

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
ابو بكر بلقايد- تلمسان
Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN
كلية علوم الطبيعة والحياة , وعلوم الارض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Laboratoire :
Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique



MÉMOIRE

Présenté par

Mlle. SEKKAL Hasna Douaa

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème

Évaluation du pouvoir antibiofilm de l'*Eucalyptus camaldulensis*

Soutenu le	, devant le jury composé de :		
Présidente	Dr. BELKACEM Nacéra	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr. HASSAINE-LAHFA Imane	MCB	Université de Tlemcen
Encadrante	Dr. ADIDA Houria	MCA	Université de Tlemcen

Année université : 2024-2025

الملخص:

تظل الأغشية الحيوية السبب الرئيسي في ظهور الأمراض المعدية، بسبب مقاومتها المستمرة للعوامل المضادة للميكروبات التقليدية التي تشكل تحدياً لمكافحة هذه العدوى، ولهذا من الضروري البحث عن مواد بديلة أكثر فعالية وغير ضارة مثل النباتات التي تظهر في القضاة على هذه الأغشية الحيوية بفضلتها في الأغذية. في هذا تأجيل واعد السدياق، اخترنا قديم تأثير مضاد الحيوية للأغشية الحيوية للمستخلصات الخام وكذلك زيت بلسخدام طريقة الكريستال البنفسجي. *Eucalyptus camaldulensis* الأوكالبتوس الأساسي من نوع السخراج الزيت الأساسية التي تمت عن طريق التقطير المائي سمحت لنا بالحصول على طريقة ميثانولية-مردود بنسبة 3.0%. بينما سمحت النقع لمدة 27 ساعة للمستخلصات المائية والهيدرو بالحصول على مردود بنسبة 79.11% و 54.51% على التوالي. أظهرت نتائج الفحص الكيمياء المتأينة والكومارينات والقلويدات. في المقابل، هناك غياب تام للفلافونويدات، النباتية وجود الكينونات، الأثيرات الكينونات والسكرات المرجعة. أظهرت تحليل المركبات الفينولية وجود الفلافونويدات والبولى فيينولات الكلية في جميع المستخلصات المدروسة بكميات متغيرة من-مدتويات من البولى فيينولات الكلية تمت تسجيلها في المستخلص الهيدرومستخلص إلى آخر. أعلى ميثانولية (2.76991 ميكروغرام GAE/ملغ E). بينما تمت تسجيل أعلى مدتوى من الفلافونويدات في الزيت العطري (0524 ميكروغرام CE/ملغ E). تمت تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للزيت دام طريقة الأروماجرام وطريقة التخفيف المجهرى في الوسط السائل. تُظهر النتائج التي تم الأساسية المدروسة باستخدام الحصول عليها أن الزيت العطري له أقوى تأثير مضاد للبكتيريا تجاه جميع السلالات التي تم اختبارها. بتركيز 6 ملغ/مل، نجحت الزيوت الأساسية للأوكالبتوس في تقليل الكتلة الحيوية رط فل 92.65% و *Staphylococcus aureus* غشية الحيوية ب شكل ك بير: بنسبة 99.19% للبكتيريا اللا قية ويحلا قيشغائل 51.51% قيسنب كلذكو، *Escherichia coli* ايريك بل 84.38% و *Candida albicans* الامختلطة.

الكلمات المفتاحية: الغشاء الحيوي، المستخلصات الخام، الزيت العطري، أوكالبتوس كامالدولينسيس.

Résumé

Les biofilms demeurent la principale cause de l'émergence des maladies infectieuses, du fait de leur résistance perpétuelle aux agents antimicrobiens conventionnels qui posent un défi pour combattre ces infections, c'est pour cela qu'il est primordial de rechercher des substances alternatives plus performantes et non délétères telles que les plantes qui montrent des résultats prometteurs pour éradiquer ces biofilms grâce à leur composition riche en métabolites secondaires.

C'est dans cette optique que nous avons choisi d'évaluer l'effet anti-biofilm des extraits bruts ainsi que l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* par la méthode de cristal violet.

La méthode d'extraction des huiles essentielles effectuée par hydro-distillation nous a permis d'obtenir un rendement de 0,3 %. Tandis que la macération 72h des extraits bruts aqueux et hydrométhanolique, a permis d'obtenir un rendement de 11,97% et 15,45% respectivement.

Les résultats de screening phyto-chimique, ont révélé la présence des tanins, coumarines et des alcaloïdes. En revanche une absence totale des flavonoïdes, des quinones, des anthraquinones et des sucres réducteurs.

Le dosage des composés phénoliques, a montré la présence des flavonoïdes et des polyphénols totaux dans tous les extraits étudiés avec des quantités variables d'un extrait à un autre. Les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux, ont été enregistrées par l'extrait hydrométhanolique (19967,2 µg EAG/ mg E). Pendant que la teneur la plus élevée en flavonoïdes a été enregistré par l'huile essentielle (4250µg EC/ mg E).

L'activité antibactérienne des huiles essentielles étudiées a été évaluée par la méthode d'aromatogramme et la méthode de micro-dilution en milieu liquide. Les résultats obtenus montrent que l'huile essentielle a la plus forte action antibactérienne vis-à-vis toutes les souches testées.

À une concentration de 6 mg/mL, l'huile essentielle d'*Eucalyptus* a réussi à réduire significativement la biomasse des biofilms : de 91,99 % pour *Staphylococcus aureus*, de 92,65 % pour *Candida albicans* , de 84,38 % pour *Escherichia coli* , ainsi que de 51,51 % pour le biofilm mixte.

Mots clés: biofilm, extraits bruts, huile essentielle, *Eucalyptus camaldulensis*

Abstract

Biofilms remain the main cause of the emergence of infectious diseases, and their perpetual resistance to conventional antimicrobial agents poses a challenge in combating these infections. This is why it is essential to seek alternative, more effective and non-deleterious substances such as plants, which are showing promising results in eradicating these biofilms thanks to their composition rich in secondary metabolites.

In light of this basis, we chose to evaluate the anti-biofilm effect of crude extracts and *Eucalyptus camaldulensis* essential oil using the crystal violet method.

Essential oil extraction by hydro-distillation yielded 0.3%. The 72-hour maceration of aqueous and hydromethanolic crude extracts yielded 11.97% and 15.45% respectively.

Phytochemical screening results revealed the presence of tannins, coumarins and alkaloids. On the other hand, flavonoids, quinones, anthraquinones and reducing sugars were completely absent.

The determination of phenolic compounds showed the presence of flavonoids and total polyphenols in all the extracts studied, with quantities varying from one extract to another.

The highest levels of total polyphenols were recorded in the hydromethanolic extract (19967.2 µg EAG/ mg E). While the highest flavonoid content was recorded by the essential oil (4250µg EC/ mg E).

The antibacterial activity of the essential oils studied was evaluated using the aromatogram method and the micro-dilution method in liquid medium. The results show that the essential oil has the strongest antibacterial action against all the strains tested.

At a concentration of 6 mg/mL, Eucalyptus essential oil significantly reduced biofilm biomass: by 91.99% for *Staphylococcus aureus* , by 92.65% for *Candida albicans* , by 84.38% for *Escherichia coli* , and by 51.51% for mixed biofilm.

Key words: biofilm, crude extracts, essential oil, *Eucalyptus camaldulensis*

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier Dieu le tout puissant de m'avoir donné la force et la patience pour achever ce travail

J'adresse mes sincères remerciements à Madame **Adida Houria** maître de conférence classe «A », au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Abou bekr Belkaid pour son encadrement exceptionnel et soigneux , sa disponibilité et sa patience tout au long de ces mois de travail ainsi que pour sa gentillesse et sa bienveillance, sans sa présence ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

mes vifs remerciements pour les membres du jury à commencer par :

Madame **Belkacem Nacéra** maître de conférence classe «A », au département de biologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et de l'univers, université de Tlemcen Aboubekr Belkaid d'avoir accepté de présider ce jury.

Madame **Hassaine-Lahfa Imane**, maître de conférence classe «B» au département de biologie de l'université Aboubekr Belkaid Tlemcen. C'est un immense honneur que vous me faites en acceptant d'examiner ce modeste travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Docteur **BABA Ali Ibrahim**, Maître de conférences «A» au niveau du département d'écologie, à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen de nous avoir aidé à identifier notre plante.

Un grand remerciement à Madame **Seladji Meryem Maître** de conférences «A» au niveau du département de biologie, à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen. Grâce à son aide précieuse, j'ai pu extraire l'huile essentielle de ma plante dans des conditions optimales.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance envers les doctorantes du laboratoire (LapSab)

Kawther , Nadia , Amira, Meroua, Fatima et Hafsa pour leur patience, rigueur scientifique, multiples conseils judicieux, dévouement et leur sympathie je vous remercie pour tous ce que vous avez fait pour nous vous étiez toutes à la hauteur, que Dieu vous donnera la force d'accomplir vos thèses.

Dédicace

Je dédie ce travail à toute personne qui m'est chère :

A mes chers parents, vous avez été toujours présents pour moi, sans vous je ne pourrai jamais accomplir ce travail et arriver là où je suis aujourd'hui, je vous remercie énormément pour votre amour inconditionnel, votre soutien, vos encouragements et votre dévouement, quoi que je fasse ou je dise je ne pourrais jamais vous remercier comme il se doit, vous êtes la lumière qui illumine mon chemin.

A mes chères sœurs que j'aime énormément merci pour votre accompagnement durant toutes ces années, votre présence permanente et pour l'importance que vous m'accorder sans oublier mon petit frère que Dieu vous garde pour moi.

A ma source de bonheur mes neveux et nièces que j'adore.

A mes beaux-frères que j'estime beaucoup.

A mes sœurs de cœur Wafaa et Chahinez que j'aime je vous suis reconnaissante pour votre soutien moral, votre précieuse aide, votre présence et votre amitié qui m'est chère, que Dieu vous bénisse.

A ma chère amie d'enfance Mimi qui ne m'a jamais oublié malgré la distance qui nous sépare je te souhaite que du bonheur dans ta vie.

A mes chères et adorables amies Hadjer et Farah qui m'ont accompagné durant ces trois ans d'études, merci pour votre disponibilité, complicité et pour les bons moments partagés ensemble et d'avoir rendu ces années d'études plus agréables que notre amitié durera longtemps.

Une dédicace spéciale à la personne la plus marrante Nassera je ne te remercie jamais assez pour ta sympathie, ton humour et la bonne ambiance que tu nous a créé au sein du laboratoire merci d'avoir rendu ces moments difficiles plus amusants et je tiens à te remercier pour l'aide que tu m'as apporté durant ce travail sans oublier ma chère Nesrine je te remercie pour ta bonté, ta gentillesse et ta présence.

Enfin je dédie ce travail à toute ma famille et à toute personne qui a contribué de près et de loin dans ce modeste travail.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1 synthèse bibliographique	4
I.Biofilms et maladies infectieuses.....	5
1-Historique	5
2-Définition d'un biofilm	5
3-Structure et composition d'un biofilm	6
4-Les étapes de formation d'un biofilm	7
4.1. Mise en place d'un film conditionnant	8
4.2. Attachement réversible (non spécifique)	8
4.3. Adhésion irréversible (spécifique)	8
4.4. Maturation du biofilm	9
4.5. Dispersion	9
5-Implication des biofilms dans les maladies infectieuses	9
6-Résistance des biofilms aux antibiotiques	11
7-Lutte contre les biofilms	11
7.1-Les bacteriophages	12
7.2-Peptides antimicrobiens	12
7.3-Nanoparticules	12
7.4-Peptides inhibant le quorum sensing	12
7.5-Approche basée sur les produits végétaux	12
II.Phytothérapie et plantes médicinales.....	13
1-définition de la Phytothérapie et des plantes médicinales	13
2-Composition des plantes médicinales	14
3-Huiles essentielles (HE) et aromathérapie	17
3-Activité antifongique des HE.....	19
4- Activité anti-biofilm des HE	19
5-Définition de l'aromathérapie	19

III. <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	20
1. Généralités	20
2. Genre <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	20
2.1-Définition	20
2.2. Répartition géographique	21
2.4. Classification systématique et noms vernaculaires	22
2.4.1. Classification taxonomique	22
2.4.2. Noms vernaculaires	22
2.5. Description botanique	22
2.5.1. Morphologie de la plante	22
2.5.2. Arbre	23
2.5.3. Ecorce	23
2.5.4. Les feuille	23
2.5.5. Les fleurs	24
2.5.6. Les fruits	24
3. Utilisation et propriétés thérapeutiques	24
Chapitre 2 Matériel et méthodes	26
1. Matériel végétal	29
2. Méthodes	29
2.1. Préparation des extraits bruts	29
2.1.1. Extrait aqueux :	29
2.1.2. Extrait hydrométhanolique	29
2.1.3. Calcul du rendement	30
2.2. tests préliminaires de screening phyto-chimique	30
2.2.1. Les composés azotés	30
2.2.2 Les composés phénoliques	30
2.2.3. Les composés terpéniques	31
2.2.4. Les composés réducteurs	31
2.3. Le dosages des composés phénoliques	32
2.4. Extraction de l'huile essentielle	34
2.4.1. Calcul du rendement	34

3. Matériel biologique	34
4. Méthode de diffusion en disque sur gélose (aromatogramme)	35
5. Étude de la formation de biofilm par la méthode <i>in vitro</i> de la coloration au cristal violet sur microplaque	36
5.1. Biofilm bactérien	36
5.2. Biofilm fongique	36
6. Inhibition de la formation du biofilm	37
6.1. Préparation de la gamme des extraits bruts	37
Chapitre 3 Résultats et discussion.....	38
1. Caractéristiques des différents extraits bruts	39
2. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle	39
3. Rendement des extraits bruts et de l'huile essentielle	40
5. Dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes	42
6. Aromatogramme	44
7. Évaluation de la capacité des souches à former des biofilms	46
8. Inhibition de la formation des biofilms par les extraits bruts et l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	47
Conclusion.....	51
Références bibliographiques.....	53

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau montrant les différentes souches étudiées.....	35
Tableau 2: Caractéristiques des différents extraits	39
Tableau 3: Caractéristiques organoleptiques de l’HE d’ <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	40
Tableau 4: Rendement des extraits bruts et de l’huile essentielle	40
Tableau 5: Tests phytochimiques des extraits bruts.	41
Tableau 6: Diamètres d’inhibition (mm)des extraits bruts et l’huile essentielles vis-à-vis les différentes souches bactériennes et levuriennes.	45
Tableau 7: Croissance en biofilm prédite des souches sélectionnées.....	46

Liste des figures

Figure 1: Schéma représentant les composants d'un biofilm.	7
Figure 2: Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm.....	8
Figure 3: Schéma représentant les différentes pathologies infectieuses causées par les biofilms.....	10
Figure 4: Structures chimiques des principaux constituants des HE.	18
Figure 5: Répartition d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i> dans le monde.....	21
Figure 6: Arbre de l' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	23
Figure 7: Schéma représentant le protocole expérimental réalisé.	28
Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.	42
Figure 9: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.....	43
Figure 10: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoides	43
Figure 11: Activité anti-biofilm de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	48
Figure 12: Activité anti-biofilm de l'extrait aqueux d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	48
Figure 13: Activité anti-biofilm de l'extrait hydrométhanolique d' <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	49

Liste d'abréviations

AFNOR : Organisation Française de Normalité

ATCC : American Type Culture Collection

BHIB : Brain Heart Infusion Broth.

DO : Densité optique

DMSO : Diméthyl Sulfoxide

HE : huile essentielle

TSB : Tryptic Soy Broth.

Introduction

Les infections microbiennes demeurent des maladies sévères, leur prévalence a connu une hausse significative au fil des dernières années. Il y a longtemps, et à tort, cru que les microorganismes causant ces infections existaient uniquement sous une forme libre et isolée, dite planctonique. Cependant, ce mode de vie ne serait que temporaire et ne représenterait qu'un pourcentage du monde bactérien naturel. En réalité, 99% des espèces bactériennes ne vivent pas de manière individuelle mais en communautés complexes qui s'attachent aux surfaces. Par conséquent, le mode de vie prédominant des bactéries est probablement en biofilm (**Dupin, 2017; Garrett et al., 2008; Medeiros, 2016**) .

Le traitement des ces maladies infectieuses repose essentiellement sur l'utilisation de thérapies nettoyantes, désinfectantes et de médicaments synthétiques (antibiotiques, antifongiques). Bien que l'élimination des cellules en état planctonique semble efficace. Dans le cas des cellules en biofilm, elles sont moins standardisées et non normalisées. L'utilisation, à vaste échelle et parfois inadaptée, de ces médicaments a conduit à l'émergence de souches résistantes, ainsi qu'à l'apparition des effets secondaires et de contre-indications qui restreignent leur usage. D'où la nécessité de réorienter les recherches vers de nouvelles pistes, en particulier vers des plantes qui ont toujours été une source d'inspiration pour le développement de nouvelles thérapies (**Marwan, 2019; Kaloustian et Hadji Minaglou, 2012**).

Les plantes sont souvent reconnues comme des ressources riches dotées de propriétés antimicrobiennes couramment exploitées dans la lutte contre les maladies infectieuses (**Panahi et al., 2011**). Pendant des millénaires, les plantes ont constitué la source principale de l'homme. Contrairement aux médicaments traditionnels, les plantes offrent une solution contre les différentes maladies qui l'ont touché tout au long de son histoire (**Touhami, 2017**). Effectivement, les composés actifs générés lors du métabolisme secondaire des plantes sont habituellement à l'origine des propriétés biologiques. Ces substances ont le potentiel de réguler la croissance microbienne dans différentes circonstances (**Silva et Fernandes Júnior, 2010**). Ils possèdent aussi la faculté de traverser les biofilms bactériens, d'être aisément biodégradables, moins nuisibles pour l'environnement et sont quasiment non toxiques (**Ling et al., 2020**). Notamment les huiles essentielles qui commencent à susciter un grand intérêt en tant que source potentielle de molécules naturelles bioactives. De nombreuses recherches sont menées sur elles pour envisager leur usage potentiel comme substitut dans le traitement des maladies infectieuses (**Agoumi et al., 2007**).

L'*Eucalyptus* figure parmi les plantes médicinales les plus couramment employées à l'échelle mondiale. Les extraits de feuilles de cette plante sont couramment utilisés en médecine traditionnelle

depuis des centaines d'années pour traiter la grippe, notamment en tant qu'anti-inflammatoire. De plus, de nombreuses recherches mettent en avant les caractéristiques antioxydantes, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, anti-infectieuses, antispasmodiques, insecticides et acaricides de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* (Ait M'barek et al., 2007 ; Atmani-Merabet, 2018 ; Atmani-Merabet et al., 2020 ; Inouye et Abe 2007 ; Steflitsch 2008).

C'est dans ce cadre que notre travail a porté sur l'évaluation de la capacité de l'*Eucalyptus camaldulensis* à inhiber des biofilms mono-espèces et mixtes.

Le présent travail est divisé en trois chapitres :

- Le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur les biofilms, les plantes médicinales et l'espèce *Eucalyptus camaldulensis*.
- Le second chapitre est consacré à la présentation du matériel et des méthodes utilisés dans cette recherche.
- Dans le troisième chapitre sont exposés les résultats obtenus ainsi que leur discussion.

En fin notre étude s'achève par une conclusion.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Biofilms et maladies infectieuses

1-Historique

Au 17^{ème} siècle, le biofilm a été découvert par **Anthony van Leeuwenhoek**, à l'aide d'un microscope qu'il a lui-même conçu, il a observé des « animacules » issus d'un prélèvement dentaire. Il avait observé que ces micro-organismes persistaient même après le nettoyage .

Arthur Henrici a observé en 1933 une accumulation progressive de micro-organismes sur des plaques de verre disposées dans un aquarium. À partir de 1973, **Characklis** a mené des recherches sur les boues microbiologiques dans les systèmes d'eau industriels, prouvant que ces micro-organismes résistent aux agents antimicrobiens. Puis dans les années 1980, **Costerton** a démontré que ces microorganismes ont souvent tendance à s'attacher à une surface c'est de là que provient le terme « film », qui fait référence à la notion d'adhésion, d'agrégation et de multiplication sur une surface (**Roux et Ghigo, 2006**).

La 1^{ère} recherche sur PubMed utilisant le mot clé « biofilm » indique que la 1^{ère} étude sur les biofilms a été faite en 1975. Six ans après le premier usage du mot biofilm par deux dentistes de l'université **Lund** en Suède, **Costerton** utilise également ce terme la même année lors d'un reportage sur la microbiologie. Depuis, le mot « biofilm » a été sélectionné pour décrire l'état sessile des micro-organismes *in vivo* (**Hoiby, 2014**).

2-Définition d'un biofilm

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes diversifiées, notamment des bactéries et des levures adhérentes à une surface biotique ou abiotique (**López et al., 2010**). Ces microorganismes sont enveloppés dans une matrice exo-polymériques autoproduite, cette matrice est constituée de macromolécules tels que : les polysaccharides , les protéines, les lipides et les acides nucléiques (**Allewell, 2016**).

Les micro-organismes formant un biofilm diffèrent des cellules planctoniques notamment dans la croissance, la transcription des gènes, la production des protéines et l'interaction intracellulaire (**Alan, 2012**).

Les biofilms sont des structures omniprésentes. En outre, la plupart des bactéries sont capables à former des biofilms. Ils peuvent être mono ou multi-espèces, les biofilms multi-espèces sont caractérisés par une amélioration de l'activité métabolique des micro-organismes, augmentation de la tolérance à l'égard des antibiotiques et changement des structures par-rapport aux biofilms mono-espèces (**Zhao et al., 2023**).

Ces communautés capables de survivre même dans des conditions hostiles (**Kchich, 2018**). Ils résistent à plusieurs éléments tels que ; les rayonnements ultra-violets, les métaux lourds, la variation de salinité ainsi qu'à la phagocytose (**Lebeaux et al., 2014**). Les cellules bactériennes dans un biofilm coordonnent leurs actions et communiquent entre elles grâce à un phénomène appelé « Quorum sensing » ce phénomène contrôlé par des molécules de communication extracellulaire connus sous le nom d'auto-inducteurs assure quatre grandes fonctions : la division cellulaire, le transfert horizontal des gènes, les interactions hôte-pathogène, ainsi que la formation des biofilms (**Ramathan et al.,2012**) ;(**Antony et al.,2021**).

3-Structure et composition d'un biofilm :

Les biofilms sont des assemblages tridimensionnelles contenant des mono ou multi-espèces de micro-organismes (**bohning et al., 2024**). Mais la plupart des biofilms sont hétérogènes (**Lewandowski et Evans, 2000**). Un biofilm est essentiellement composé des micro-organismes et la matrice qu'ils synthétisent, les microorganismes représentent 2 à 15% de la masse sèche d'un biofilm, tandis que la matrice représente 50 à 90% de cette masse (**Costerton, 1999**). Cette matrice confère au biofilm diverses propriétés mécaniques telles que la cohésion, l'adhésion, la structuration (échafaudage), la stabilité mécanique, l'élasticité et la viscosité. Elle permet également de protéger ses cellules contre les contraintes externes (**Ibnul Hasan et Srijan, 2025; Karygiamni et al., 2020; Weber et al., 2023**) (**Figure 1**).

Les micro-organismes constituant le biofilm sont séparés par des espaces vides parcourus par des courants d'eau appelés « canaux », ceux-ci y assurent la circulation des fluides et favorisent la diffusion des nutriments, de l'oxygène et même des agents antimicrobiens et permettent ainsi l'élimination des déchets (**Lewandowski et Evans, 2000; Roux et Ghigo, 2006**).

L'architecture complexe des biofilms diffère d'un biofilm à un autre selon les micro-organismes qui le compose et les facteurs environnementaux, tels-que le pH (**Roux et Ghigo, 2006**).

La **Figure 1** représente les composants d'un biofilm.

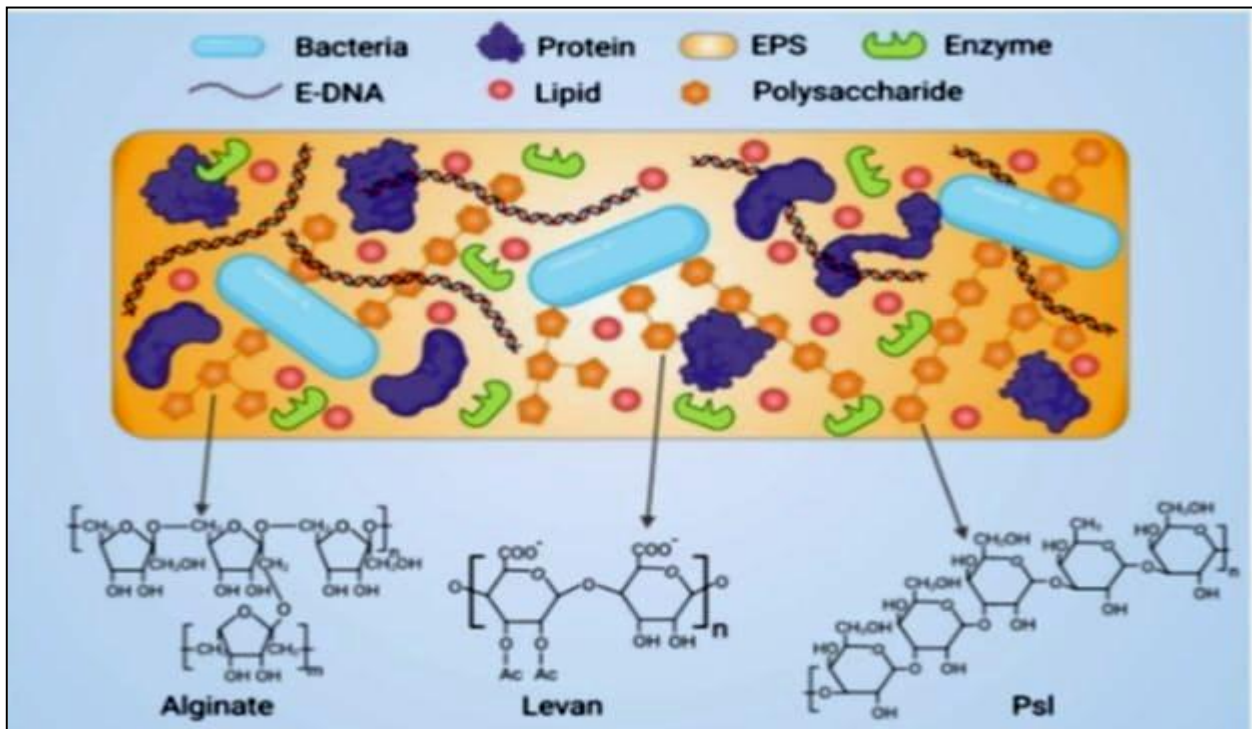


Figure 1: Schéma représentant les composants d'un biofilm (Xinyu et al., 2023).

4-Les étapes de formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm se déroule en une série d'étapes séquentielles sur une période de 24 à 48 heures, en impliquant des mécanismes physiques, chimiques et biologiques (Pereira et al., 2020; Pierre, 2010).

Ces étapes sont représentées dans la Figure 2

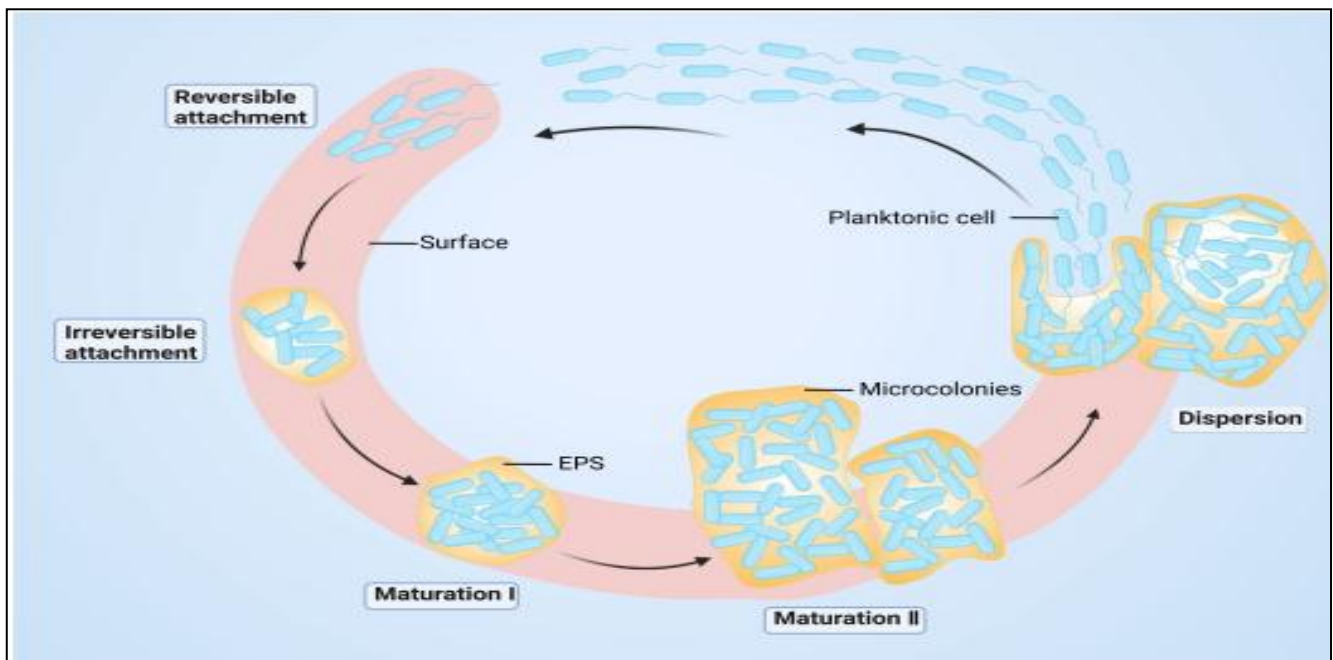


Figure 2: Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm (Xinyu et al., 2023).

4.1. Mise en place d'un film conditionnant :

Ce film favorise l'attachement des microorganismes sur une surface en neutralisant sa charge, ce dernier se forme très rapidement par un mélange de protéines, des lipides, des polysaccharides et nutriments organiques (Donlan, 2002 ; Kordmahaleh et Shalke, 2013).

4.2. Attachement réversible (non spécifique) :

Les bactéries planctonique s'approchent d'une surface solide par sédimentation ou mobilité active (Hoiby et al., 2011). Des interactions faibles non spécifiques de type électrostatiques et les forces de Van der Waals, des liaisons hydrogènes entre les micro-organismes et la surface à laquelle sont fixés interviennent lors de cette phase permettant ainsi leur détachement facile (Harras, 2005).

4.3. Adhésion irréversible (spécifique) :

Au fur et à mesure, les micro-organismes s'adhèrent d'une manière définitive et irréversible à une surface grâce à plusieurs facteurs comme : les types des micro-organismes, la disponibilité des nutriments et les propriétés de la surface (Rathinam et al., 2022; Simone et Andréa, 2021).

4.4. Maturation du biofilm :

Cette phase est caractérisée par la production des signaux auto inducteurs qui conduisent à l'expression des gènes spécifiques et permet la communication des cellules entre elles (Gupta et al., 2015). Ce phénomène connu sous le nom de « Quorum Sensing » (Phillips et al., 2008).

4.5. Dispersion :

Cette étape est caractérisée par le détachement des cellules à partir du biofilm redevenant planctoniques et colonisant d'autres surfaces ce mécanisme se fait par 3 principaux processus : le détachement superficiel, l'érosion et l'abrasion suite à l'épuisement des nutriments, la dynamique des fluides, les contraintes de cisaillement, la répression des catabolites (Ghazay et Mamdouh, 2021 ; Rasamiravaka et al., 2015).

5-Implication des biofilms dans les maladies infectieuses :

Les micro-organismes sont protégés des attaques du système immunitaire de l'hôte par la création de biofilms, qui facilitent également leur colonisation et leur multiplication, favorisant ainsi le développement d'infections persistantes. Ce système de défense accroît la difficulté de traiter la maladie tout en réduisant l'effet des médicaments. L'émergence de maladies dans différents organes du corps est intimement liée à l'existence de biofilms (Xinyu, 2023) (Figure 3).

La **figure 3** montre quelques maladies infectieuses engendrées par les biofilms

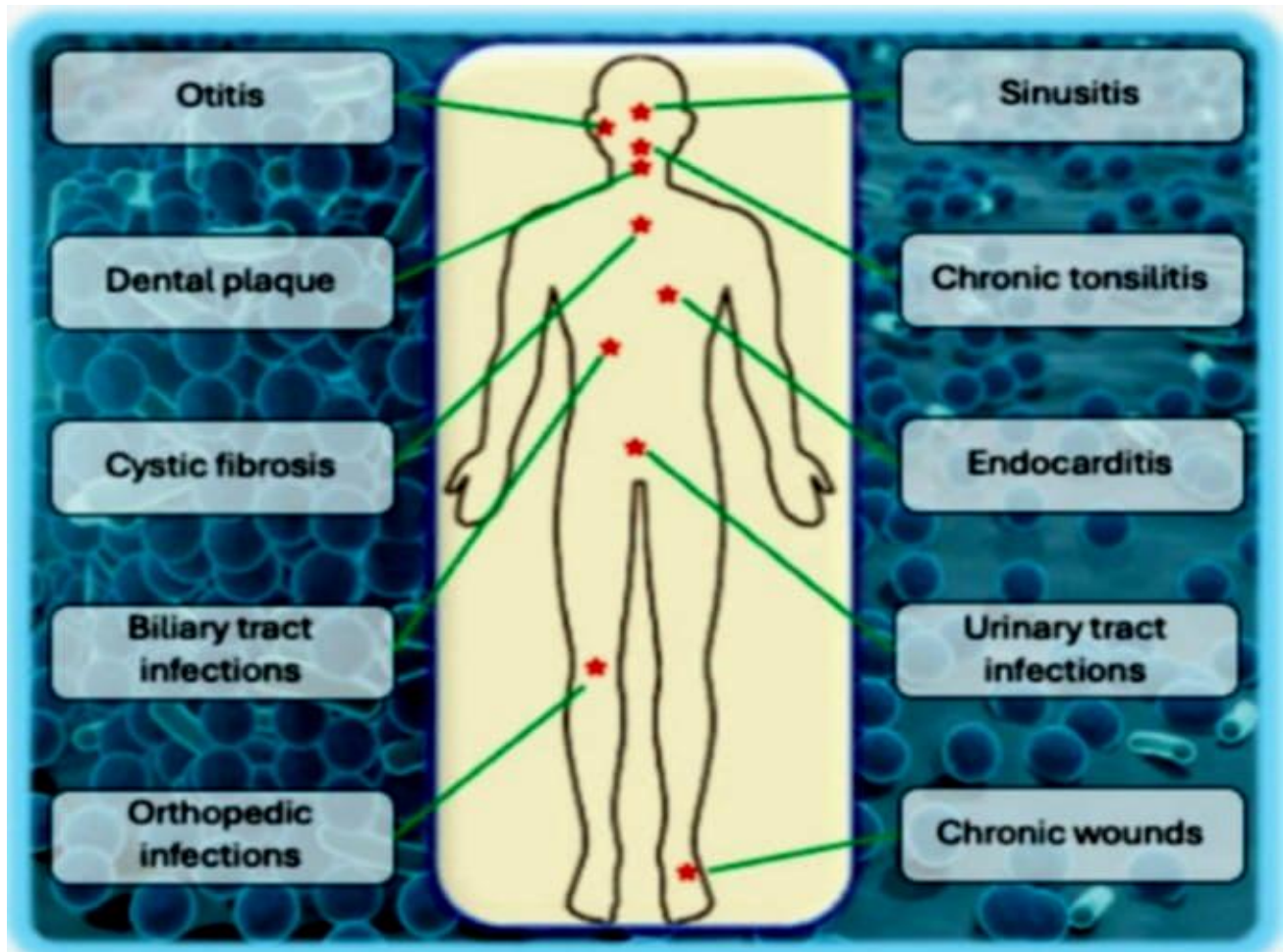


Figure 3: Schéma représentant les différentes pathologies infectieuses causées par les biofilms (Almatroudi, 2025).

Les infections pulmonaires prolongées chez les personnes atteintes de mucoviscidose, la plaque dentaire à l'origine des caries et des maladies des gencives, les infections liées aux implants médicaux tels que les cathéters et les prothèses articulaires, et les infections des plaies chroniques où les biofilms entravent le processus de cicatrisation sont des exemples notables de maladies liées aux biofilms. En raison de la façon dont les bactéries pathogènes créent des biofilms, le traitement des infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose peut s'avérer particulièrement difficile. L'efficacité de la thérapie est considérablement réduite par la capacité remarquable des biofilms à résister à des concentrations extrêmement élevées d'antimicrobiens, contrairement aux bactéries planctoniques (Almatroudi, 2025).

Ce mode de vie sessile confère aux micro-organismes une résistances extrêmes aux différents antibiotiques ainsi qu'au système immunitaire ce qui rend le traitements des maladies causées par des biofilms difficile à traiter **(Ramage et al., 2012)**.

6-Résistance des biofilms aux antibiotiques :

L'antibiorésistance, qui est le phénomène de résistance bactérienne à un ou plusieurs antibiotiques, s'est transformée en un enjeu mondial. Elle se réfère à la capacité d'une bactérie à développer une insensibilité (résistance) face à certains antibiotiques. Les souches de résistance aux antibiotiques sont initialement nées dans un contexte hospitalier **(Guillot, 1989)**.

L'anti-bio-résistance a permis de classer les bactéries comme résistantes ou sensibles, en se fondant sur la capacité à traiter les infections qu'elles entraînent. Une bactérie résistante est celle qui peut résister aux traitements, ce qui peut se traduire par un échec thérapeutique. En revanche, une bactérie sensible est celle pour laquelle le traitement a de grandes chances de réussir **(Martinez, 2014)**.

Les médecins, les professionnels vétérinaires, l'industrie alimentaire et les chercheurs sont préoccupés par l'augmentation des microbes résistants aux antibiotiques dans le monde entier. Les biofilms résistent principalement au système immunitaire de l'organisme et sont impénétrables à la phagocytose, résistants aux antibiotiques et aux désinfectants **(Muzamil et al., 2021)**.

La pénétration restrictive des antimicrobiens, les enzymes modifiant les antibiotiques dans la matrice, l'ADN extracellulaire, l'hypoxie, la diminution de la croissance, la présence de la substance exopolymérique, le stress oxydatif, les pompes d'efflux, le quorum sensing, les cellules persistantes, le transfert horizontal des gènes et le taux de mutation élevé sont les principaux facteurs qui contribuent à la résistance aux antibiotiques des biofilms **(Muzamil et al., 2021)**.

7-Lutte contre les biofilms :

Lorsque les bactéries sont exposées à des médicaments ou au système immunitaire de l'hôte, les biofilms microbiens peuvent devenir tolérants. Cette capacité est l'une des caractéristiques les plus cruciales des biofilms. Les infections bactériennes peuvent toujours réapparaître après une antibiothérapie, car les médicaments antimicrobiens ne peuvent que réduire la quantité de germes, et non les éradiquer complètement. Il est donc impératif que nous créions des médicaments sur mesure en clinique pour combattre les biofilms **(Xinyu et al., 2023)**.

7.1-Les bacteriophages :

Les phages, qui sont des ennemis naturels des bactéries, peuvent être utilisés pour traiter des maladies à la place des antibiotiques ou des suppléments d'antibiotiques. Les phages, également appelés bactériophages, possèdent des enzymes essentielles à la décomposition de l'EPS que contiennent les biofilms. Ils peuvent ainsi pénétrer dans le biofilm et en modifier la structure (Almatroudi, 2025; Xinyu et al.,2023).

7.2-Peptides antimicrobiens :

Les peptides antimicrobiens (PAM) combattent les biofilms de différentes manières, mais leur principale stratégie consiste à briser les membranes des cellules bactériennes. Ces peptides ciblent spécifiquement certains constituants moléculaires. Ils utilisent des mécanismes d'action distincts à différentes phases de la croissance du biofilm (Almatroudi, 2025).

7.3-Nanoparticules :

La création de nouveaux matériaux, instruments et systèmes en les manipulant au niveau moléculaire et atomique est connue sous le nom de nanotechnologie. Les nanotechnologies sont récemment devenues un outil prometteur. La formation de biofilms peut être évitée en appliquant des revêtements de nanoparticules sur les surfaces. Cela peut s'expliquer par les qualités antibactériennes des nanoparticules, l'inhibition de l'adhésion bactérienne à la surface, ou une combinaison des deux (Xinyu et al., 2023).

7.4-Peptides inhibant le quorum sensing :

Une approche potentielle pour l'identification de nouveaux médicaments consiste à cibler le quorum sensing, ce qui implique de perturber les réseaux de communication intercellulaire des bactéries. En utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo*. La fonction des inhibiteurs du quorum sensing (QSI) dans les biofilms bactériens présentant un intérêt thérapeutique a été examinée de manière approfondie. Par exemple, dans un modèle de greffe de souris, un inhibiteur peptidique auto-inducteur a été créé pour réduire avec succès la croissance du biofilm sous-cutané (Xinyu et al., 2023).

7.5-Approche basée sur les produits végétaux :

Depuis l'Antiquité, l'homme utilise les plantes pour leurs propriétés thérapeutiques afin de guérir diverses maladies et d'empêcher la détérioration des aliments. Jusqu'à présent, les propriétés antibactériennes de plusieurs plantes ont fait l'objet de nombreuses recherches. Toutefois, les

scientifiques s'intéressent désormais de près à l'identification de composés végétaux qui, au lieu de tuer les bactéries pathogènes, peuvent réguler efficacement leurs facteurs de virulence et/ou la formation de biofilms. De nombreux extraits de plantes, huiles essentielles et nano-formulations à base de plantes ont fait l'objet d'études approfondies pour résoudre les problèmes liés aux biofilms (Muzamil et al., 2021).

Les métabolites secondaires synthétisés par les plantes exercent un effet anti-biofilm en diminuant la formation de ces communautés de micro-organismes, comme les composés phénoliques qui inhibent la croissance de ces derniers (Vladimir et al., 2013). Certaines huiles essentielles se sont révélées efficaces pour lutter contre les biofilms bactériens et fongiques en réagissant sur la membrane et au niveau du cytoplasme (Bouyahya et al., 2017; Diana et al., 2021).

Phytothérapie et plantes médicinales

1-définition de la Phytothérapie et des plantes médicinales :

La phytothérapie, est une branche de la médecine alternative consacrée à l'étude de l'utilisation des plantes médicinales afin de prévenir ou traiter des maladies chez l'homme ou l'animal. Ces plantes médicinales constituent un élément fondamental de notre richesse naturelle. Au-delà de leur rôle de matières premières indispensable à la production de nombreux traitements contemporains, elles agissent aussi directement comme agents thérapeutiques grâce à leur richesse en principes actifs qui peuvent être utilisés dans divers industries y compris l'industrie alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Iris et al., 2014). Depuis l'antiquité plusieurs plantes ont été employées comme médicaments ou comme source de produits pharmaceutiques en raison de leur propriétés médicinales, actuellement près de 70% des médicaments sont élaborés à partir d'environ 170 000 de composés bioactifs extraits de différentes parties de plantes, notamment les feuilles, les racines et les fruits. (Bouopda et Mundene, 2023). Etant donné que les plantes renferment des substances biologiquement actives qui ont une valeur thérapeutique importante pour traiter de différentes maladies chroniques telles que le cancer, le diabète et l'Alzheimer, c'est pourquoi la phytothérapie est devenue l'intérêt de nombreux scientifiques, en tant qu'approche prometteuse pour contribuer à la résolution des problèmes de santé à l'échelle mondiale (Bouopda et Mundene, 2023; Shukurava, 2023).

2-Composition des plantes médicinales :

Les plantes synthétisent des molécules chimiques en tant que sous-produits de leur processus métaboliques réguliers, ces composés photochimiques sont scindés en deux catégories : les métabolites primaires qui sont présents dans toutes les plantes et comprennent les glucides, les lipides et les métabolites secondaires qui sont présents dans une petite variété de plantes et ont des utilisations plus spécialisées. Chez l'homme les métabolites secondaires présentent des caractéristiques pharmacologiques, leur capacité à fonctionner à plusieurs niveaux dans l'organisme permet de rétablir l'équilibre physiologique et de traiter de nombreuses pathologies. Ces métabolites sont ainsi connus par leurs activités biologiques comme l'activité anti-oxydante, anti-tumorale et antimicrobienne. En outre, ces substances jouent un rôle essentiel dans la protection des plantes contre les maladies et les agressions extérieures, comme la pollution, et ils contribuent également à renforcer la couleur, le goût et l'odeur des plantes (**Saxena et al., 2016 ; Mundene, 2023**). Parmi les métabolites secondaires identifiés, on trouve :

a- Les alcaloïdes :

Sont des substances naturelles produites par les plantes dérivées des acides aminés, ils font partie des métabolites secondaires les plus importants, ils contiennent des atomes d'azote hétérocycliques et ils sont utilisés comme stimulants, anesthésiques locaux comme la cocaïne et ils sont connus pour leur goût amer. Les alcaloïdes sont importants pour la protection et la survie des plantes en leur conférant des propriétés antibactérienne et antifongique (**Saxena et al., 2013**)

De nombreux alcaloïdes possédant de diverses propriétés comme la quinidine qui a un effet anti-arythmiques, la quinine ayant des propriétés antipaludiques et la vinblastine dotée de propriétés anti-cancéreuse (**Misganaw, 2022**).

Ci-dessous une liste des différentes catégories d'alcaloïdes en fonction du système d'anneaux hétérocycliques qu'ils contiennent

Alcaloïdes pyrrolidiniques : ils renferment un système de cycle pyrrolidine (tétrahydropyrrole). Par exemple, l'hygrine est présente dans les feuilles d'*Erythroxylum coca* (**Saxena et al., 2013**)

Alcaloïdes pyridiniques : ils possèdent un système de cycle hexahydropyridine, également connu sous le nom de pipéridine. Par exemple, la coniine, la pipérine et l'isopelletierine (**Saxena et al., 2013**).

Alcaloïdes pyrrolidine-pyridine : le système d'anneau hétérocyclique présent dans ces alcaloïdes est la Pyrrolidine-pyridine. Par exemple, la myosmine est un alcaloïde de la nicotine que l'on trouve dans

la plante du tabac (*Nicotiana tabacum*) (**Saxena et al ., 2013**)

Alcaloïdes pyridine-pipéridine : Cette catégorie d'alcaloïdes comprend un système de cycle pyridine lié à un système de cycle pipéridine, le membre le plus simple étant l'alcaloïde anabasine isolé de la plante asiatique toxique *anabasis aphyllan* (**Saxena et al ., 2013**)

Alcaloïdes de la Quinoline : Ceux-ci possèdent le système d'anneau hétérocyclique basique de la quinoline. La quinine se trouve dans l'écorce de l'arbre à quinquina. On l'a utilisé pendant des siècles pour soigner la malaria. Des médicaments synthétiques comme la primaquine ont largement supplanté la quinine en tant que traitement antipaludique (**Saxena et al ., 2013**)

Alcaloïdes isoquinoléniques : Ils renferment un système d'anneau hétérocyclique isoquinoline. Par exemple, les alcaloïdes de l'opium tels que la narcotine, la papavérine, la morphine, la codéine et l'héroïne (**Mamta et al ., 2013**) .

b- Les phénols :

Les substances phyto-chimiques phénoliques constituent la classe de substance la plus importante et largement répandue dans le règne végétal. Les 3 catégories les plus connues sont : les flavonoïdes, les acides phénoliques et les polyphénols. Ces composés élaborés au cours du métabolisme du phosphate pentose jouent un rôle primordial en tant que produits chimiques de défense et sont avantageux pour l'homme, notamment grâce à leurs propriétés antioxydantes, qui jouent un rôle clé dans leur fonction de protection contre les processus pathologiques induits par les radicaux libres (**Saxena et al ., 2013 ; Misganaw, 2022**).

• Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont des composés très fréquents dans la nature, il existe environ 4000 flavonoïdes connus. Ces substances avec une structure benzoyl et pyrone produite par la voie phénylpropanoïde (**Saxena et al ., 2013**) . Récemment, les flavonoïdes ont suscité l'intérêt en raison de leur large éventail des propriétés pharmacologiques et biologiques telles que les effets antimicrobiens, anti-inflammatoires et anti-tumoraux. Cependant, la caractéristique la plus notable de la majorité des flavonoïdes est leur capacité à agir comme de puissants antioxydants qui préservent l'organisme des espèces réactives de l'oxygène et des radicaux libres (**Saxena et al ., 2013; Misganaw, 2022**).

d-Tanins :

On peut décrire les tanins comme des biomolécules complexes à poids moléculaire élevé, capable de se combiner avec d'autres macromolécules, principalement des protéines ou des polysaccharides tels

que la cellulose ou la pectine pour former des complexes solides, selon leur structure il est donc possible de segmenter les tanins en quatre grandes catégories comme suit :

Classe	Structure	Référence
Les gallotanins	Il s'agit de la forme hydrolysable et la plus simples des tanins comprenant des unités galloyl attachées à diverses unités polyol, catéchine ou triterpénoïde.	(saxena et al.,2013)
Les ellagitannins :	Cette catégorie est dépourvue d'unité de catéchine glycosidique connectée et possédant au moins deux unités galloyl attachées en c-c l'une à l'autre.	(saxena et al ., 2013)
Les tanins complexes	Sont des tanins dont l'unité ellagitannine ou gallotannine et glycosidiquement liée à une unité catéchine.	(saxena et al ., 2013)
Les tanins condensés	Ils sont créés lorsque le C-4 d'une catéchine se lie au C-8 ou au C-6 de la catéchine monomérique suivant.	(saxena et al ., 2013)

Les extraits de plantes contenant des tanins sont employés en médecine en particulier dans la médecine asiatique comme diurétiques, anti-diarrhéiques, anti-tumoraux pour l'estomac et le duodénum et comme des anti-inflammatoires ou antiseptiques

- Les terpénoïdes : les unités isopréniques à cinq carbones sont à l'origine des terpénoïdes, les groupes fonctionnels et les squelettes carbonés de base de la majorité des terpénoïdes distinguent leurs structures multi-cycliques les unes des autres.

Ces lipides naturels étant présents dans toutes les classes d'organismes vivants, ils sont considérés comme la plus grande catégorie de produits naturels synthétisée par les plantes, l'hydrocarbure isoprène $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$, est leur unité fondamentale. Par conséquent, les hydrocarbures terpéniques sont classés en fonction du nombre d'unité isoprène et ont la formule moléculaire $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$.

Ces composés sont largement utilisés dans le domaine médical comme l'artémisinine, un antipaludéen sesquiterpénoïde et le taxol, un antinéoplasique di-terpénoïde sont deux exemples des qualités médicales des terpénoïdes (Saxena et al., 2013 ; Misganaw, 2022).

- Les saponines : c'est une classe largement répandue dans le règne végétal, en solution aqueuse ces substances créent une mousse stable comme le savon d'où le nom « saponine »

D'un point de vue chimique, les saponines comprennent des composés qui sont des stéroïdes glycosylés, des triterpénoïdes et des alcaloïdes stéroïdiens. Les saponines étant une composante des mécanismes de défense des plantes, elles font partie des nombreux composés protecteurs présents dans les plantes appelés phyto-protecteurs et possèdent plein d'effets biologiques dans le corps animal. Des recherches approfondies ont été menées sur les propriétés hypo-cholestérimiques et anti-cancérigènes des saponines et il s'est avéré qu'elles affectent de manière significative la croissance, la consommation d'aliments et la reproduction chez les animaux (Saxena et al., 2013; Misganaw, 2022).

Certaines plantes appelées plantes aromatiques sont caractérisées par la présence des composés volatiles nommés les huiles essentielles (Yago et al., 2019).

3-Huiles essentielles (HE) et aromathérapie :

a-définition et composition des huiles essentielles :

Le métabolisme secondaire des plantes aromatiques synthétise des liquides odorants volatiles connus sous le nom des huiles essentielles, qui sont une combinaison d'éléments organiques collectés à partir de différentes sources végétales et qui confèrent aux plantes leur parfum unique (Amal et Badr, 2020).

Les huiles essentielles sont un ensemble complexe de diverses molécules, aujourd'hui environ 17000 substances ont été découvertes comme composantes des huiles essentielles (**Betyna et al .,2020**). Une huile essentielle est généralement constituée de plus de 20 composants différents de faible poids moléculaire à des concentrations très variables, les mono-terpènes et les sesquiterpènes sont leurs principaux constituants bien-que les di-terpènes et les phényl-propanoïdes puissent être présents à des degrés différents, ce sont eux qui sont principalement responsables de l'effet biologique de l'huile, en traversant les membranes biologiques par simple diffusion (**sharifi et al .,2017**).

Les principaux constituants des huiles essentielles sont schématisés sur la **Figure 4**

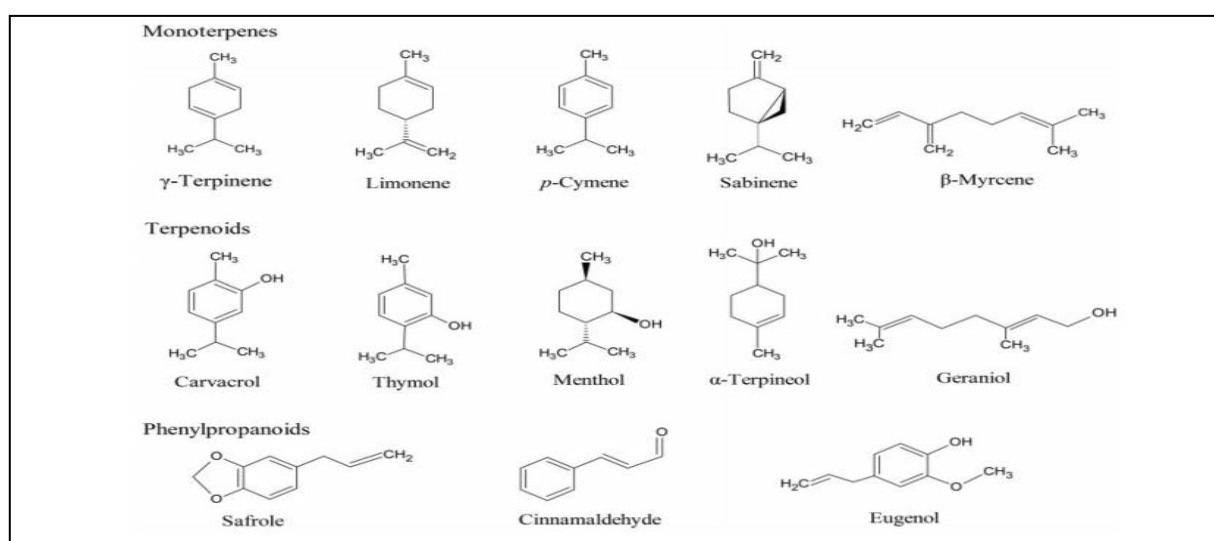


Figure 4: Structures chimiques des principaux constituants des HE (Amal et bader, 2022).

En revanche, la quantité et la qualité de ces huiles sont influencées par des facteurs environnementaux notamment l'exposition à la lumière et la température (**Amal et Bader, 2022**).

Ces huiles sont riches en composés ayant plusieurs activités biologiques telles-que l'activité anti-oxydante, anti-tumorale, anti-inflammatoire et majoritairement l'activité antimicrobiennes vis-à-vis les bactéries, les champignons et même les virus (**Farukh et al., 2025 ; Yago et al., 2019**).

b-Activité antibactérienne des huiles essentielles :

Les problèmes liés à la résistance des bactéries aux médicaments existants, ainsi que le coûts exorbitants des nouvelles générations des antibiotiques peuvent être résolus par l'exploitation des propriétés antimicrobiennes efficaces des huiles essentielles , la vaste gamme de composants

bioactifs des huiles essentielles interagissent avec les enzymes ou les structures cellulaires des microbes envahissants pour entraver leur mécanisme de résistance, augmentant ainsi le taux de mort des cellules microbiennes. Il a été démontré que de nombreuses HE ont de puissantes propriétés antibactérienne et ces propriétés sont souvent influencées par la quantité et la présence de quelques composants tels que les alcools, les terpènes, les aldéhydes, les phényl-propanoïdes et les esters. Les composés lipophiles des huiles essentielles ont la capacité d'interagir avec les lipides des membranes cellulaires des micro-organismes, perturbant ainsi leur perméabilité et leur intégrité. Cette altération provoque d'importantes fluctuations dans la chaîne de transport des électrons, ainsi que dans la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Ces perturbations entraînent l'inhibition de diverses enzymes métaboliques, conduisant finalement à la mort cellulaire. Parmi les HE les plus appliquées dans le domaine de santé sont celles des espèces d'Eucalyptus qui ont récemment fait l'objet d'une grande attention en raison de leur utilisation possible en tant que remède pour traiter les troubles infectieux grâce à leur richesse en composants bioactifs antibactériens et leur bienfait pour la santé **(Mohamed et Alotaibi, 2022 ; Javad et al., 2016)**.

3-Activité antifongique des HE:

De nombreuses plantes aromatiques et leur HE ont été montrées efficaces contre les champignons et les levures pathogènes, l'efficacité des HE en tant qu'antifongiques dépend de l'huile utilisée et de la maladie ciblée, à des concentrations variables les HE de fenouil, de coriandre et d'anis ont démontré une forte activité antifongique contre *Candida albicans* **(Mohamed et Alotaibi, 2022)**.

4- Activité anti-biofilm des HE :

Les HE de certaines plantes ont prouvé leur potentiel à entraver la formation des biofilms en ciblant les différentes voies de signalisation liées au Quorum sensing , ou en inhibant la formation d'ergostérol et plusieurs voies de signalisation chez les levures en les empêchant de produire une morphogénèse hyphale **(Amal et Badr,2022; Bouyahya et al.,2018)**.

Suite à la détérioration des membranes bactériennes par les huiles essentielles, les bioactifs présents dans les huiles essentielles peuvent également inactiver les cellules bactériennes en pénétrant à l'intérieur de la cellule et en entravant les protéines, l'ARN, l'ADN ou les polysaccharides **(Mohamed et Alotaibi, 2022)**.

5-Définition de l'aromathérapie :

L'utilisation des composés aromatiques volatiles des plantes qui sont les HE est connue sous le nom d'aromathérapie, bien que la technique ait été largement reconnue bien avant, ce terme

aromathérapie qui est dérivé de mot « aroma » signifiant odeur et « thérapie » signifiant traitement a été adopté pour la première fois au 20^{ème} siècle par le chimiste français René-Maurice Gattefoss après avoir constaté que les HE de la lavande avait des effets thérapeutique pour traiter une brulure (**Ali et al., 2018 ; Lalitkumar et al., 2024**).

De l'antiquité à nos jours, l'aromathérapie a une histoire longue et variée. Les HE ont été utilisé dans Égypte ancienne, la médecine chinoise et indienne et chez les civilisations arabes pour des fins pharmaceutiques et thérapeutiques (**Betyna et al., 2020**).

I. *Eucalyptus camaldulensis*

1. Généralités :

La famille des Myrtacées renferme environ 75 genres et près de 3000 espèces, majoritairement des arbres et arbustes persistants dans les régions tropicales. Les principaux hubs de distribution se situent en Amérique, en Asie et en Australie (**Weiss, 1997**).

Dans les forêts australiennes, le genre eucalyptus fessant partie de la famille des myrtacés constituent l'élément prédominant, représentant plus de 95% de la flore totale (**Mariani et al., 1981**)

Actuellement, c'est l'espèce la plus courante en Méditerranée, où elle s'est bien acclimatée, témoignant de sa robustesse face à la sécheresse une fois établie. Ils ont estimé qu'il existe entre 600 et 700 espèces dans le genre Eucalyptus. L'eucalyptus est l'arbre exotique le plus courant en Algérie. Cette espèce, très cultivée, a rapidement connu une vaste expansion en Algérie entre 1860 et 1870 (**Warot, 2006 ; Daroui, 2012**).

L'*E. camaldulensis* paraît être la première espèce de ce genre, ayant été introduite en 1860 par les colonisateurs français (**Poupon, 1972**).

2. Genre *Eucalyptus camaldulensis* :

2.1-Définition :

Eucalyptus camaldulensis fait partie de la famille de Myrtacées, originaire de Tasnamie en Australie son nom dérivant des termes grecs : eu «bien» et kaluptos «Couvert». Le botaniste français L'HERITIER l'a décrit et nommé en 1788 (**Bigendako, 2004**).

Représenté par environ 700 espèces, est un genre d'arbre grands persistants et magnifiques cultivés dans le monde pour son huile, sa gomme, sa pulpe, son bois, ses propriétés médicinales et son attrait esthétique. L'huile essentielle extraite de son feuillage est la plus significative parmi les différents produits ligneux et non ligneux. Elle est largement employée dans le secteur alimentaire, la

parfumerie et l'industrie pharmaceutique. En outre, l'huile possède un large spectre d'activité biologique, notamment antimicrobienne, fongicide, insecticide, herbicide, acaricide et nématocide (Batish et al., 2008).

En Algérie, l'arbre exotique le plus couramment présent est l'*Eucalyptus camaldulensis*. Cela s'applique à tous les terrains profonds de plaine, les lits d'oueds ainsi qu'aux terres non salées et sans calcaire. Il redoute les argiles compactes et les températures très basses (inférieures à 9°) Qui résiste à l'inondation et au dessèchement du sol, au vent et à la chaleur (Grec, 1966).

2.2. Répartition géographique :

L'*Eucalyptus camaldulensis* se trouve naturellement sur une grande portion du continent australien, s'étendant du territoire tropical du Nord à la zone fraîche et tempérée du Victoria. On le cultive dans de nombreux pays tropicaux et subtropicaux, c'est sans doute l'arbre le plus largement cultivé dans les régions arides et semi-arides de la planète (Oyen et Lemmens, 2002) (Figure 5)

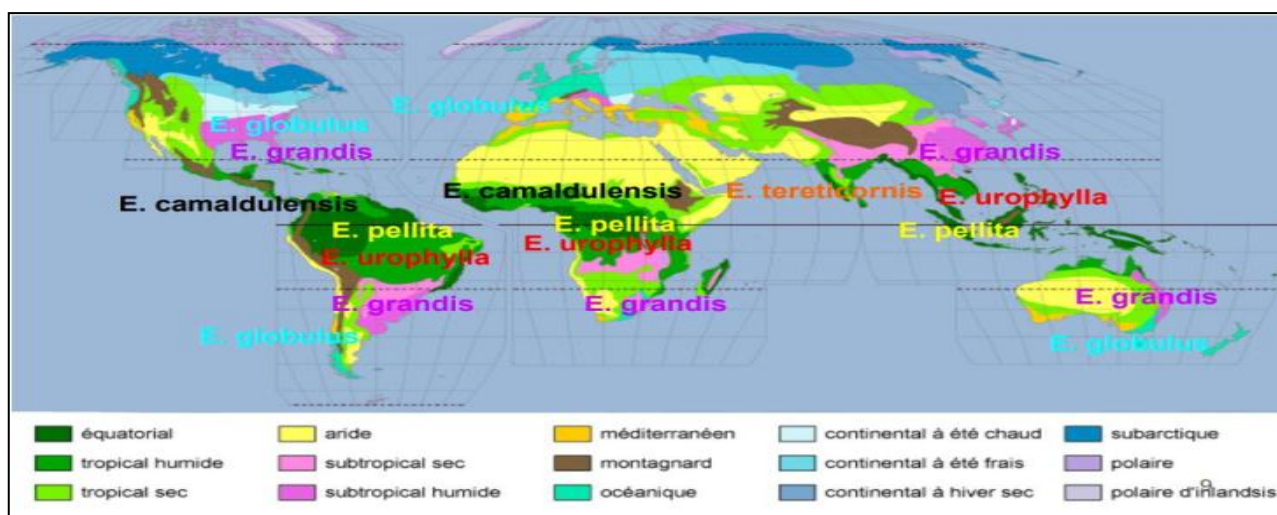


Figure 5: Répartition d'*Eucalyptus camaldulensis* dans le monde (Bouvet, 2013)

Eucalyptus camaldulensis est l'une des espèces les plus cultivées dans le monde et dans le bassin méditerranéen, elle a été introduite en Algérie en 1860 pour assainir les terrains marécageux et a été plantée sur 30000 ha (Oyen et Lemmens, 2002).

Durant les années 40 et 50, les Eucalyptus ont été introduits dans 18 arboretums représentant les étapes bioclimatiques humides et semi-arides. Dans ce contexte, pas moins de 130 espèces ont été mises en terre sur l'ensemble du territoire national.

Entre les années 1960 et 1970, les programmes de reboisement d'eucalyptus ont principalement touché l'Est (ElKala, Annaba, Skikda), le Centre (Tizi-Ouzou, Bainem) et l'Ouest (Mostaganem). L'objectif était de satisfaire les demandes nationales en termes de produits forestiers et papetiers (INRF, 1996).

2.4. Classification systématique et noms vernaculaires :

2.4.1. Classification taxonomique (Laadel, 2014)

Embranchement	Phanerogames
Sous-Embranchement	Angiospermes
Ordre	Mytales
Famille	Myrtaceae
Genre	<i>Eucalyptus</i>
Espèce	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>

2.4.2. Noms vernaculaires :

Eucalyptus rouge, gommier rouge (Fr), ce terme est parfois associé à l'*Eucalyptus camaldulensis*, mais il peut aussi désigner d'autres espèces de **Myrtaceae**. River redgum, Murray redgum, redgum (En). كالتوس (Oyen et Lemmens, 2002).

2.5. Description botanique :

2.5.1. Morphologie de la plante

Eucalyptus camaldulensis est l'un des Eucalyptus présentant la plus grande variabilité morphologique dans son habitat naturel. Sa taille peut varier de celle des eucalyptus à tige unique, atteignant entre 30 et 40 mètres en hauteur. La tige peut avoir un diamètre allant de 1 à 2 mètres, et son écorce est lisse, de couleur blanche, grise, jaune-vert. Les feuilles adultes, de couleur gris-vert ou gris rosé, peuvent mesurer entre 8 et 30 cm de longueur et entre 0,7 et 4,2 cm de largeur, avec une teinte qui varie entre le vert et le gris-vert. Les fleurs présentent une couleur blanche ; les pédoncules, élancés, mesurent entre 6 et 15 mm (Arnold et al., 2018).

La **Figure 6** comporte des photos réelles de l'*Eucalyptus camaldulensis*



Figure 6: Arbre de l'*Eucalyptus camaldulensis* (photos personnelles, 2025).

2.5.2. Arbre :

L'Eucalyptus camaldulensis est un arbre forestier à houppier très développé de forme conique jusqu'à 15 à 20 ans, elle est érigée plus tard. C'est un arbre de hauteur qui varie de 30 à 40 mètres et un diamètre qui varie de 0,9 à 2,50 mètre (**Meziane, 1996**).

2.5.3. Ecorce :

La couleur et la texture de l'écorce varient en fonction des espèces. Elle exhibe fréquemment une multitude de couleurs, et se fragmente en morceaux qui se déposent au sol, néanmoins, l'écorce peut également être dure, fibreuse, floconneuse ou lisse (**Mekelech, 2015**).

2.5.4. Les feuille :

Les feuilles de jeunesse sont disposées en opposition sur trois ou quatre paires, avec d'autres qui viennent en alternance. Elles possèdent un pétiole, sont de forme lancéolée et ont des dimensions variant de 2 à 4 cm en largeur et de 6 à 12 cm en longueur. Il a une couleur verte, un peu glauque. Les feuilles à l'état adulte sont disposées en alternance et possèdent un pétiole. Le vert est identique pour les deux côtés. Ces feuilles sont lancéolées, étroites, en forme de faux (falciforme), mesurant de 7 à 22 cm de long et de 0,4 à 4 cm de large (**Goetz et Ghedira, 2012**).

2.5.5. Les fleurs :

Les fleurs ressemblent à de petites sphères, couvertes d'innombrables élamines blanchâtres et produisent des capsules hémisphériques en inflorescence ombellée simple, avec une disposition régulière de 4 à 7 fleurs en ombelles axillaires (**Rameau et al., 2008**).

2.5.6. Les fruits :

Habituellement, les fruits apparaissent sous forme de graines angulaires et abondantes, renfermées dans une capsule. Le fruit ligneux est une grande capsule glauque qui devient marron à maturité. Elle est dure, anguleuse, verruqueuse, et présente une ouverture partielle par le biais de trois, quatre ou cinq fentes (qui forment une étoile à son sommet) pour disperser de nombreuses graines minuscules et sombres (**Goets et Ghedira, 2012**).

3. Utilisation et propriétés thérapeutiques :

L'Organisation mondiale de la Santé (**OMS**) admet l'utilisation traditionnelle des feuilles d'Eucalyptus pour apaiser la fièvre et les manifestations de l'asthme, traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses buccales (voie interne) ainsi que pour atténuer les douleurs liées au rhumatisme (voie externe).

Il est aussi employé en médecine traditionnelle chinoise pour traiter divers maux. Ses applications principales incluent la fabrication d'huiles essentielles, utilisées dans le domaine médical et pharmaceutique (**Belyagoubi, 2012**).

On suspecte également l'efficacité de la plante dans le contrôle de l'hypertension artérielle ; des rapports indiquent aussi ses propriétés antimicrobiennes et antifongiques (**Bamayi et al., 2004**).

Traditionnellement, les Aborigènes (les Australiens autochtones) se servent des feuilles d'*eucalyptus* pour soigner les blessures et les infections fongiques. Les extraits de feuilles d'*Eucalyptus* ont été validés pour leur utilisation en tant qu'additifs alimentaires et sont aussi employés dans le domaine des préparations cosmétiques (**Takahashi, 2004**).

Les vertus thérapeutiques de l'*Eucalyptus* sont principalement dues à la présence d'eucalyptol (également nommé 1,8-cinéole) dans ses feuilles. Selon **Tesche et ses collaborateurs en 2008**, l'*Eucalyptus* contenant du 1,8-cinéole a prouvé son efficacité pour diminuer la quantité de corticostéroïdes administrée aux personnes asthmatiques et pour lutter contre le rhume.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

Notre travail est réalisé au sein du laboratoire de recherche antibiotiques, antifongiques, physico-chimie, synthèse et activités biologiques « *LAPSAB* », Faculté des sciences de la nature et de la vie, des sciences de la terre et l'univers, Université Aboubekr Belkaïd « Tlemcen ».

Cette étude se divise en trois parties distinctes :

- La première partie, c'est pour l'extraction des huiles essentielles et des extraits aqueux et hydro-méthanolique de la plante étudiée.
- La deuxième partie concerne l'analyse phyto-chimique ainsi que le dosage des polyphénols totaux, des flavonoïdes des deux extraits obtenus.
- Enfin, la troisième partie de l'étude a pour but d'explorer l'activité anti-biofilm des extraits obtenus.

Le protocole expérimental suivi pour réaliser cette étude est mentionné dans la **Figure 7**

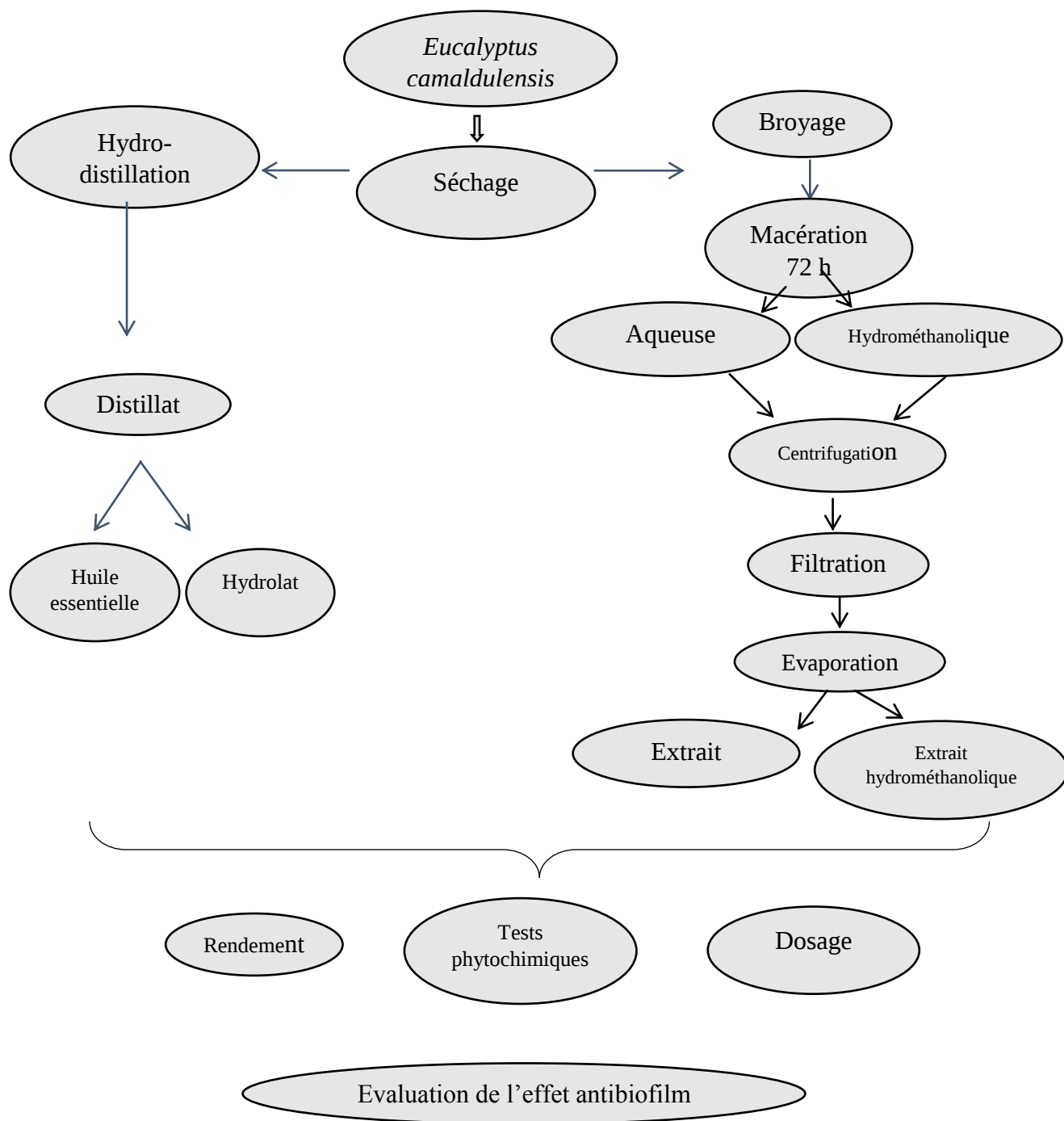


Figure 7: Schéma représentant le protocole expérimental réalisé.

1. Matériel végétal :

L'espèce étudiée *E. camaldulensis* a été récoltée dans la région de Imama, wilaya de Tlemcen pendant la période allant de janvier à mars 2025. Les feuilles ont été séchées et conservées à température ambiante à l'abri de la lumière jusqu'au jour de leur utilisation.

L'identification botanique de la plante a été faite par un spécialiste en botanique ; **Docteur BABA Ali Ibrahim**, Maître de conférences A au niveau du département d'écologie, à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen.

2. Méthodes :

2.1. Préparation des extraits bruts :

Les extraits étudiés au cours de notre recherche sont préparés selon le mode d'extraction par macération :

2.1.1. Extrait aqueux :

Après avoir broyé les feuilles finement, 20g de la matière végétale a été mélangée avec 200 mL de l'eau distillée, le mélange est laissé macérer pendant 72h à l'abri de la lumière à température ambiante sans agitation.

Le macérât obtenu a été centrifugé à 3000g pendant 10 minutes puis filtré sur du papier filtre wattman, ensuite le filtrat final a été placé dans des boîtes Pétri en verre et séché dans une étuve à 37°C et à la fin l'extrait brut a été récupéré et conservé à 4°C.

2.1.2. Extrait hydrométhanolique :

Une masse de 20g de feuilles a été macérée avec un volume de 200 mL du solvant, eau/ méthanol (20/80 : v/v), pendant 72 heures à l'abri de la lumière et à une température ambiante. Par la suite, le macérât obtenu a été centrifugé à 3000g pendant 10 minutes, après une filtration sur un papier filtre a été effectuée pour obtenir un filtrat qui va être évaporé pour l'élimination du méthanol à l'aide d'un Rotavapor à 60°C, puis le filtrat final a été placé dans des boîtes Pétri en verre et séché dans une étuve à 37°C et à la fin l'extrait brut a été récupéré et conservé à 4°C.

2.1.3. Calcul du rendement :

Le rendement c'est le rapport entre la masse d'extrait après l'évaporation (M) du solvant et la masse du matériel végétal utilisé au départ (M_0), il est exprimé en pourcentage. Pour chaque extrait, nous avons calculé ce pourcentage par la formule suivante :

$$R(\%) = M / M_0 \times 100$$

Avec

R: rendement exprimé en %.

M : masse de l'extrait obtenu après évaporation exprimée en gramme (g).

M_0 : masse initiale du matériel végétal en (g).

2.2. tests préliminaires de screening phyto-chimique :

L'évaluation phyto-chimique est une méthode permettant de révéler la présence de groupes de familles chimiques spécifiques dans un échantillon donné. Les tests de caractérisation reposent sur l'analyse qualitative, que ce soit par la formation de complexes non solubles grâce aux réactions de précipitation, ou par la formation de complexes colorés via des réactions de coloration.

Les techniques de caractérisation qualitatives, utilisées au cours de cette étude sont celles décrites par **Trease et Evans en 1989 et Harborne en 1998.**

2.2.1. Les composés azotés

❖ Les alcaloïdes :

Dans deux tubes à essai, nous avons introduit 0,5 mL de l'extrait à analyser, nous avons acidifié le milieu par quelques gouttes de HCl (1%) et nous avons ajouté 0,5 mL de réactif Mayer dans le premier tube et 0,5 mL de réactif Wagner dans le deuxième tube. L'apparition d'un précipité blanc ou brun, respectivement, révèle la présence des alcaloïdes.

2.2.2 Les composés phénoliques

❖ Les tanins :

1 mL de chaque extrait a été ajouté à 0,25 mL de $FeCl_3$ (1 %). La présence des tanins a été dévoilée par l'apparition d'une coloration verdâtre ou bleu-noir après incubation pendant 15 minutes à température ambiante.

❖ Les flavonoïdes :

Dans un tube à essai, 1 mL d'HCl concentré a été mis en contact avec 1 mL de l'extrait, ensuite 3 copeaux de Magnésium ont été ajoutés pour chaque tube. La présence de flavonoïdes a été révélée par l'apparition de coloration : rouge, orange ou rose.

❖ Les Coumarines :

1 mL de l'extrait a été gardé comme témoin et 1 mL a été mis en contact avec 0,1 mL de NH_4OH (10%). Ensuite à partir de chaque préparation une tache a été mise sur un papier filtre et examinée sous la lumière UV. Leur présence est révélée par une fluorescence intense.

❖ Les anthraquinones :

Dans un tube à essai, on introduit 1 mL d'extrait à analyser et on ajoute 1 mL de NH_4OH (10%) ensuite on l'agite. L'apparition d'une coloration violette indique la présence des anthraquinones.

❖ Les quinones libres :

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL d'extrait à analyser et nous avons ajouté 0,1 mL d'hydroxyde de sodium NaOH (1%). L'apparition d'une coloration jaune, rouge ou violette indique la présence des quinones libres.

2.2.3. Les composés terpéniques**❖ Terpénoïdes: Test de Slakowski :**

Ajouter 0,4 mL de chloroforme et 0,6 mL de l'acide sulfurique concentré sur 1 mL d'extrait. La présence des terpénoïdes est indiquée par la formation de 2 phases avec une couleur marron à l'interphase.

❖ Les saponines (Test de mousse) :

Introduire 10 mL d'extrait dans un tube, agiter pendant 15 secondes puis laisser le mélange au repos (15min). Une hauteur persistante supérieure à 1 cm de mousse indique la présence des saponines.

2.2.4. Les composés réducteurs

Dans un tube à essai, nous avons introduit 1 mL d'extrait à analyser, nous avons ajouté 0,1 mL de liqueur de Fehling (0,5 mL de réactif A et 0,5 mL de réactif B) et nous avons incubé pendant 8 min au bain marie bouillant. L'apparition d'une précipitation rouge brique, indique la présence des composés réducteurs.

2.3. Le dosage des composés phénoliques :

❖ Dosage des polyphénols totaux :

- principe

Le réactif utilisé est le Folin-Ciocalteu, qui est un mélange de complexes de l'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et l'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune. Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif. Elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleue qui absorbe à 725 nm. Le dosage de polyphénols totaux a été effectué par la comparaison de l'absorbance observée à celle obtenue par un étalon d'acide gallique de concentration connue (Vermerris *et al.*, 2006).

Nous avons déterminé la teneur en polyphénols totaux des extraits des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* par la méthode décrite par Ardestani et Yazdanparast (2007).

- Mode opératoire :

- Mélanger 100 μ L de chaque extrait (1 mg/mL) avec 2000 μ L de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (2%).
- Incuber pendant 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 100 μ L de réactif Folin-Ciocalteu (0,2 N).
- Incuber pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante
- Mesurer l'absorbance contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre à 725 nm.

En parallèle, une gamme d'étalonnage a été réalisée dans les mêmes conditions opératoires à partir de l'acide gallique à différentes concentrations (25 à 1000 μ g /mL).

Les résultats sont exprimés en microgramme Equivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait sec (μ g EAG/ mg E).

La teneur en polyphénol est calculée selon la formule suivante :

$$[\text{Polyphénols}] = a.f/C$$

a: concentration des polyphénols (mg/mL) déterminée à partir de la courbe étalon.

f : facteur de dilution (x 22).

C : concentration initial de l'extrait (1 mg/mL).

❖ Dosage des flavonoïdes :

• Principe :

L'oxydation des flavonoïdes dans un milieu alcalin par le nitrite de sodium (NaNO_2) et le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) donne un complexe de couleur rose absorbant à 510 nm (**Ardestani et Yazdanparast , 2007**).

• Mode opératoire :

Le dosage des flavonoïdes contenant dans les feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* a été réalisé selon la méthode décrite par **Ardestani et Yazdanparast (2007)**.

- Mélanger 250 μL de chaque extrait (1 mg/mL) avec 1 mL d'eau distillée et 75 μL de nitrite de sodium (NaNO_2) à 15 %
- Après 6 minutes d'incubation à température ambiante, ajouter au mélange 75 μL de trichlorure d'aluminium (AlCl_3 , 6 H_2O) à 10 % ;
- Incuber l'ensemble pendant 6 minutes ;
- Ajouter aux tubes, 1 mL d'hydroxyde de sodium (NaOH) à 4 %, et compléter le volume final à 2,5 mL ;
- Agiter et incuber le mélange à l'obscurité pendant 30 minutes ;
- Mesurer l'absorbance à 510 nm contre un blanc à l'aide d'un spectrophotomètre.

Dans les mêmes conditions opératoires, une courbe d'étalonnage est réalisée en parallèle, en utilisant la catéchine comme contrôle positif à différentes concentrations (25 -600 $\mu\text{g/mL}$). Les résultats sont exprimés en microgramme équivalent catéchine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EC / mg E}$) et ils sont calculés selon la formule suivante :

$$[\text{Flavonoïdes}] = a . f / C$$

a : concentration des flavonoïdes (mg/mL) déterminée à partir de la courbe étalon

f: facteur de dilution (x 10)

C : concentration initial de l'extrait (1 mg/mL)

2.4. Extraction de l'huile essentielle :

L'extraction de l'huile essentielle a été effectuée au sein du laboratoire des Produits Naturels LAPRONA de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen. L'extraction de notre huile essentielle a été réalisée par la méthode de distillation par entraînement à la vapeur. 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 entraîne la rupture de nombreuses glandes qui libèrent leurs composés aromatiques. Ainsi, les huiles essentielles se répandent à travers la plante pour interagir avec la vapeur d'eau en circulation à l'extérieur. Les vapeurs chargées de substances volatiles sont ensuite compactées dans un réfrigérant avant d'être décantées. En raison de leur densité distincte, les huiles essentielles et l'eau se séparent en deux phases, permettant ensuite la récupération des huiles essentielles.

En raison de leur volatilité rapide et de leur sensibilité à l'air et à la lumière, il est impératif de conserver les huiles essentielles dans des tubes opaques et scellées hermétiquement à 4°C.

2.4.1. Calcul du rendement :

Conformément à la norme **AFNOR (1986)**, les rendements en huiles essentielles ont été déterminés sur la base du matériel végétal sec. Il s'agit du rapport entre la masse de l'huile obtenue et celle de la matière végétale initiale.

Il est exprimé en pourcentage selon la formule suivante :

$$R_{HE} = M_{HE} / M_S \cdot 100$$

R : rendement en huile essentielle.

M_{HE} : la masse d'huile essentielle.

M_S : la masse de la matière végétale en g.

3. Matériel biologique :

Pour évaluer l'activité antibiofilm de l'huile essentielle et les extraits bruts d'*E.camaldulensis* nous avons utilisé quatre souches bactériennes de référence qui sont mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau 1 :tableau montrant les différentes souches étudiées

Souches	gram	code
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 29213
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 35218
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Négatif	ATCC 700603
<i>Candida albicans</i>		ATCC 26790

4. Méthode de diffusion en disque sur gélose (aromtogramme) :

Il s'agit d'une technique qualitative qui permet d'évaluer la sensibilité des micro-organismes face à une substance considérée comme antibactérienne ; elle se fonde sur la capacité de migration de ces substances sur un milieu gélosé solide (**Tahar et Sandoug , 2012**).

En utilisant une culture jeune de bactéries (18 à 24 heures) et pure sur gélose nutritive, nous avons gratté quelques colonies, toutes bien séparées et parfaitement identiques, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis les déchargées dans 5 mL d'eau physiologique stérile à 0,85%, bien homogénéiser à l'aide d'un vortex.

La suspension bactérienne est ajustée à 0.5 MacFarland c'est-à-dire : d'une densité optique allant de 0,08 à 0,13 lue à 625 nm, qui correspond à 10^8 UFC/mL. Tandis que la concentration des levures a été ajustée à 10^6 UFC/mL en mesurant l'absorbance à 530 nm qui devrait être comprise entre 0,12 et 0,15nm.

L'ensemencement de l'inoculum se fait par écouvillonnage sur la gélose Muller Hinton par des stries serrées tout en tournant la boîte à 60° à trois reprises.

Des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre ont été préparés, stérilisés à l'autoclave, imbibés avec un volume de 10 µL de chaque solution à tester (HE) pur, extrait aqueux et extrait hydro-méthanolique. Puis les déposés à la surface des boîtes ensemencées. Les boîtes sont laissées diffusées, puis incubées à 37°C pendant 18-24h.

Trois essais sont réalisés pour chaque test ; et la lecture se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (en mm) ; le résultat étant la moyenne des trois essais.

5. Étude de la formation de biofilm par la méthode *in vitro* de la coloration au cristal violet sur microplaque :

La méthode de cristal violet permet une évaluation quantitative de la formation du biofilm par l'utilisation d'une microplaque de 96 puits suivant le protocole proposé par **(Christensen et al., 1985)**.

5.1. Biofilm bactérien

Les pré-cultures bactériennes sont préparées dans 1 mL de BHIB, cette suspension est centrifugée trois fois à 1000g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec du PBS (pH 7,4; 0,1M), puis suspendu dans le milieu de culture TSB à une concentration de 10^7 cellules/mL après avoir ajusté l'inoculum à 0.5 MacFarland. 100µL de suspensions bactériennes sont réparties dans les puits de microplaque à 96 puits à l'exception du puits témoin. La microplaque a ensuite été scellée et incubée à 37°C pendant 24 heures.

5.2. Biofilm fongique

Pour les levures, quelques colonies ont été suspendues dans 1 mL de milieu Sabouraud liquide. Après une incubation à 35°C pendant 24 heures, la suspension a été centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes à trois reprises. Le culot a été lavé après les deux premières centrifugations avec du tampon phosphate salé (PBS) à une concentration de 0,1 M et un pH de 7,4 **(Pierce et al., 2008)**. La concentration initiale de cellules a été établie à 10^6 UFC/mL par dénombrement des levures sur une cellule de Thomas, puis la suspension a été ajustée dans le milieu Tryptic Soy Broth (TSB) **(Seddiki et al., 2010)**. 100µL de suspensions levuriennes sont réparties dans les puits de microplaque à 96 puits à l'exception du puits témoin. La microplaque a ensuite été scellée et incubée à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, les puits sont rincés avec une solution de PBS stérile (pH 7,4 ; 0,1 M) afin d'éliminer les cellules planctoniques et non adhérentes. Pour fixer le biofilm, 100 µL de méthanol sont ajoutés à chaque puits de la microplaque. Après incubation pendant 15 minutes à température ambiante, les puits sont à nouveau lavés et 100 µL d'une solution de cristal violet sont ajoutés. Les microplaques sont ensuite laissées pendant 20 minutes à température ambiante pour permettre la fixation du cristal violet. Ensuite, le cristal violet lié est libéré par l'addition de 150 µL d'acide acétique (33%).

La densité optique est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. Cette manipulation est répétée trois fois.

La lecture des résultats était faite selon la mesure de la DO.

Les souches ont été classées comme suit : **(Christensen et al., 1985).**

$DO \leq DO_t$ (Témoin) : non formatrice du biofilm ;

$DO_t \times 2 \leq DO \leq DO_t \times 4$: Modérément formatrice ;

$DO_t \times 4 \leq DO$: Fortement formatrice du biofilm.

6. Inhibition de la formation du biofilm :

6.1. Préparation de la gamme des extraits bruts :

Il consiste à effectuer des séries de dilution des extraits bruts dont la concentration du DMSO ne dépasse pas 2% dans le premier puits. Pour cela nous avons effectué une série de dilutions à partir d'une solution mère de 600 mg/mL en solubilisant 600mg d'extrait dans 1 mL de DMSO. Le mélange a ensuite été agité au vortex. Une série de dilution au 1/2 en cascade a été réalisée, puis au 1/50 en prélevant 40 µL de chaque tube de la première série et en ajoutant du TSB pour ajuster le volume total à 2 mL. Cela permettant ainsi d'obtenir 10 concentrations allant de 6 mg/mL à 0,01 mg/mL.

Un volume de 174,25 µL de l'huile essentielle d'eucalyptus a été aseptiquement solubilisé dans 162,87 µL de DMSO pour dissoudre l'huile, auxquels ont été ajoutés 162,87 µL de Tween 80 pour homogénéiser le mélange. Ensuite, le mélange a été agité par un vortex. Il a ensuite été soumis à une cascade de dilution de 1/2, puis à une autre dilution de 1/25, permettant d'obtenir 12 concentrations allant de 6 mg/mL à 0,01 mg/mL.

Le test a été réalisé dans une microplaque stérile à 96 puits, la première colonne des puits est marquée comme contrôle négatif, rempli que par le TSB, tandis que la dernière colonne des puits représente le contrôle positif remplie que par l'inoculum. Chaque puits reçoit un volume final de 100 µL dont 50 µL de l'inoculum de chaque souche, alors que pour le biofilm multi-espèces 50 µL d'un mélange d'inoculum contenant les trois souches (16,66 µL de chaque souche) et 50 µL de l'extrait.

Chapitre 3

Résultats et discussion

1. Caractéristiques des différents extraits bruts :

L'extraction par macération 72 heures des feuilles séchées et broyées d'*Eucalyptus camaldulensis*, à l'aide de deux solvants : Eau/ méthanol (20/80) et l'eau, a permis d'obtenir deux extraits distincts : un extrait hydro-méthanolique et un extrait aqueux respectivement.

Le **Tableau 02** regroupe les caractéristiques des extraits obtenus (Aspect, couleur et solubilité).

Tableau 2: Caractéristiques des différents extraits

	Extrait brut hydrométhanolique	Extrait brut aqueux
Aspect	Cristaux	cristaux
couleur	Vert foncé	Marron foncé
solubilité	DMSO	DMSO
Photo		

2. Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle :

Les propriétés organoleptiques (aspect, couleur et odeur) constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Les propriétés organoleptiques de notre espèce sont indiquées dans le **Tableau 3** et sur la **Figure 8**. Ces caractéristiques sont en accord avec ceux qui sont répertoriées dans les normes **AFNOR (2000)**.

Tableau 3: Caractéristiques organoleptiques de l'HE d'*Eucalyptus camaldulensis*

	HE d'<i>Eucalyptus camaldulensis</i>
Aspect	Liquide limpide
Couleur	Jaune
Odeur	Puissante Eucalyptolée

2. Rendement des extraits bruts et de l'huile essentielle :

Le rendement en huile essentielle et des extraits est exprimé en pourcentage en fonction de la matière végétale sèche. Il est variable selon différents facteurs comme le séchage de la matière végétale, le broyage, la méthode et la durée d'extraction. Les rendements de l'huile essentielle ainsi que des extraits bruts de notre espèce sont indiqués dans le **Tableau 4**.

Tableau 4: Rendement des extraits bruts et de l'huile essentielle

	Masse de la matière végétale sèche	Masse de l'extrait	Rendement
Extrait hydrométhanolique	20 g	3,09g	15,45%
Extrait aqueux	20 g	2,395g	11,97 %
Huile essentielle	920g	2,76 g	0,3 %

D'après les résultats obtenus nous avons observé que le rendement le plus élevé est attribué à l'extrait brut hydrométhanolique, suivi de l'extrait brut aqueux avec des pourcentages d'ordre de 15,45% et 11,97% respectivement.

Concernant le rendement des huiles essentielles, nos résultats sont comparables à ceux obtenus par **Ghozlane (2024)**, qui a enregistré un taux d'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* égale à 0,27%. Tandis que **Adida et al., (2020)**, qui ont obtenu un rendement plus élevé estimé à 0,72%

D'après **Vekiari et al., (2002)**, le rendement peut être directement affectée par des éléments tels que le climat, l'emplacement géographique, la durée et la technique d'extraction employée.

4. Tests phytochimiques :

Des analyses phytochimiques ont été effectuées pour déterminer la présence ou l'absence de métabolites secondaires dans les divers extraits élaborés à partir des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis*. Les résultats obtenus sont énumérés ci-dessous (**Tableau 5**).

Tableau 5: Tests phytochimiques des extraits bruts.

		Extrait hydrométhanolique	Extrait aqueux
Alcaloïdes	Wagner	+	+
	Mayer	-	-
Flavonoïdes		-	-
Tanins		+	+
Coumarines		+	+
Anthraquinones		-	-
Terpénoïdes		-	+
Saponines		+	-
Quinones		-	-
Sucres réducteurs		-	-

D'après les résultats obtenus, nous avons noté que les tanins et les coumarines sont présents dans les deux extraits, alors que les alcaloïdes ont révélé un test positif avec le réactif de Mayer. Les terpénoïdes sont présents uniquement dans l'extrait aqueux contrairement aux saponines qui sont présents dans l'extrait hydrométhanolique seulement.

En revanche, on remarque l'absence des flavonoïdes, quinones, anthraquinones et les sucres réducteurs dans les deux extraits.

5. Dosages des polyphénols totaux et des flavonoïdes :

Les dosages des composés phénoliques d'extract brut eau-méthanol et de l'extract aqueux des feuilles d'*Eucalyptus camaldulenis* ont été réalisés par des méthodes spectrophotométriques, en utilisant le réactif Folin- Ciocalteu pour le dosage des polyphénols totaux et la réaction avec le trichlorure d'aluminium (AlCl_3) en milieu alcalin pour le dosage des flavonoïdes. Les teneurs en composés phénoliques sont déterminées à partir des équations de régression linéaire de la courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux ($y = 0,0005x + 0,0885$, $R^2 = 0,9961$) (**Figure 8**) et de la courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes ($y = 0,003x + 0,1222$, $R^2 = 0,9903$) (**Figure 9**).

Les teneurs sont exprimées en microgramme équivalent d'acide gallique par milligramme d'extract ($\mu\text{g EAG/ mg E}$) pour les polyphénols totaux et en en microgramme équivalent Catéchine par milligramme d'extract ($\mu\text{g EC/ mg E}$) pour les flavonoïdes.

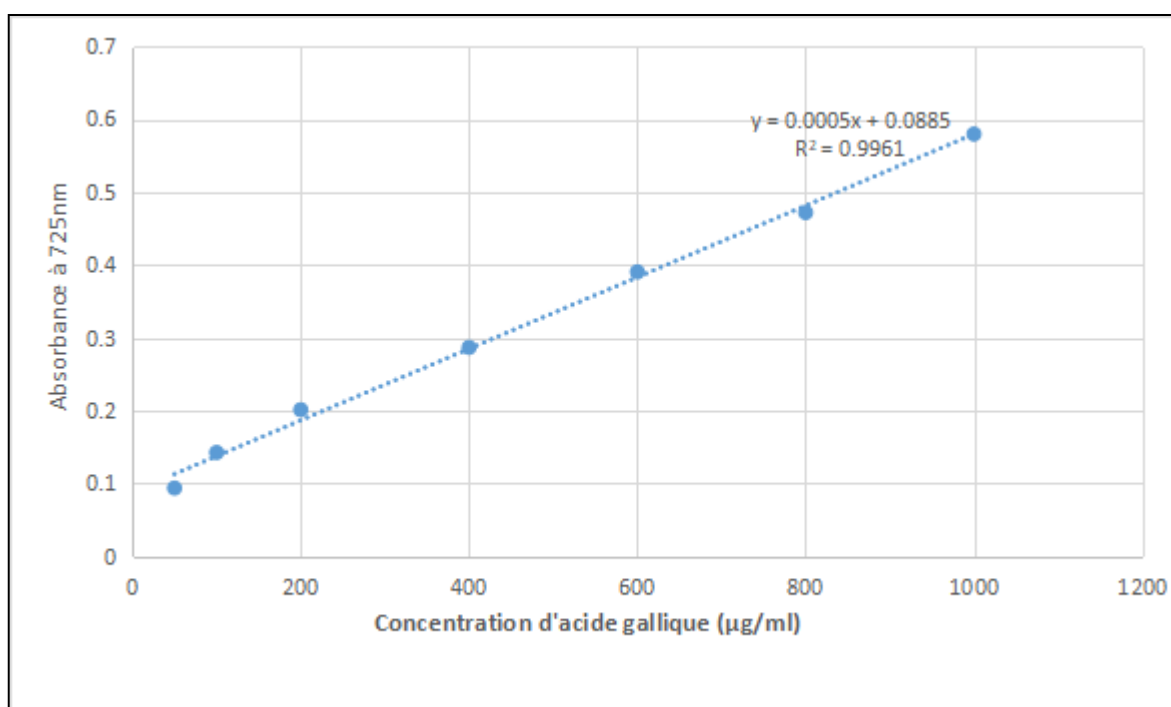


Figure 8: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.

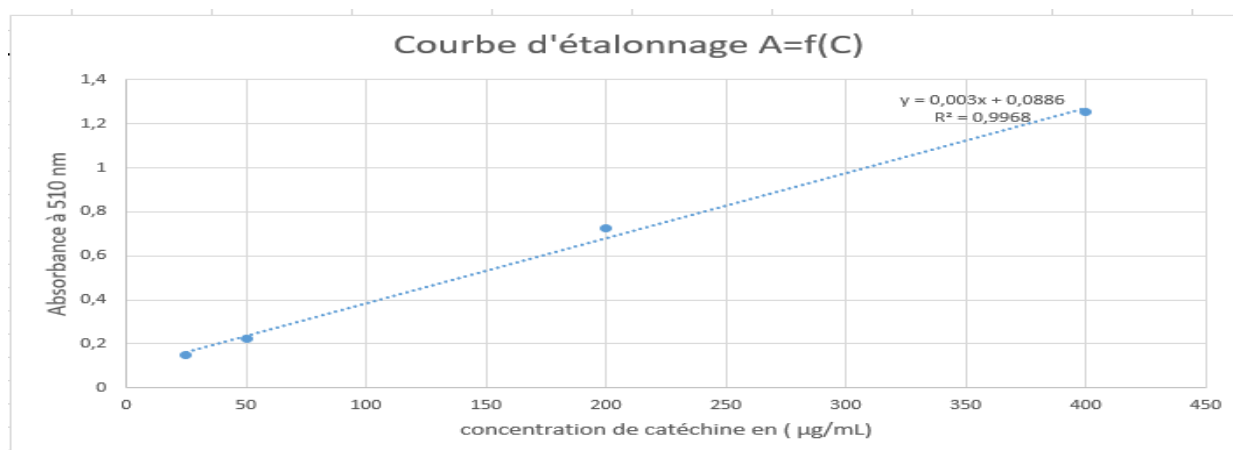


Figure 9: Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

La **Figure 10** représente en moyennes, les teneurs en composés phénoliques dans l'huile essentielle, l'extrait brut eau-méthanol et l'extrait aqueux.

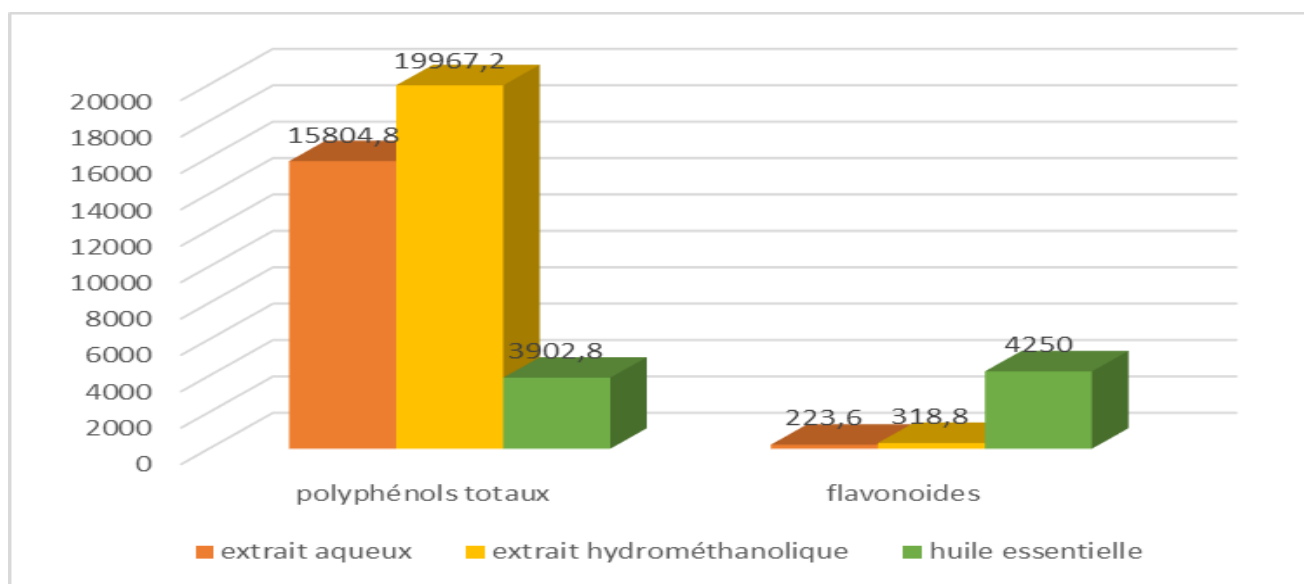


Figure 10: Teneurs en polyphénols totaux et flavonoides des extraits des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis*.

Les résultats mentionnés dans la **figure 10**, ont montré que les différents extraits préparés des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* contiennent des quantités en composés phénoliques avec des teneurs variables d'un extrait à un autre.

L'extrait brut hydrométhanolique contient les teneurs les plus élevées en polyphénols totaux avec une teneur de 19967,2 µg EAG/ mg E, suivi de l'extrait aqueux (15804,8 µg EAG/ mg E) et enfin l'huile essentielle (3902,8 µg EAG/ mg E). Tandis que la teneur la plus élevée en flavonoïdes estimée à 4250 µg EC / mg E a été enregistrée dans l'huile essentielle suivie de l'extrait brut eau-méthanol (318,8 µg EC / mg E) alors que l'extrait aqueux renferme la plus faible teneur en flavonoïdes (223,6µg EC / mg E).

A partir de ces résultats nous constatons que :

- Les extraits bruts renferment des taux très élevés en polyphénols alors qu'ils sont pauvres en flavonoïdes.
- Contrairement aux extraits bruts, l'huile essentielle est la plus riche en flavonoïdes en contenant une quantité plus au moins élevée en polyphénols totaux.
- Parmi les extraits étudiés, l'extrait brut hydrométhanolique est plus riche en polyphénols.

6. Aromatogramme :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits bruts et des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* réalisée par la méthode de diffusion en disque sur gélose. Cette méthode permet d'observer des halos d'inhibition autour du disque imprégné du produit testé. La taille de ces halos, mesurée en millimètres, reflète l'efficacité antimicrobienne du composé. Selon la classification couramment utilisée (**Abdoul-Latif et al., 2020**), un diamètre supérieur à 20 mm traduit une **bonne sensibilité** du micro-organisme, entre 12 et 20 mm une **sensibilité modérée**, et inférieur à 12 mm une **résistance** ou une **faible sensibilité**.

On a utilisé le DMSO comme contrôle négatif, et la gentamicine comme contrôle positif pour les bactéries et l'amphotéricine B pour la levure.

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits obtenus et des huiles d'*Eucalyptus camaldulensis* vis-à-vis les souches sélectionnées, sont regroupés dans le **Tableau 6**.

Tableau 6: Diamètres d'inhibition (mm) des extraits bruts et l'huile essentielles vis-à-vis les différentes souches bactériennes et levuriennes.

Souches Extractions	Aqueux	Eau/MeOH	Huile essentielle	Gentamicine Ou Amphotéricine B
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	25	30	28	45
<i>E.coli</i> ATCC 35218	14	15	23	30
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	12	/	25	21
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 29213	8	12	21	28
<i>C.albicans</i> ATCC 26790	/	16	24	30

D'après les résultats mentionnés dans le tableau ci-dessus nous constatons que :

-L'huile essentielle testée a démontré une forte activité sur toutes les souches étudiées avec des zones d'inhibition allant de 21 à 28 mm de diamètre.

- L'extrait aqueux, possède un effet antimicrobien important contre *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 25mm, un effet modéré contre *k.pneumoniae* et *E.coli* avec des zones d'inhibition de 12 et 14 mm respectivement. En revanche, cet extrait n'a pas d'effet sur *Candida albicans*.

Quant à l'extrait hydrométhanolique qui a montré une excellente activité vis-à-vis *S.aureus* tout en montrant un effet modéré vis-à-vis *E.coli*, *P.aeruginosa* alors qu'il n'exerce aucun effet sur *K.pneumoniae*.

-*S.aureus* révèle une extrême sensibilité vis-à-vis les deux extraits et l'huile essentielle testés.

-La gentamicine, antibiotique à large spectre servi comme contrôle positif, présente des diamètres d'inhibition élevés par rapport à nos extraits vis-à-vis de toutes les souches testées.

-L'amphotéricine B un antifongique puissant utilisé comme témoin négatif semble être plus efficace en regard de nos extraits vis-à-vis la levure testée.

En revanche, le DMSO utilisé comme contrôle négatif ne présente aucun effet antibactérien ou antifongique.

Dans une perspective similaire, d'après les recherches de **Traore et al.,(2013)** menées sur l'*Eucalyptus globulus* la souche *S.aureus* se révèle être la plus sensible cela se définit par la sensibilité des bactéries à Gram positif contrairement aux bactéries à gram négatif qui sont moins sensibles aux effets des extraits et des huiles essentielles des plantes en raison de la présence de la membrane externe au sein de leur paroi cellulaire (**Ratledge et wilkinson,1988**). Limitant la diffusion des composés hydrophobes à travers sa couche lipo-polysaccharidique (**Burt, 2004; Vaara,1992**).

Nos résultats concordent avec les travaux de **Cimanga et al., (2002)** qui avaient rapporté que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* avait une bonne activité microbienne, contrairement aux résultats obtenus par **Prabuseenivasan et ses collaborateurs en 2006**, qui ont constaté que l'huile essentielle d'*Eucalyptus* n'a montré aucune activité inhibitrice à l'égard des bactérie à Gram négatif et à Gram positif.

7. Évaluation de la capacité des souches à former des biofilms :

Le **Tableau 7** représente une estimation du potentiel de formation du biofilm après une mesure de DO à 570 nm.

Tableau 7: Croissance en biofilm des souches sélectionnées.

	DO du témoin	DO de la croissance	Potentiel de la formation du biofilm
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	0,416	2,74	Fortement formatrice
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 29213	0,218	1,832	Fortement formatrice
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	0,691	1,78	Moyennement formatrice
<i>E.coli</i> ATCC 35218	0,478	2,51	Fortement formatrice
<i>C.albicans</i> ATCC 26790	0,331	1,63	Fortement formatrice

Selon le **Tableau 7**, il est notable que toutes les souches étudiées ont la capacité de former un biofilm, avec des potentiels qui varient. La souche *S. aureus* présente le potentiel le plus élevé pour la formation du biofilm, avec une valeur de DO estimée de 2,74, ce qui permettrait de la classer comme une souche hautement génératrice de biofilm.

Selon **Boukera Abbaci et Daoudi (2019)**, la DO de 88,7% des souches de *S. aureus* examinées est supérieure à celle du témoin, ce qui indique un potentiel à former du biofilm. En outre, plus de 40% de ces souches affichent une valeur de DO quatre fois supérieure à celle du témoin, ce qui correspond avec nos perceptions selon lesquelles cette souche est fortement formatrice de biofilm.

Les bactéries à Gram négatif : *P.aeruginosa* et *E.coli* sont capables de produire le biofilm avec des valeurs de DO prédites de 1,83 et 2,51 respectivement. La souche *K.pneumoniae* est moyennement productrice du biofilm. Alors que, la levure *Candida albicans* présente un fort pouvoir à produire du biofilm.

8. Inhibition de la formation des biofilms par les extraits bruts et l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* :

Pour évaluer l'effet antibiofilm des extraits bruts et de l'huile essentielle obtenus à partir des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* nous avons choisi 3 souches dont une bactérie à Gram positif (*S.aureus* ATCC 29213), une bactérie à Gram négatif (*E.coli* ATCC 35218) et une levure (*C.albicans* ATCC 26790).

Les résultats illustrant l'effet de l'huile essentielle, l'extrait aqueux et l'extrait hydrométhanolique d'*Eucalyptus camaldulensis* sur l'inhibition de la formation des biofilms mono- et multi-espèces formé par les trois souches choisies sont représentés sur la **Figure 11,12 et 13** respectivement :

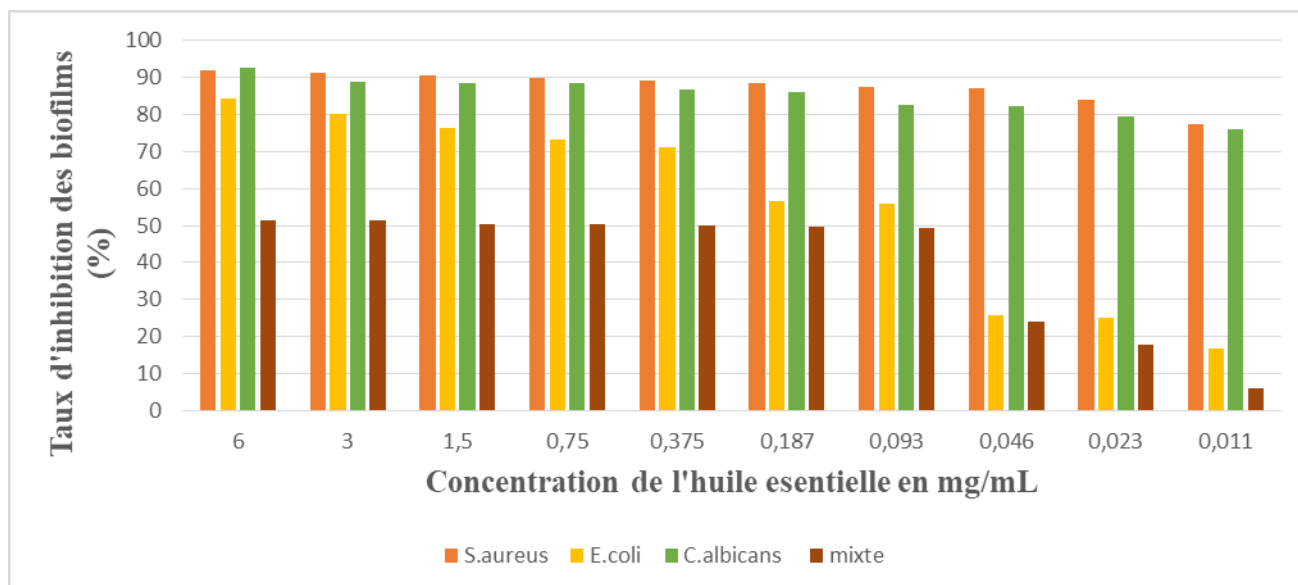


Figure 11: Activité anti-biofilm de l'huile essentielle *d'Eucalyptus camaldulensis*.

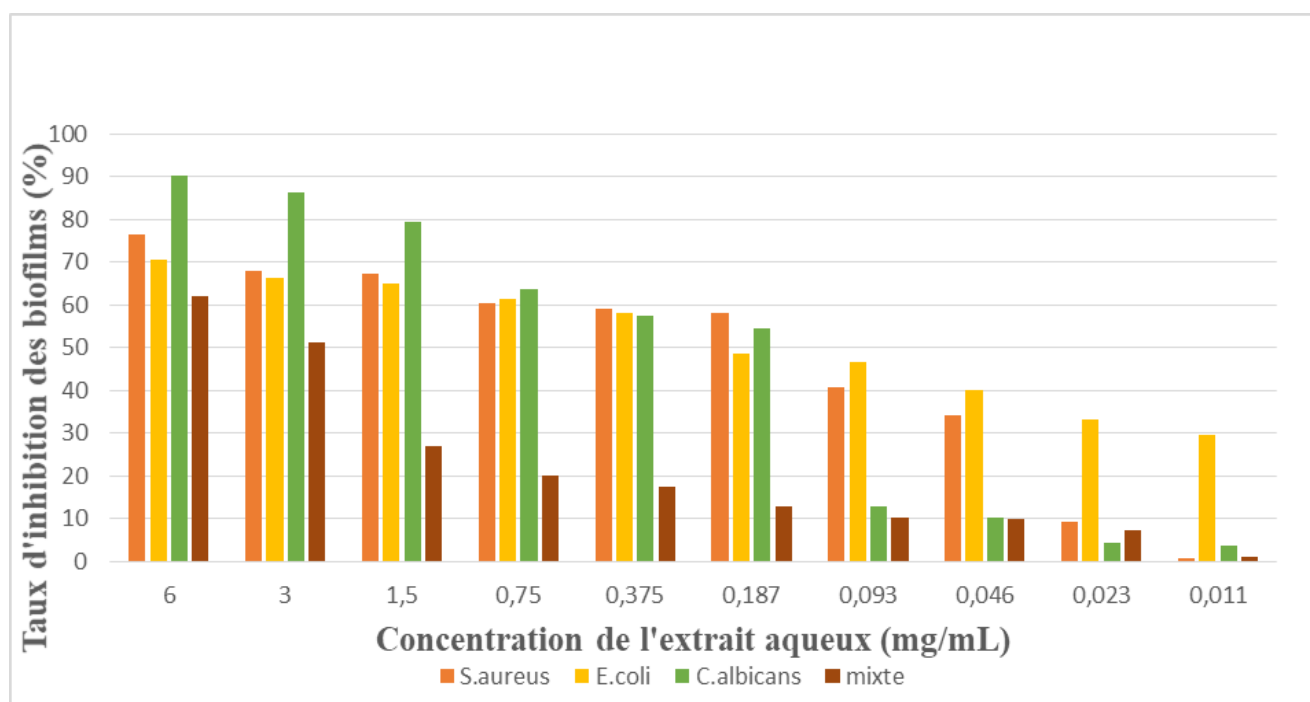


Figure 82: Activité anti-biofilm de l'extrait aqueux *d'Eucalyptus camaldulensis*.

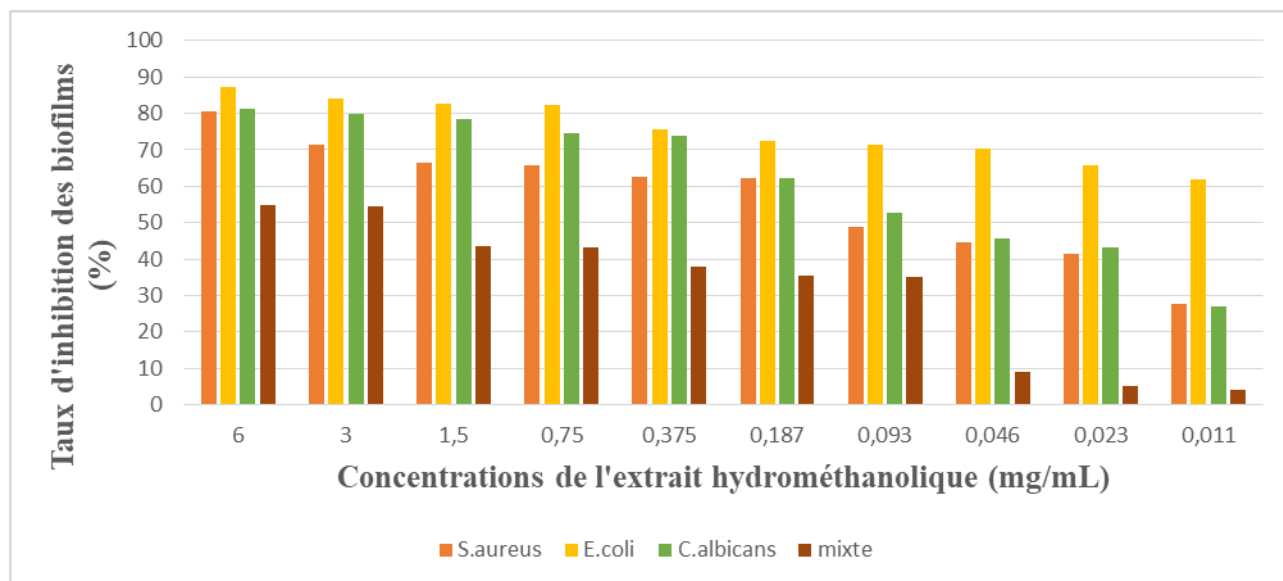


Figure 13: Activité anti-biofilm de l'extrait hydrométhanolique d'*Eucalyptus camaldulensis*.

Les données présentées dans la figure 11 ont démontré que :

- L'huile essentielle d'*Eucalyptus* a affiché le un taux d'inhibition élevé dans le premier puits, à une concentration de 6 mg/mL.
- Pour *Candida albicans*, un taux d'inhibition de 92, 65% a été observé, suivi d'un taux de 91,99% pour *Staphylococcus aureus* et un taux de 84,38 pour *Escherichia coli*.
- En ce qui concerne le biofilm mixte, un pourcentage d'inhibition plus bas de près de 50% a été constaté.

Les observations faites correspondent aux informations de l'aromatogramme (**Tableau 4**), indiquant que l'huile essentielle est efficace contre les trois souches choisies. Cette efficacité de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* est due à sa richesse en 1,8 Cinéole qui est un mono-terpène cyclique éther capable d'agir sur la membrane cytoplasmique des bactéries (**Sadlon et Lamson, 2010**).

Les résultats affichés dans les figures 12 et 13 révèlent que les deux extraits ont un effet antibiofilm significatif sur tous les biofilms formés par les différentes souches.

A une concentration de 6 mg/mL l'extrait aqueux est plus efficace contre les biofilms formés par *Candida albicans* et les biofilms mixtes. En revanche l'extrait hydrométhanolique se révèle plus puissant contre les biofilms formés par les biofilms formés par *S.aureus* et *E.coli*.

En outre, les figures 12 et 13 montrent que la biomasse des biofilms multi-espèces qui se forme suite à l'inhibition par les extraits bruts d'Eucalyptus est plus importante que celle des biofilms mono-espèces, à des concentrations identiques. D'après les résultats de **Seghir et ses collaborateurs en 2015**, la biomasse des biofilms formés varie selon les souches et les espèces.

L'effet antibactérien de la plante d'*Eucalyptus* est attribué à sa composition en huiles essentielles, phénols, flavonoïdes et tanins, considérés comme des antibiotiques naturels pour plusieurs microorganismes infectieux (**Pandey et Singh, 2014**).

Conclusion

Notre travail est basé sur une étude phytochimique et l'évaluation de l'activité anti-biofilm des extraits bruts et de l'huile essentielle d'une plante populaire et largement utilisée dans la médecine traditionnelle nommée *Eucalyptus camaldulensis*.

Cette activité a été évaluée sur des souches de références capables de former des biofilms.

D'après les résultats obtenus on peut tirer les conclusions suivantes :

-Les tests phyto-chimiques ont montré que les extraits obtenus à partir des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* diffèrent légèrement dans leur composition en métabolites secondaires ce qui explique les variations observées dans l'activité anti-biofilm sur les mêmes souches.

-Parmi les extraits testés l'huile essentielle, qui possède une bonne efficacité contre la croissance planctonique de toutes les souches étudiées ainsi que la formation des biofilms par ces souches, cela n'exclut pas que même les extraits bruts ayant une activité antibactérienne et anti-biofilm remarquables.

- Les souches étudiées ont réagi de manière différente à l'huile essentielle et aux extraits bruts issus de la plante étudiée avec une des pourcentages d'inhibitions variables.

- L'inhibition des biofilms multi-espèces est plus complexe que celle des biofilms constitués d'une seule espèce, ce qui se traduit par un taux d'inhibition généralement inférieur pour ces derniers.

Ce travail mérite d'être enrichi, à l'avenir, en proposant les perspectives suivantes :

-Analyser les composants et la toxicité de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus*.

- Étudier l'inhibition des biofilms au cours de différents stades de leur formation.

- Évaluation de l'effet anti-biofilm de ces extraits sur des biofilms bactériens déjà formés.

Références bibliographiques

1. Adida, H., Selles, S. M. A., Bey Boumezrag, A., & Draoui, H. (2020). In vitro antibacterial activity of essential oil and aqueous extracts of *Thymus fontanesii* and *Eucalyptus* against subclinical mastitis pathogens. *Journal of Preventive Veterinary Medicine*, *44*(4), 216. <https://doi.org/10.13041/jpvm.2020.44.4.216>.
2. Almatroudi, A. (2025). *Biofilm resilience: Molecular mechanisms driving antibiotic resistance in clinical contexts*. *Biology*, 14(2), Article 165. <https://doi.org/10.3390/biology14020165>
3. Ait M'barek, L., Ait Mouse, H., Tilaoui, M., Jaâfari, A., Aboufatima, R., Chait, A., et al. (2007). Antitumor properties of black seed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(11), 839–847.
4. Ali, B., Al-Wabel, N. A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S. A., & Anwar, F. (2015). Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 601–611. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.05.007>
5. Allewell, N. M. (2016). Introduction to biofilms thematic minireview series. *Journal of Biological Chemistry*, 291(23), 12527–12528.
6. Arnold, R. J., & Luo, J. (2018). *Eucalyptus camaldulensis*. In L. Thomson, B. Doran, & B. Clarke (Eds.), *Trees for life in Oceania: Conservation and utilization of genetic diversity* (pp. 94–99). ACIAR Monograph No. 201. Australian Centre for International Agricultural Research.
7. Atmani-Merabet, G., Fellah, S., & Belkhiri, A. (2020). Comparative study of two *Eucalyptus* species from Algeria: Chemical composition, toxicity, and acaricidal effect on *Varroa destructor*. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 33(3), 144–148.
8. Atmani-Merabet, G. (2018). *Huiles essentielles de trois espèces d'Eucalyptus d'Algérie : Composition et activité acaricide (Varroa destructor)* [Thèse de doctorat, Université Constantine 1, Algérie].
9. Bamayi, H., Kolo, L., Okogun, I. I., & Ijah, U. J. J. (2004). The antimicrobial activities of methanol extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Journal of Nigerian Society of Experimental Biology*, 16(2), 106–111.
10. Batish, D. R., Singh, H. P., Kohli, R. K., & Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12), 2166–2174.

11. Belyagoubi, N. (2012). *Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien* [Thèse de doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen]. <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bitstream/112/2006/1/Activite-antioxydante-desextraits-des-composes-phenoliques.pdf> (consulté le 01 février 2020)
12. Betyna, M., Zieliński, E., Zieliński, M., Motylewski, B., Skalski, D., & Brzoskowska, K. (2016). Phytotherapy – History and modern use, examples of application in treatment and everyday products. Kazimierz Wielki University; Nicolaus Copernicus University; Academy of Physical Education and Sport. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4546171>
13. Bigendako, M. J. (2004). *Identification et zonage des Eucalyptus globulus au Rwanda*. Chemonics International Inc., projet ADAR.
14. Böhning, J., Tarafder, A. K., & Bharat, T. A. M. (2024). Le rôle des molécules matricielles filamenteuses dans la formation de l'architecture et des propriétés émergentes des biofilms bactériens. *Biochemical Journal*, 481(4), 245–263.
15. Boukera Abbaci, Y., & Daoudi, N. (2019). *Étude du potentiel de formation du biofilm par les staphylocoques isolés des infections animales et humaines* [Mémoire de fin d'étude, Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana].
16. Bouopda Tamo, S. P., & Mundene-Timothée, J. L. (2023). Pharmacognosy, phytotherapy and modern medicine. *International Journal on Infectious Disease and Epidemiology*.
17. Bouyahya, F., Guaouguaou, E., Dakka, N., & Bakri, Y. (2018). Quorum sensing : une nouvelle cible anti-infectieuse des plantes médicinales. *Phytothérapie*, 16, 365–373.
18. Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., Abrini, J., & Dakka, N. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>
19. Bouvet, J. (2013). *Les eucalyptus dans le monde : L'eucalyptus, une essence majeure pour le reboisement à Madagascar*. Université d'Antananarivo. <https://www.foretsbiodiv.org/content/download/4326/32221/version/1/file/12>. Eucalyptus dans le monde.
20. Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253.
21. Chia-Suei, H., & Jeffrey, P. (2009). Emerging concepts of biofilms in infectious diseases. *Missouri Medicine*, 106(4), 292–296.

22. Cimanga, K. K., Kambu, T., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., & Vlietinck, A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 213–220.
23. Costerton, J. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11, 217–221.
24. Daroui-Mokaddem, H. (2012). *Étude phytochimique et biologique des espèces : Eucalyptus globulus (Myrtaceae), Smyrniolus olusatrum (Apiaceae), Asteriscus maritimus et Chrysanthemum trifurcatum (Asteraceae)* [Thèse de doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba].
25. Diana, C., Carmen, L., Cornel, C., Mariana, C., Teodora, C., Petre, I., Ioana, N., & Irina, Z. (2021). Contribution of essential oils to the fight against microbial biofilms—A review. *Processes*, 9(3), 537. <https://doi.org/10.3390/pr9030537>
26. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881–890.
27. Dupin, A. (2017). *Intérêts des huiles essentielles dans la lutte contre l'antibiorésistance induite par les biofilms* [Thèse de doctorat].
28. Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056.
29. Ghazay, F. A., & Bukhari, M. A. (2021). Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *American Journal of Biomedical Research*. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2021.12.001820>.
30. Ghozlane, B., Rahim, N., Boulebd, H., Bramki, A., Andolfi, A., Salvatore, M. M., & Masi, M. (2024). Chemical composition, in silico investigations and evaluation of antifungal, antibacterial, insecticidal and repellent activities of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. leaf essential oil from Algeria. *Plants*. <https://doi.org/10.3390/plants13223229>
31. Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. In Springer (pp. 147–180). https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-2-8178-0058-5_7 (consulté le 30 janvier 2020).
32. Grec, J. (1996). *L'érosion, la défense et la restauration des sols, le reboisement en Algérie* (p. 275–281). Alger.
33. Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2015). Biofilm, pathogenesis and prevention—A journey to break the wall: A review. *Archives of Microbiology*, 198, 1–15.

34. Haras, D. (2005). Biofilms et altérations des matériaux: de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*, 93, s-27.
35. Henrici, A. T. (1933). Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology*, 25(3), 277.
36. Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. Ø., & Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 55–65.
37. Inouye, S., & Abe, S. (2007). Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5, 2–4.
38. Institut National de Recherche Forestière. (1996). *La forêt algérienne* (pp. 275–281). Bainem, Alger.
39. Jenkins, D. R. (2021). Nosocomial infections and infection control. *Medicine*, 49(10), 638–642. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.07.007>
40. Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles : qualilogie et aromathérapie ; entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Springer.
41. Kchich, O. (2018). *Prise en charge des infections ostéo-articulaires sur matériel d'ostéosynthèse (à propos de 22 cas)* [Thèse de doctorat en médecine, Faculté de Médecine et Pharmacie, Maroc].
42. Kordmahaleh, F. A., & Shalke, S. E. (2013). Bacterial biofilms: Microbial life on surfaces. *Journal of Biology*, 2(5), 242–248.
43. Laadel, N. (2014). *Impact de la faune entomologique sur le dépérissement de l'Eucalyptus camaldulensis dans les régions de Sétif et Bordj Bou Arréridj* [Thèse de magister, Université Ferhat Abbas, Sétif].
44. Lalitkumar, K. V., Gholap, A. D., Hatvate, N. T., Naren, P., Khan, S., Chavda, V. P., Balar, P. C., Gandhi, J., & Khatri, D. K. (2024). Essential oils for clinical aromatherapy: Comprehensive review. *Journal of Ethnopharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2024.118180>
45. Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Lucet, J. C. (2014). Physiopathologie et prévention des infections liées aux dispositifs médicaux implantés. *La Revue du Praticien*, 64(5), 620–625.
46. Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Tolérance des biofilms aux antibiotiques : comprendre pour mieux traiter. *Journal des Anti-infectieux*, 16(3), 112–121.

47. Lewandowski, Z., & Evans, L. V. (2000). Structure et fonction des biofilms. In *Biofilms : Avancées récentes dans leur étude et leur contrôle* (p. 466). Academic Press.
48. López, D., Vlamakis, H., & Kolter, R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(7), a000398.
49. Mariani, E. O., Mariani, C. E., & Lipinsky, S. B. (1981). Tropical eucalyptus. In T. A. McClure & J. E. S. Lipinsky (Eds.), *CRC Handbook of Biosolar Resources* (Vol. II, pp. 373–386). CRC Press.
50. Marwan, A., Corinne, B., Pascal, D., & Nour-Eddine, C. (2019). Les biofilms et l'hygiène des surfaces en milieu hospitalier et alimentaire.
51. McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: Mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 39–50.
52. Medeiros, A. C. D. A. P. (2016). *Étude expérimentale de la formation des biofilms sous conditions hydrodynamiques contrôlées* [Thèse de doctorat].
53. Mekkelch, H. (2015). *Contribution à l'étude morphométrique d'Eucalyptus globulus Labill (Myrtaceae) dans la région de Tlemcen* [Mémoire de Master, Université Aboubaker Belkaid].
54. Meziane, H. (1996). L'eucalyptus en Algérie : Un arbre controversé en forêt algérienne (No. 1). I.N.R.F., Bainem.
55. Misganaw, G. A. (2022). Phytochemical analysis of some selected traditional medicinal plants in Ethiopia. *Bulletin of the National Research Centre*. <https://doi.org/10.1186/s42269-022-00770-8>.
56. Mohamed, A. A., & Alotaibi, B. M. (2023). Essential oils of some medicinal plants and their biological activities: A mini review. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 9, 40–49. <https://doi.org/10.1007/s43994-022-00018-1>
57. Oyen, L. P. A., & Lemmens, R. H. M. J. (2002). *Ressources végétales de l'Afrique tropicale* (Vol. 14). Programme PROTA, Wageningen.
58. Panahi, Y., Sattari, M., Babaie, A. P., Beiraghdar, F., & Ranjbar, R. (2011). The essential oils activity of *Eucalyptus* spp. on *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 10(1), 43.
59. Pandey, B., & Singh, S. (2014). Evaluation of antimicrobial potential of *Eucalyptus camaldulensis* L. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(3), 166–171.

60. Pereira, R., Fontenelle, R. O. S., Brito, E. H. S., & Morais, S. M. (2020). Biofilm of *Candida albicans*: Formation, regulation and resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 131(1), 11–22. <https://doi.org/10.1111/jam.14949>
61. Phillips, P. L., Wolcott, R. D., Fletcher, J., & Schultz, G. S. (2010). Biofilms made easy. *Wounds International*, 1(3), 12.
62. Pierre, G. (2010). *Caractérisation biochimique d'exopolymères d'origine algale du bassin de Marennes-Oléron* [Thèse de doctorat, Université de La Rochelle].
63. Poupon, H. (1972). *Description des appareils aérien et souterrain d'Eucalyptus camaldulensis*. FAO.
64. Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Résistance au biofilm fongique. *Revue Internationale de Microbiologie*.
65. Rameau, J. C., Mansion, D., Dume, G., & Gauberville, C. (2008). *Flore forestière française. Tome 3 : Région méditerranéenne*. Institut pour le Développement Forestier.
66. Rathinam, P., Antony, S., Reshmy, R., Madhavan, A., Binod, P., Pandey, A., & Sindhu, R. (2022). Biosurfactant as an intervention for medical device associated infections. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science: Biomedical Application of Biosurfactant in Medical Sector* (pp. 451–465). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85146-6.00007-3>
67. Ratledge, C., & Wilkinson, S. G. (1988). An overview of microbial lipids. In C. Ratledge & S. G. Wilkinson (Eds.), *Microbial Lipids* (Vol. 1, pp. 3–22). Academic Press.
68. Romano, C. L., Romano, D., Morelli, I., & Drago, L. (2017). The concept of biofilm-related implant malfunction and low-grade infection. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 971, 1–13.
69. Roux, A., & Ghigo, J.-M. (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 261.
70. Sadlon, A. E., & Lamson, D. W. (2010). Immune-modifying and antimicrobial effects of eucalyptus oil and simple inhalation devices. *Alternative Medicine Review*, 15(1), 33–47.
71. Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., & Gupta, A. (2016). Phytochemistry of medicinal plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1. Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Sari-Belkharroubi, L., & Anselme-Bertrand, I. (2015). Évaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre *Candida albicans* et des bactéries isolées de cathéters. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 123–129.

72. Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G. C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M. R., Ademiluyi, A. O., Sharifi-Rad, R., Ayatollahi, S. A., & Iriti, M. (2017). Biological activities of essential oils: From plant chemoecology to traditional healing systems. *Molecules*.
73. Silva, N. C. C., & Fernandes Júnior, A. (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16(3), 402–413.
74. Steflitsch, W., & Steflitsch, M. (2008). Clinical aromatherapy. *Journal of Men's Health*, 5(1), 2–4.
75. Suzuki, Y., Kaji, S., Nisjiyama, M., & Iguchi, A. (2015). Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from river water in Japan to antipseudomonal agents. *Science of the Total Environment*, 450–451, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.011>
76. Takahashi, T., Kokubo, R., & Sakaino, M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in Applied Microbiology*, 39(1), 60–64.
77. Tesche, S., & Metternich, F. (2008). The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis. *Archives of Otorhinolaryngology*, 265(11), 1355–1359.
78. Thierry, J. (2008). Biofilms bactériens. *Ingénieur, Towards Antimicrobial Peptides*, 3, 1–4.
79. Touhami, A. (2017). *Étude chimique et microbiologique des huiles essentielles de différents genres Thymus récoltés dans l'est algérien* [Mémoire de Master, Université Badji Mokhtar, Annaba].
80. Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56(3), 395–411.
81. Vladimir, P., Julia, Z., Elena, L., Natalia, Z., Alexander, K., & Inessa, K. (2013). Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 121, 1073–1081.
82. Warot, S. (2006). *Les Eucalyptus utilisés en aromathérapie* [Mémoire de fin de formation en phyto-aromathérapie].
83. Weber, D. J., Rutala, W. A., Anderson, D. J., & Sickbert-Bennett, E. E. (2023). Biofilms on medical instruments and surfaces: Do they interfere with reprocessing and disinfection? *American Journal of Infection Control*, 51(11), A114–A119. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2023.04.158>

84. Wang, X., Liu, M., Yu, C., Li, J., & Zhou, X. (2023). Biofilm formation: Mechanistic insights and therapeutic targets. *Molecular Biomedicine*, 4, Article 49.