoniae* isolated from hospitalized patients**

Marwa Bouras*¹, Naffisa Boutefnouchet Abbaci¹ and Salima Bennadja²

¹Faculty of Nature and Life Sciences, Department of Biochemistry, Biochemistry and applied Microbiology Laboratory, University Badji Mokhtar of Annaba 23000, Algeria

²Medicine Faculty, Department of Pharmacy, University Badji Mokhtar of Annaba 23000, Algeria

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the antibacterial activity of aqueous extract and essential oil obtained from *Eucalyptus globulus* leaves. The aqueous extract was obtained by decoction in volume of distilled and essential oil by hydrodistillation method. The antibacterial effect was studied in vitro in five strains: *Klebseilla pneumoniae* ATCC10031 and four multi-resistant strains of *Klebseilla pneumoniae* isolated from hospitalized patients. Minimum inhibitory concentration (CMI) and minimum bactericidal concentration (MBC) was determined by agar dilution method. The essential oil has demonstrated a good antibacterial activity against all strains tested with best inhibition zone equal to $18,5 \pm 2,12$ mm for 5 μ l and $32,50 \pm 0,70$ mm for 10 μ l. Studied aqueous extract showed a considerable antibacterial effect less than essential oil of the same plant, when the best inhibition zone was $10,0 \pm 1,41$ mm for 5 μ l and $13,5 \pm 0,70$ mm for 10 μ l. The MIC and MBC of essential oil was ranging respectively from 100 to 400 μ g/ml and 200 μ g/ml to 500 μ g/ml, and for aqueous extract from 300 to 400 μ g/ml and 400 to 500 μ g/ml. The results obtained indicated that *Eucalyptus globulus* essential oil could be used as a potential source of nature antibiotic for raising problems of infectious diseases caused by multi-resistant *Klebseilla pneumoniae* after testing the toxic effects on human.

Keywords: Essential oil, aqueous extract, *Eucalyptus globulus*, *Klebseilla pneumoniae*, discs diffusion method, hydrodistillation

INTRODUCTION

The current problem associated with emerging multi-resistant bacteria presents a serious global medical crisis, requiring constant surveillance, with continuously challenges the scientific community [4].

Traditionally used medicinal plants produce a variety of substances of know therapeutic properties. One of the vital activities possessed by these medicinal plants is antimicrobial. The substances that can either inhibit the growth of bacteria or kill them, with no toxicity or minimum toxicity to host cells are considered candidates for developing new antimicrobial drugs [4].

The *Eucalyptus*, a native genus from Australia belongs to *Myrtaceae* family and comprises about 900 species and subspecies [3, 9, 21]. *Eucalyptus* species are also know to contain bioactive products that display antibacterial, antifungal, analgesic, antioxidative and anti-inflammatory effects [20].

Klebseilla pneumoniae is a Gram negative bacterium, included in enterobacteriaceae. It was recognized as a cause of community acquired pneumonia and is the opportunistic pathogen that can cause pneumonia, urinary tract pathogen

infections, and bacteremia. *K.pneumoniae* is one of the most common nosocomial pathogens, its ability to produce extended spectrum β -lactamases has caused great concern worldwide [10, 11]

In view of this, it was aimed to conduct the study to evaluate the antibacterial activity of aqueous extract and essential oil of *Eucalyptus globulus* leaves against multi-resistant *Klebseilla pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients by used disc diffusion method and determination of minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration by agar dilution method.

MATERIALS AND METHODS

2-1- plant material

Fresh leaves of *Eucalyptus globulus* were collected from the region El- Kala (north east Algeria) during march 2013. Leaves were air-dried at room temperature (20-25°C) for one week and then stored in cloth paper bags.

2-2- Microbial strains

The essential oil and aqueous extract of *E.globulus* were tested against four strains of *Klebseilla pneumoniae* isolated from hospitalized patients. The antibiotic resistance and pathologic sources of strains tested was represented in table 1.

Table 1: Antibiotic resistance and pathologic sources and microorganisms selected

| Microorganisms | Age | Sex | Sources | Antibiotic resistance |
|--------------------------|-----|--------|------------|--------------------------------------|
| <i>K.pneumoniae</i> ATCC | - | - | ATCC 10031 | - |
| <i>K.pneumoniae</i> 01 | 47 | Male | Urine | AMC, AM, TIC, CIP, SXT |
| <i>K.pneumoniae</i> 02 | 58 | Female | Wound | AMC, AM, TIC, CAZ, CTX, GN, SXT |
| <i>K.pneumoniae</i> 03 | 60 | Male | Urine | AMC, AM, TIC, CAZ, CTX, GN |
| <i>K.pneumoniae</i> 04 | 39 | Female | Wound | AMC, AM, TIC, IPM, CAZ, CTX, GN, CIP |

AMC: Amoxicilline+clavulanic acid, AM: Ampicillin, TIC: Ticarcillin, CIP: Ciprofloxacin, SXT: Co-Trimethoprim, CAZ: Cefotaxim, GN: Gentamycin, CTX: Cefotaxim

2-3- Extraction of aqueous extract

Ten grams of leaves powder were boiled with 200ml of dislited water for 20min with an occasional stirring. The decoction preparation was then filtered through a muslin cloth followed by filtration paper. The extract was kept at 4°C [22].

2-4- Extraction of essential oil

The hydrodistillation method was using for extraction of *E.globulus* essential oil. The extraction was performed in Clevenger apparatus for 2h. After hydrodistillation, the essential oil obtained was stored at 4°C and protected against light to avoid alteration in its composition. Yield was calculated according to dry weight of the plant materials by using following formula: [2, 18]

$$\% \text{Yield} = \text{weight of oil} / \text{weight of dried powder of } Eucalyptus \text{ globulus leaves} \times 100$$

2-5- Disc diffusion method

Antibacterial activity of *E.globulus* aqueous extract and essential oil was determinate by agar disc diffusion method. The inoculums were suspended in sterile saline water and diluted according to 0.5 Mac Farland standard and then spread on a solid agar medium in Petri dishes (Mueller Hinton agar). Two filter discs (6mm in diameter) was deposited on the agar surface then impregnated by 5 μ l and 10 μ l of essential and two discs by 5 μ l and 10 μ l of aqueous extract and another disc by 10 μ l of dimethylsulfoxid (DMSO) used as a negative control. The Petri dishes were incubated at 37°C for 24h [1, 7, 14, 16].

2-6- Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) by agar dilution method

The MIC and MBC of extracts were performed using agar dilution method reported by Mayachiew and Davahastin. Different concentrations of extracts (1000, 2000, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000 μ g/ml) were tested; 1ml of each concentrations was mixed with 9ml of Mueller Hinton medium to obtain final concentrations (50, 100, 200, 300, 400, 500 μ g/ml) and poured into sterilized Petri dishes. Immediately after solidification the dishes were spot inoculated with 10 μ l of suspension containing 10⁶CFU/ml of bacterium. The inoculated dishes were incubated at 37°C for 24h. The MIC represent the lowest concentration inhibit any growth visible after 24h of incubation at

37°C. Furthermore, the MBC represent the lowest concentration of extract inhibit any growth visible after 5 days of incubation at 37°C [8, 17, 18].

RESULTS AND DISCUSSION

The percentage yield of essential oil extract from *E.globulus* leaves was 2,25‰ for 100g of powder leaves. The yield obtained was higher (2,25‰) than that obtained by Selvakumar P et al (0.72 to 0.8‰) and Manika N et al (1.7 to 2.1‰) [13, 18]. The difference with these yields could be attributed to some factors such as climate, nature of the sol, age of the tree, time of collection and mode of extraction [12].

The antibacterial activity of essential oil and aqueous extract of *E.golobulus* was represented in table 2. According to the width of the inhibition zone diameter expressed in mm, results were appreciated as follows: not sensitive (-) for diameter equal to 8mm or below; sensitive (+) for diameter between 8 and 14mm; very sensitive (++) for diameter 14 to 20mm and extremely sensitive (+++) for diameter equal or larger than 20mm [6].

Table2: Antibacterial effect of *Eucalyptus globulus* essential oil and aqueous extract by used disc diffusion method

| Bacterial strains | DMSO (10µl) | Essential oil | | Bacterial sensitivity | | Aqueous extract | | Bacterial sensitivity | |
|--------------------------------|-------------|---------------|------------|-----------------------|------|-----------------|------------|-----------------------|------|
| | | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl | 5µl | 10µl |
| <i>K.pneumoniae ATCC 10031</i> | 00,0±0,00 | 22,5±0,70 | 34,00±1,41 | +++ | +++ | 13,00±1,41 | 16,00±0,00 | + | ++ |
| <i>K.pneumoniae01</i> | 00,0±0,00 | 15,00±1,41 | 31,00±2,82 | ++ | +++ | 10,00±1,41 | 13,50±0,70 | + | + |
| <i>K.pneumoniae02</i> | 00,0±0,00 | 16,00±1,41 | 21,50±2,12 | ++ | +++ | 09,50±0,70 | 12,50±0,70 | + | + |
| <i>K.pneumoniae03</i> | 00,0±0,00 | 18,50±2,12 | 32,50±0,70 | ++ | +++ | 09,50±0,70 | 11,50±0,70 | + | + |
| <i>K.pneumoniae04</i> | 00,0±0,00 | 18,00±1,70 | 29,50±0,70 | ++ | +++ | 09,00±0,00 | 10,50±0,70 | + | + |

DMSO: Dimethylsulfoxid, (-) not sensitive, (+): sensitive, (++) very sensitive, (+++): extremely sensitive

Eucalyptus globulus essential oil showed a potential antibacterial activity, when all strains tested were very sensitive to extremely sensitive. Aqueous extract of the some plant displayed considerable antibacterial effect, but stayed less important than observed with essential oil, when all of the strains tested have been sensitive to aqueous extract; this variability in antibacterial activity could be attributed to the difference of chemical composition between these extracts.

The best inhibition zone of essential oil was observed with *K.pneumoniae ATCC 10031* (22,5±0,70 for 5µl and 34,00±1,41 for 10µl) and for nosocomial strains with *K.pneumoniae03* (18,50±2,12 for 5µl and 32,50±0,70 for 10µl). Aqueous extract was showed best inhibition zone with *K.pneumoniae ATCC 10031* (13,00±1,41 for 5µl and 16,00±0,00 for 10µl) and for multi-resistant strains with *K.pneumoniae01* (10,00±1,41 for 5µl and 13,50±0,70 for 10µl). These results are in agreement with literature which reported that the Gram negative bacterium *K.pneumoniae* was highly sensitive to the essential oils of *E.globulus* [5, 10, 19]

The values of MIC and MBC determined by agar dilution method were shown in the table 3. According to the values of MIC and MBC; the report CMB/CMI was calculated to determine bacteriostatic or bactericidal effect of extracts study. When this report is superior to 4, extract have a bacteriostatic effect, and bactericidal effect when it is less than or equal 4 [15].

Table 3: MIC and MBC of extracts determined by agar dilution method

| Bacterial strains | Essential oil | | | Aqueous extract | | |
|--------------------------------|---------------|------------|---------|-----------------|-------------|---------|
| | MIC (µg/ml) | MBC(µg/ml) | MBC/MIC | MIC (µg/ml) | MBC (µg/ml) | MBC/MIC |
| <i>K.pneumoniae ATCC 10031</i> | 100 | 200 | 2,00 | 300 | 400 | 1,33 |
| <i>K.pneumoniae01</i> | 200 | 400 | 2,50 | 300 | 400 | 1,33 |
| <i>K.pneumoniae02</i> | 300 | 400 | 1,33 | 300 | 500 | 1,66 |
| <i>K.pneumoniae03</i> | 400 | 500 | 1,25 | 400 | 500 | 1,25 |
| <i>K.pneumoniae04</i> | 400 | 500 | 1,25 | 400 | 500 | 1,25 |

The MIC and MBC of extracts showed varying values against twenty strains tested, it was respectively between 100 to 400µg/ml and 200 to 500µg/ml for essential oil and for aqueous extract ranging from 300 to 400µg/ml and 400 to 500µg/ml. All reports MBC/MIC of two extracts were less than four which determine bactericidal effect of essential oil and aqueous extract of *Eucalyptus globules* leaves.

CONCLUSION

Our results suggested antibacterial proprieties of aqueous extract and essential oil extracted from of *Eucalyptus globulus* leaves collected from Algerian east. The essential oil have more effective antibacterial than aqueous extract, that showed potential inhibition against four strains multi-resistant *Klebsella pneumonia*. These extracts can

be exploited as naturel antibiotic for raising problems of infectious diseases caused by multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* which cause a public health problem.

REFERENCES

- [1] A. Bereket, S.Samuel, M. Feleke, *Asian pacific journal of tropical biomedicine* **2014**, 4, 10, 816-820.
- [2] A. Mostofizadeh, A. Kariminik, *Acta biologica indica*, **2015**, 4, 1, 1-4.
- [3] A.K. Tyagi, A. Malik, *Food chemistry*, **2011**,126, 228-235.
- [4] D.L. Valle Jr, J.I. Andrade, J.J.M. Puzon, E.C. Cabrera, W.L. Rivera, *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, **2015**, 5, 7 , 532-540.
- [5] D.V. Biljama, D. Tatjana, S. Danijela, D. Javanka, *Crezech.food scin*, **2011** ,29, 3, 277-284.
- [6] E .Ameur, H.S. Karima, M. Samira, M.L.Khouja, C.Rachid, H.S, Fethia, *Food chemistry*, **2011**, 129, 1427-1434.
- [7] E. Sheeba, *F.J Sci Eng Tech*, **2010**, 6, 1,1-4.
- [8] E. Derwich, Z. Benziane, A. Bouki, *Aut.J.Basic and APPL.Sci*, **2009**, 3, 4, 3818-3824.
- [9] G. Martin , Z. Jian, A. Min, A. Samson, *Food Chemistry*, **2010**, 199, 731-737.
- [10] G. Shaik, N. Sujatha, S.K. Muhar, *Journal of applied pharmaceutical science*, **2014**, 4, 01, 135-147.
- [11] H. Ahmed Khan, A. Ahmed, R. Mehboob, *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, **2015**, 5 , 7, 509-511.
- [12] K.Cimanga, K. Kambu, L. Tona, S.Apers, T.D. Bruynet, N. Hermans, J.Totte, L.Pieters, A.J. Vlietinck, *Journal of ethnopharmacology*, **2002**, 79, 2013-220.
- [13] N. Manika, C.S. Chanotiya, M.P.S. Negi, G.D. Bagchi, *Industrial crops and products* , **2013**, 46, 80-84.
- [14] N. Uddin, A. Rahman, N.U. Ahmed, S. Rana, R. Akter, A.M. Masudul, A. Chowdhury, *Int J Biol Med Res*, **2010**, 1, 4, 341-346.
- [15] N.Canillac, A.Moureey, *Food microbial*, **2001**, 18, 261-268.
- [16] O.Birgul, E. Mari, S.M.Kemal, C.Arzu, C.Mahmut, *Journal of environment biology*, **2010**, 31, 5, 637-641.
- [17] P. Mayachiew, S. Devahastin, *Food science and technologie*, **2008**, 41, 1153-1159.
- [18] P. Selvakumar, N.B. Edhaya, S. Dprakash, *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, **2012**, 715-719.
- [19] R.K. Bacheheti, *Der pharma chemica*, **2015**, 7, 2, 209-214.
- [20] S. Durre, A.R. Muhammad, B. Sana, B. Gulshan, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, **2012**, 1633-1636.
- [21] V. Pereira, C. Dias, M.C. Vasconcelos, E. Rosa, M.J. Saavedra, *Industrial crops and products*, **2014**, 52, 1-7.
- [22] Z. Hanene, A. Sonda, B. Amel, M. Mahfoud, E.F. Abdelfattah, B.Mohamed, *Arabian journal of chemistry*, **2014**.