

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة مولاي الطاهر، سعيدة

Université MOULAY Tahar, Saïda



كلية علوم الطبيعة و الحياة

N° d'Ordre

Faculté des Sciences de la nature et de la vie

قسم البيولوجيا

Département de Biologie

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master

En Biochimie Appliquée

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Mécanismes d'action antimicrobienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

Présenté par :

■ Mr : HADJEM Mustapha

Soutenu le : 24/09/2025

Devant le jury composé de :

Président

Mme. BENABDESLEM
Yasmina

MCA Université USMT

Examineur

Mme. AMARA Sabrina

MCB Université USMT

Rapporteur

Mr. HALLA Nouredinne

MCA Université USMT

Année universitaire 2024/2025

Dédicaces

À **ma famille** toute entière, source de force et de stabilité, pour leur amour inconditionnel et leur présence constante dans ma vie.

À **mes parents bien-aimés**, piliers de mon existence, et en particulier à mon cher **père**, qui a toujours cru en moi, m'a soutenu dans chacun de mes choix et m'a encouragé à persévérer dans toutes mes démarches.

À **mes frères et sœurs**, pour leur indulgence, leur compréhension et pour cette affection profonde que je garde pour chacun d'eux.

À **mes amis**, pour leur compagnie fidèle, leur soutien sincère et les moments de joie partagés ensemble.

Enfin, à **une personne très spéciale**, celle qui se cache derrière les lignes et qui n'apparaît qu'aux yeux de celle qui doit comprendre, dont la présence discrète mais constante a illuminé mes jours. Elle a su me rappeler, dans les hauts comme dans les bas, que la force se nourrit de la confiance et de l'amour silencieux. À toi qui sauras te reconnaître, merci d'avoir cru en moi et de ne jamais m'avoir laissé me sentir seul. Merci pour ta lumière dans mes ombres, pour cette voix silencieuse qui m'élève quand je chancelle, pour avoir toujours cru en mes pas avant même que je les fasse. Tu es ce sourire invisible qui m'accompagne et que nul autre ne peut déchiffrer.

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à **M. Halla Nourredine**, mon encadrant, pour son accompagnement, ses précieux conseils et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Mes sincères remerciements vont également à **Mlle Tazi Lamia Abir**, doctorante en microbiologie, et à **Mlle Baghdad Chaimaa**, doctorante en biochimie, pour leur aide, leur soutien et leurs orientations qui m'ont été d'un grand apport.

J'adresse aussi mes vifs remerciements au jury, en particulier à **Mme Benabdesslem Yasmina**, pour toutes les facilités accordées et pour avoir bien voulu accepter de présider ce jury, ainsi qu'à **Mme Amara Sabrina**, examinatrice, pour l'intérêt porté à ce travail.

Enfin, j'adresse mes plus profonds remerciements à ma famille, qui a toujours été présente à mes côtés et dont le soutien moral et matériel a été indispensable à l'aboutissement de ce mémoire.

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	10
Tableau 2: Les composés volatils présents en pourcentage pour chaque classe de composés.	11
Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques et biochimiques des souches bactériennes utilisées :	21
Tableau 4 : Essais antimicrobiens réalisés avec l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	25
Tableau 5 : Critères d'interprétation de l'effet antimicrobien.....	29
Tableau 6 : Valeurs de CMI, CMB et rapport CMB/CMI de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> contre différentes souches bactériennes	37
Tableau 7 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> et comparaison avec l'acide ascorbique (contrôle positif).	38

Liste des figures

Figure 1: feuilles d' <i>Eucalyptus globulus</i>	6
Figure 2: l'écorce de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	7
Figure 3 : les feuilles d' <i>Eucalyptus globulus</i> après la récolte	17
Figure 4 : les feuilles d' <i>Eucalyptus globulus</i> après découpage	18
Figure 5 : le montage d'extraction de type Clevenger	20
Figure 6 : Micro-organismes étudiés	22
Figure 7 : Préparation de milieu de culture Mulher-Hinton	23
Figure 8 : Test de diffusion sur disque	26
Figure 9 : L'huile essentielle extraite d' <i>Eucalyptus globulus</i>	34
Figure 10 : Sensibilité des souches bactériennes testées	35
Figure 11 : L'activité antioxydante (% d'inhibition DPPH) en fonction des concentrations de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> et de l'acide ascorbique (contrôle).....	39
Figure 12 : Test de DDPH	40

Résumé

Ce travail a porté sur l'étude des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. L'extraction par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement variant de 3,1 % à 3,8 % selon le temps d'extraction. Les tests antimicrobiens réalisés par microdilution en bouillon ont montré une activité significative, particulièrement contre les bactéries Gram-positives, avec des rapports CMB/CMI majoritairement ≤ 4 , indiquant un effet bactéricide. Les analyses cinétiques et de perméabilisation membranaire ont révélé que le mode d'action repose sur l'altération de la membrane cellulaire et l'induction d'un stress oxydatif intracellulaire.

Par ailleurs, l'huile essentielle a présenté une activité antioxydante dose-dépendante dans le test DPPH, avec un IC_{50} de 0,55 mg/mL, confirmant la contribution de ses monoterpènes oxygénés. Bien que cette activité soit inférieure à celle de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,21$ mg/mL), elle reste significative et susceptible de renforcer l'efficacité antimicrobienne par un effet synergique.

Ces résultats suggèrent que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* représente une ressource naturelle bioactive prometteuse, offrant des perspectives d'application dans le domaine thérapeutique, notamment comme alternative ou adjuvant aux antimicrobiens classiques face au défi croissant de la résistance bactérienne.

Mots clés : Huile essentielle , *Eucalyptus globulus* , Propriétés antimicrobiennes , Propriétés antioxydantes , Hydrodistillation , Résistance bactérienne.

Abstract

This study focused on the antimicrobial and antioxidant properties of *Eucalyptus globulus* essential oil. Extraction by hydrodistillation yielded between 3.1% and 3.8%, depending on the extraction time. Antimicrobial tests performed by broth microdilution revealed significant activity, particularly against Gram-positive bacteria, with CMB/CMI ratios mostly ≤ 4 , indicating a bactericidal effect. Kinetic and membrane integrity assays demonstrated that the mode of action involves cell membrane disruption and induction of intracellular oxidative stress.

Moreover, the essential oil exhibited a dose-dependent antioxidant activity in the DPPH assay, with an IC_{50} value of 0.55 mg/mL, confirming the contribution of its oxygenated monoterpenes. Although this activity was lower than that of ascorbic acid ($IC_{50} = 0.21$ mg/mL), it remained significant and could enhance antimicrobial efficacy through a synergistic effect.

These findings suggest that *Eucalyptus globulus* essential oil is a promising bioactive natural resource, offering potential applications in the therapeutic field, particularly as an alternative or adjuvant to conventional antimicrobials in response to the growing challenge of bacterial resistance.

Keywords: Essential oil, *Eucalyptus globulus*, Antimicrobial properties, Antioxidant properties, Hydrodistillation, Bacterial resistance.

ملخص

تتمحور هذه الدراسة حول الخصائص المضادة للميكروبات والقدرات المضادة للأكسدة لزيت الاوكالبتوس او زيت الكينا (*Eucalyptus globulus*). أظهرت عملية الاستخلاص بالتقطير المائي مردوداً تراوح بين 3,1% و 3,8% تبعاً لمدة الاستخلاص. أبانت اختبارات التخفيف المجهرية في الوسط السائل عن نشاط ملحوظ خاصة ضد البكتيريا إيجابية الغرام، حيث كانت نسبة CMB/CFI في معظم الحالات ≥ 4 مما يشير إلى تأثير قاتل للبكتيريا. كما أظهرت الاختبارات الحركية وتجارب سلامة الغشاء أن آلية الفعل ترتبط باضطراب الغشاء الخلوي وإحداث إجهاد أكسدي داخلي. إضافة إلى ذلك، برهن الزيت العطري على نشاط مضاد للأكسدة يعتمد على التركيز في اختبار DPPH ، حيث بلغت قيمة IC_{50} حوالي 0.55 mg/mL ، مؤكداً دور المونوتربينات المؤكسجة في هذا النشاط. وعلى الرغم من أن هذا النشاط كان أقل من نشاط حمض الأسكوربيك ($IC_{50} = 0.21 \text{ mg/mL}$) ، إلا أنه ظل معتبراً وقد يسهم في تعزيز الفعالية المضادة للميكروبات من خلال تأثير تآزري.

تشير هذه النتائج إلى أن زيت *Eucalyptus globulus* يمثل مورداً طبيعياً واعداءً، مع إمكانيات تطبيقية في المجال العلاجي، خاصة كبديل أو كمساعد للمضادات الحيوية التقليدية في مواجهة التحدي المتزايد لمقاومة البكتيريا. **الكلمات المفتاحية :** الزيت العطري، الكافور (*Eucalyptus globulus*) ، الخصائص المضادة للميكروبات، الخصائص المضادة للأكسدة، التقطير المائي، مقاومة البكتيريا.

Table des matières

PARTIE I. INTRODUCTION	1
PARTIE II. REVUE DE LA LITTERATURE	4
II.1. <i>Eucalyptus globulus</i> :	5
II.1.1. .Origine et répartition géographique :	5
II.1.2. Description botanique de <i>l'Eucalyptus globulus</i> :	5
II.1.3. Composition chimique de ses huiles essentielles :	7
II.2. Propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles:	8
II.2.1. Mécanismes généraux d'action des huiles essentielles :	8
II.2.2. Principaux composés bioactifs de <i>l'Eucalyptus globulus</i> :	9
II.3. Mécanismes d'action contre les microorganismes :	11
II.3.1. Effets sur les parois et membranes bactériennes :	11
II.3.2. Inhibition des processus intracellulaires :	11
II.3.3. Induction du stress oxydatif et son rôle dans l'inhibition microbienne:	12
II.4. L'effet de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus</i> sur divers problèmes de santé:	14
PARTIE III. MATERIEL ET METHODES	16
III. Matériel et méthodes :	17
III.1. Collecte et préparation des huiles essentielles :	17
III.1.1. Origine du matériel végétal :	17
III.1.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation (Clevenger) :	18
III.2. Souches microbiennes et conditions de culture :	20
III.2.1. Micro-organismes étudiés :	20
III.2.2. Milieu de culture et conditions de croissance :	23
III.3. Tests d'activité antimicrobienne :	23
III.3.1. Test de diffusion sur disque (Kirby–Bauer) :	23
III.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) :	26
III.3.3. Analyse cinétique de destruction des microorganismes:	28
III.4. Détermination du type d'effet (bactéricide ou bactériostatique):	28
III.5. Étude de mécanisme d'action :	29
III.5.1. Tests d'intégrité membranaire :	29

III.5.2. Inhibition de la formation de Biofilm par la détermination de la MBIC/MBEC (Cristal violet + CFU):	30
III.5.3. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH :	31
PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION	32
IV.1. Extraction et rendement de l'huile essentielle :	33
IV.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne:	35
IV.2.1. Sensibilité des souches bactériennes testées :	35
IV.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) :	36
IV.3. Activité Antioxydante:	38
IV.3.1. Capacité de piégeage du radical DPPH :	38
IV.4. Potentiel antimicrobien clinique et perspectives :	40
IV.5. Perspectives de recherche :	41
IV.5.1. Études in vivo et toxicité :	41
IV.5.2. Formulation et délivrance ciblée :	41
IV.5.3. Applications combinées :	41
IV.5.4. Applications biomédicales et agroalimentaires :	41
IV.5.5. Études mécanistiques approfondies :	41
PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	43
PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	45

PARTIE I. INTRODUCTION

I. Introduction :

Les effets néfastes de la résistance aux antimicrobiens (RAM) se manifestent déjà dans le monde entier, et toute utilisation d'antimicrobiens, aussi appropriée et prudente soit-elle, contribue au développement de la résistance, mais une utilisation généralisée, inutile et excessive ne fait qu'aggraver la situation **(O'Neill, 2014)**. À partir des données sur les ventes de produits pharmaceutiques fournies par IQVIA, nous estimons les tendances nationales en matière de consommation d'antibiotiques dans 67 pays entre 2016 et 2023, nous estimons la consommation humaine mondiale et projetons sa croissance jusqu'en 2030 en nous basant sur les tendances actuelles. Nous constatons que la consommation estimée d'antibiotiques dans les pays déclarants a augmenté de 16,3 %, passant de 29,5 à 34,3 milliards de doses quotidiennes définies (DDD) entre 2016 et 2023, ce qui reflète une augmentation de 10,6 % du taux de consommation, qui est passé de 13,7 à 15,2 DDD pour 1000 habitants par jour **(Klein et al., 2024)**.

Les effets antimicrobiens des huiles essentielles dérivées des plantes Aromatiques et Médicinales (PAM) sont à la base de nombreuses applications dans divers secteurs générateurs de revenus, tels que les industries pharmaceutiques, nutraceutiques, cosmétiques, parfumières, agronomiques et sanitaires. À l'heure actuelle, de nombreux antibiotiques sont disponibles pour traiter divers pathogènes bactériens. Toutefois, l'augmentation de la multirésistance aux médicaments a entraîné une gravité accrue des maladies causées par les agents pathogènes bactériens. À cet égard, les huiles essentielles végétales et leurs principaux constituants chimiques sont des candidats potentiels en tant qu'agents antibactériens. Plusieurs types d'huiles essentielles et leurs principaux constituants chimiques provenant de divers PAM ont été signalés comme possédant une large gamme de potentiels d'inhibition bactérienne, l'effet de l'activité antibactérienne des huiles essentielles peut inhiber la croissance des bactéries (bactériostatique) ou détruire les cellules bactériennes (bactéricide). **(Swamy et al., 2016)**.

La famille des Myrtaceae comprend 140 genres et environ 3 800 espèces réparties dans les régions tropicales et subtropicales du monde. L'eucalyptus est l'un des genres les plus importants et les plus largement plantés au monde. Il s'agit d'un grand arbre à feuilles persistantes, originaire d'Australie et de Tasmanie, introduit avec succès dans le monde entier et aujourd'hui largement planté dans de nombreux autres pays. Dans la pharmacopée internationale, l'espèce la plus importante et la plus représentée est cependant *Eucalyptus*

globulus (*E. globulus*) qui est le principal fournisseur d'huiles essentielles, ces huiles essentielles sont très demandées sur le marché, car elles trouvent des applications comme anesthésique, anodin, antiseptique, astringent, désodorisant, diaphorétique, désinfectant, expectorant, fébrifuge, fumigant, hémostatique, inhalant, insectifuge, préventif, rubéfiant, sédatif et pourtant stimulant, vermifuge, pour un remède populaire contre les abcès, l'arthrite, l'asthme, les furoncles, la bronchite, les brûlures, le cancer, le diabète, la diarrhée, la diphtérie, la dysenterie, l'encéphalite, l'entérite, l'érysipèle, fièvre, grippe, inflammation, laryngalgie, laryngite, lèpre, malaria, mastite, miasme, pharyngite, phtisie, rhinite, plaies, mal de gorge, spasmes, trachalgie, vers et blessures. **(Bachir et al., 2012).**

L'objectif principal de ce travail est d'évaluer les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, en mettant en évidence ses mécanismes d'action contre cinq souches bactériennes d'importance clinique, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* et *Klebsiella pneumoniae*. L'étude vise à déterminer son efficacité en comparaison avec des agents de référence et à analyser le rôle de ses constituants bioactifs. Cette recherche s'inscrit dans le contexte actuel de la résistance bactérienne, en explorant le potentiel de cette huile comme alternative naturelle ou adjuvant thérapeutique aux antimicrobiens conventionnels.

PARTIE II. REVUE DE LA LITTERATURE

II. Revue de la littérature :

II.1. Eucalyptus globulus :

II.1.1. .Origine et répartition géographique :

L'*Eucalyptus globulus*, appelé aussi Gommier bleu de Tasmanie, a été découvert en 1792 par le botaniste français Jacques-Julien Houtou de La Billardière. Ferdinand von Mueller (1825-1896), directeur du jardin botanique de Melbourne, en Australie, a été le premier à le décrire. Il a été introduit en France en 1804 à la commune de Malmaison (région de Picardie) (**Lardry et al., 2007**)

L'arbre pousse surtout dans les régions chaudes (**Boukhatem et al., 2017**). Il est cultivé de nos jours dans quelques régions subtropicales d'Afrique et d'Asie (Chine, Inde, Indonésie) (**Wichtl et al., 2003**) ; Elle est acclimatée également dans le bassin méditerranéen, en France méridionale, en Espagne, au Portugal, en Italie et en Amérique (**Boukhatem et al., 2017 ; Leicach et al., 2012 ; Brooker et al., 2004**).

II.1.2. Description botanique de l'*Eucalyptus globulus* :

La plupart des espèces d'*Eucalyptus* sont à feuilles persistantes, mais à la fin de la saison sèche, certaines espèces perdent leurs feuilles. Par conséquent, les arbres matures sont généralement très grands et entièrement feuillés, mais l'ombre de leurs feuilles est quelque peu inégale parce qu'elles pendent vers le sol. Sur l'eucalyptus adulte, les feuilles sont souvent lancéolées, pétiolées, cireuses ou vertes brillantes et apparemment alternes, la figure 1 montre clairement des feuilles d'*Eucalyptus globulus*. Contrairement à la plantule, les feuilles sont généralement glauques et opposées, sessiles, mais on peut constater de nombreuses incohérences dans leur figure (**Shailja et al., 2021**).



Figure 1: Feuilles d'*Eucalyptus globulus* (Shailja et al., 2021).

Les fleurs et les fruits qui sont des capsules ou des gommés sont les caractéristiques les plus reconnaissables des espèces d'*Eucalyptus*. Les étamines duveteuses sont présentes en grand nombre sur les fleurs. Ces étamines peuvent être de certaines couleurs et celles-ci sont roses ou rouges, crème, roses, jaunes. Les étamines sont souvent enfermées dans un capuchon appelé opercule et cette situation reste présente dans le bourgeon. L'opercule est composé de pétales ou de sépales soudés. Les fleurs d'eucalyptus n'ont pas de pétales pour se décorer, elles ont de nombreuses étamines. La caractéristique la plus importante qui unit leur genre est que lorsque les étamines se développent, l'opercule est forcé de se détacher (Shailja et al., 2021).

La figure 2 montre l'écorce de l'*Eucalyptus globulus*, qui peut varier en fonction de l'âge de l'arbre. Par conséquent, il n'existe pas de caractéristiques d'identification communes de l'écorce d'*Eucalyptus*, bien que l'écorce soit lisse parce que chaque année l'ancienne écorce sèche et se détache. Il existe également des espèces d'*Eucalyptus* qui ont une écorce multicolore fascinante. Ces espèces sont l'eucalyptus arc-en-ciel (*Eucalyptus deglupta*) originaire de l'Asie du Sud-Est. Il existe d'autres variétés d'eucalyptus dont l'écorce est filandreuse. Dans de nombreuses espèces d'*Eucalyptus*, l'écorce morte est conservée (Shailja et al., 2021).



Figure 2: L'écorce de l'*Eucalyptus globulus* (Shailja et al., 2021).

L'odeur de la feuille d'*Eucalyptus globulus* ressemble à celle de la menthe, elle a un goût vibrant, épicé et rafraîchissant et contient diverses concentrations de minéraux. La cellulose ou les protéines naturellement présentes dans l'*Eucalyptus* sont absentes des fibres synthétiques. L'identification des constituants lipidiques a montré que l'eucalyptus contient beaucoup de cutine et de lipides solubles. L'huile essentielle sécrétée par l'*Eucalyptus* est incolore et possède un goût et une odeur distinctifs. Elles sont également très inflammables et ces huiles contiennent des composés qui sont des désinfectants naturels et des dissuasifs contre les nuisibles (Shailja et al., 2021).

II.1.3. Composition chimique de ses huiles essentielles :

Les analyses des huiles essentielles des feuilles d'*E. globulus* de Bejaia et de Blida (dans le nord de l'Algérie) effectuées par (Harkat et al., 2018) et (Boukhatem et al., 2019) ont enregistré l'eucalyptol (55,29 %), le spathulenol (7,44 %), l' α -terpineol (5,46 %) ; l'eucalyptol (51,08 %), l' α -pinène (24,6 %) comme composés majoritaires, respectivement. Ceci montre que la composition chimique de l'huile essentielle d'*E. globulus* de Saïda est différente de celle des huiles essentielles des deux plantes susmentionnées. De plus, le p-cymène, composant majeur de l'huile essentielle d'*E. globulus* de Saïda, est présent en quantité minime (1,83 %) sous forme

d'ocymène dans l'huile essentielle de Bejaia et est totalement absent dans l'huile essentielle de Blida. Ce composé hydrocarboné monoterpénique est un composant de nombreuses huiles essentielles végétales, notamment l'huile de cumin et de thym, où il a montré des activités biologiques remarquables, telles que des activités antioxydantes, antiinflammatoires, analgésiques et vasorelaxantes, dans l'aorte de rat (**Benabdesslem et al., 2020**).

La composition chimique de l'huile essentielle des feuilles d'*Eucalyptus globulus* de la région de Saïda, au sud-ouest de l'Algérie, l'étude de la composition de l'huile essentielle a été faite par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. L'extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation a donné un rendement de 2,64 %. Un total de 75 composés a été identifié sur le site, parmi lesquels les constituants dominants sont le p-cymène (20,24 %), le spathuléol (14,10 %) et l'eucalyptol (11,30 %). D'autres composés notables identifiés dans l'huile essentielle extraite sont le phellandène, la cryptone, le β thujène, le cuminal, l'élixène et le phellandral (2,54 % - 5,10 %). C'est la première fois que le p-cymène est signalé comme un constituant majeur de l'*E.globulus* algérien. (**Benabdesslem et al., 2020**).

II.2. Propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles:

II.2.1. Mécanismes généraux d'action des huiles essentielles :

Le site d'action désigne la partie de la cellule qui interagit avec les composés, telle que la membrane cellulaire, la paroi cellulaire, les protéines intracellulaires, les enzymes, les acides nucléiques ou les métabolites. Cependant, le mode d'action désigne l'interaction biochimique spécifique qui se produit via l'application d'huiles essentielles sur les champignons et les bactéries qui produit des effets inhibiteurs ou destructeurs (**Mani-López et al., 2021**).

Le mécanisme d'action des huiles essentielles diffère de celui des antibiotiques, dans la mesure où elles inhibent divers composants physiologiques et structurels plutôt qu'une seule cible comme les antibiotiques. Parmi les cibles, on peut citer l'inhibition des membranes cellulaires, des pompes d'efflux, du biofilm et de la motilité. La combinaison de divers mécanismes se complète mutuellement, ce qui conduit à une plus grande inhibition de la croissance bactérienne par rapport aux antibiotiques traditionnels. Cela met en évidence leur potentiel en tant qu'agents alternatifs aux antibiotiques. De plus, il existe des preuves démontrant que les propriétés antibactériennes des huiles essentielles peuvent être renforcées lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec d'autres agents, tels que les huiles essentielles et les antibiotiques (**Elangovan et al., 2023**).

Le mode d'action des huiles essentielles (HE) dépend de leur profil chimique et du rapport de leurs composants actifs. Les mécanismes possibles par lesquels les HE interfèrent avec la prolifération bactérienne peuvent impliquer les éléments suivants : (1) la désintégration de la membrane externe bactérienne ou de la bicouche phospholipidique, (2) l'altération de la composition en acides gras, (3) l'augmentation de la fluidité membranaire entraînant une fuite d'ions potassium et de protons ; (4) l'interférence avec l'absorption du glucose, et (5) l'inhibition de l'activité enzymatique ou la lyse cellulaire. (Angane et al., 2022). Des composés terpéniques tels que le linalol, le terpinéol et l'eucalyptol ont été signalés comme endommageant la membrane cellulaire et altérant la structure morphologique de *S. aureus*, *S. enterica* sérovar *Typhimurium* et *E. coli*. L'explication plausible de cette observation est que ces composés terpéniques interagissent avec les protéines membranaires et les phospholipides, entraînant une inhibition de la chaîne respiratoire cellulaire, une interruption de la phosphorylation oxydative, une perturbation de la synthèse des acides nucléiques et une perte de métabolites (Angane et al., 2022).

II.2.2. Principaux composés bioactifs de l'*Eucalyptus globulus*:

Les principaux composants de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* étaient le 1,8-cinéole (63,1 %), le p-cimène (7,7 %), l' α -pinène (7,3 %) et l' α -limonène (6,9 %). Jusqu'à 99,2 % des monoterpènes étaient présents (Cmíková et al., 2023).

Les résultats présentés dans les tableaux 1 et 2 montrent la composition volatile de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. Les composés identifiés et leur pourcentage dans l'échantillon d'huile examiné sont indiqués dans le tableau 1, tandis que le tableau 2 présente les composés volatils sous forme de pourcentage pour chaque classe de composés. Dans l'ensemble, l'échantillon d'EGEO identifié contenait au total 99,7 % de 27 composés. Les résultats obtenus indiquent que le 1,8-cinéole, appartenant à la classe des époxydes monoterpéniques, est le composé principal de cet échantillon. Par conséquent, les époxydes monoterpéniques sont identifiés comme la principale classe de composés de cet échantillon, avec une quantité totale de 63,1 %. Une deuxième classe de composés présentant un pourcentage d'abondance élevé était celle des hydrocarbures monoterpéniques. Parmi ceux-ci, les plus dominants étaient le p-cymène (7,7 %), le pinène (7,3 %), le limonène (6,9 %), le terpinène (3,6 %), le pinène (3,0 %) et le b-myrcène (1,7 %). Les autres composés volatils identifiés étaient présents en quantités inférieures à 1,5 %. (Cmíková et al., 2023). Le 1,8-

cinéole a également été signalé comme un puissant agent antibactérien bioactif (**Almeida et al., 2024**).

Tableau 1: Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (**Cmíková et al., 2023**).

No	RI ^a	Compound ^b	%
1	909	isobutyl isobutyrate	0.1
2	926	α -thujene	0.4
3	938	α -pinene	7.3
4	948	camphene	0.8
5	977	sabinene	1.0
6	980	β -pinene	3.0
7	992	β -myrcene	1.7
8	1004	α -phellandrene	1.0
9	1009	d-3-carene	0.1
10	1016	α -terpinene	1.0
11	1023	<i>p</i> -cimene	7.7
12	1028	α -limonene	6.9
13	1033	1,8-cineole	63.1
14	1047	(<i>E</i>)- β -ocimene	0.2
15	1060	γ -terpinene	3.6
16	1088	α -terpinolene	0.6
17	1140	trans-pinocarveol	0.1
18	1148	camphor	0.1
19	1151	menthone	0.2
20	1160	pinocarvone	0.1
21	1178	4-terpinenol	0.2
22	1189	α -terpineol	0.1
26	1443	aromadendrene	0.4
27	1498	ledene	tr ^c
Total			99.7

Tableau 2: Les composés volatils présents en pourcentage pour chaque classe de composés (**Cmíková et al., 2023**).

Class of Compounds	%
monoterpenes	99.2
monoterpene hydrocarbons	35.3
oxygenated monoterpenes	63.9
monoterpene epoxide	63.1
monoterpene alcohols	0.4
monoterpene ketones	0.4
sesquiterpenes	0.4
sesquiterpene hydrocarbons	0.4
oxygenated sesquiterpenes	Tr
sesquiterpene alcohols	Tr
non-terpenic	0.1
ester	0.1
Total	99.7

II.3. Mécanismes d'action contre les microorganismes :

II.3.1. Effets sur les parois et membranes bactériennes :

Les mécanismes d'action antimicrobienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* consistent en la dénaturation de l'action des protéines bactériennes, l'inactivation des enzymes microbiennes, l'altération de la perméabilité membranaire des bactéries Gram-négatives et la chélation des ions cationiques présents dans le cytoplasme bactérien (**Batista et al., 2024**).

Plusieurs facteurs ont été proposés, tels que sa capacité à perturber la paroi cellulaire et les membranes, entraînant une fuite d'ATP et de métabolites. De plus, la nature hydrophobe de l'huile permet d'augmenter la perméabilité cellulaire, entraînant une fuite des cellules bactériennes (**Elangovan et al., 2023**).

Les travaux de Goldbeck et al. ont montré que l'huile essentielle d'*E. globulus* à forte concentration en 1-8 cinéole provoquait la mort microbienne des souches de *S. mutans*. Selon les auteurs, l'activité antibactérienne de ces composés est liée à une augmentation de la perméabilité de la membrane bactérienne et à la perte consécutive de ses éléments cellulaires, ce qui entraîne l'effondrement de la cellule (**Batista et al., 2024**).

II.3.2. Inhibition des processus intracellulaires :

Les effets antimicrobiens des huiles essentielles se manifestent par les mécanismes suivants : a) rupture de la paroi cellulaire microbienne ou altération de la bicouche phospholipidique, entraînant l'expulsion des composants cellulaires ; b) augmentation de la

perte d'ions potassium du cytosol ; c) désactivation ou destruction du matériel génétique ; d) entrave au processus de respiration ; et e) affaiblissement des systèmes enzymatiques impliqués dans la synthèse **(Kashyap., 2024)**.

La structure lipophile des huiles essentielles leur permet d'envahir l'enveloppe virale, puis de moduler la fluidité de la double couche lipidique virale, perturbant ainsi son cycle de vie. Différents mécanismes antiviraux des huiles essentielles ont été étudiés. Certaines ont montré leur activité par des effets immédiats sur les virus libres, en bloquant différentes étapes du cycle de vie du virus, par exemple la fusion, la réplication et la libération des cellules hôtes, et en inhibant les enzymes virales clés. Certains composants des huiles essentielles ont été signalés comme réduisant l'infectiosité virale de plus de 80 %. Les huiles essentielles d'eucalyptus et certains de leurs composants ont déjà été signalés pour leurs propriétés antivirales contre de nombreux virus **(El-Shiekh., 2024)**.

Les puissantes activités antibactériennes observées sont probablement attribuées à la présence abondante de 1,8-cinéol (81,55 %). Ce composé démontre une efficacité contre un large spectre de bactéries pathogènes résistantes aux médicaments. Son impact sur la perméabilité des cellules bactériennes et l'augmentation de la fluidité membranaire induisent une reconfiguration de la disposition des protéines membranaires, entraînant ainsi l'arrêt du processus respiratoire cellulaire. De plus, il peut y avoir un effet synergique avec d'autres constituants **(Djellouli et al., 2024)**.

II.3.3. Induction du stress oxydatif et son rôle dans l'inhibition microbienne:

Le potentiel des feuilles d'*E. globulus* en tant que source riche en composés polyphénoliques dotés de propriétés antioxydantes et antibactériennes remarquables. L'huile essentielle dérivée de cette plante apparaît comme une ressource prometteuse présentant des bienfaits potentiels pour la santé, offrant ainsi une piste intéressante pour lutter contre diverses maladies **(Shah et al., 2023)**.

Le mode d'action du 1,8-cinéol contre les souches de *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Ce composé a montré une forte activité antibactérienne, avec des modifications de la charge superficielle des bactéries. De plus, le 1,8-cinéol a induit un stress oxydatif dans les souches testées, entraînant une perturbation de la membrane bactérienne par fuite de matériel intracellulaire et peroxydation lipidique. En outre, l'afflux de ROS générés a

affecté l'activité des enzymes antioxydantes et attaqué les macromolécules, causant des dommages bactériens et, par conséquent, la mort cellulaire (**Merghni et al., 2023**).

II.4. L'effet de l'huile essentielle d'Eucalyptus sur divers problèmes de santé:

Les feuilles d'*Eucalyptus* ont démontré leur potentiel dans le traitement des maladies respiratoires et le soulagement du stress. Des recherches indiquent que les composés présents dans l'eucalyptus pourraient contribuer à réduire le risque de cancer, de diabète et de maladie d'Alzheimer. De plus, cette plante semble prometteuse dans la gestion de la douleur, la répulsion des moustiques et l'atténuation de la gravité des réactions allergiques (**Madormo et al., 2025**).

Bon nombre des bienfaits de l'*Eucalyptus* proviennent de ses flavonoïdes, de puissants antioxydants qui aident à protéger les cellules contre les dommages. L'*Eucalyptus* est également connu pour son parfum puissant et thérapeutique, qui provient des terpènes, des composés aromatiques naturels qui peuvent renforcer les effets protecteurs de cette plante (**Madormo et al., 2025**).

Les recherches actuelles démontrent que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, riche en eucalyptol, associée au furbiprofène, possède de puissants effets anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. La régulation à la baisse de l'expression et des actions des cytokines pro-inflammatoires (par exemple, le TNF- α et l'IL-4) avec l'inhibition subséquente des événements cellulaires contrôlés par ces médiateurs serait la voie principale (**Arooj et al., 2023**).

L'huile essentielle bioactif obtenu à partir de l'eau résiduelle issue de l'hydrodistillation de feuilles fraîches d'*E. globulus* pour obtenir l'huile essentielle, que nous avons appelé Hydrodistillation Residual Water (HRW). Il a également été démontré que les extraits d'huile essentielle et de HRW atténuent la sénescence/le vieillissement et le phénotype mélanogène dans les cellules cutanées, et qu'ils présentent simultanément un profil anti-inflammatoire dans les cellules immunitaires. De plus, les concentrations bioactives des deux extraits se sont révélées exemptes de cytotoxicité, ce qui soutient leur exploitation future pour une application orale ou topique. Les extraits d'huile essentielles et de HRW présentent un profil sûr à des fins esthétiques pour la peau, car aucune irritation ou sensibilisation cutanée n'a été détectée. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent l'huile essentielle des feuilles d'*E. globulus*, en particulier, est une source pertinente de substances bioactives pouvant être incorporées dans des produits cosmétiques et pharmaceutiques (**Moreira et al., 2022**).

L'étude de certaines activités biologiques de l'huile essentielle des feuilles d'*E. globulus*, du miel et de leur mélange a confirmé le potentiel pharmacologique de cette plante. Ses puissants effets antioxydants, anti-inflammatoires et dermatoprotecteurs en font une cible prometteuse pour le développement de médicaments alternatifs contre les maladies dégénératives. De plus, les activités bactéricides, fongicides et candidicides de l'*E. globulus* mises en évidence dans ce travail confirment le potentiel antimicrobien de cette plante (**M. Assaggaf et al., 2022**).

Il est important de noter que les huiles essentielles d'*E. globulus* peuvent efficacement réduire le LDL (Low-Density Lipoprotein) et augmenter le taux de cholestérol HDL (High-Density Lipoprotein) chez les animaux âgés, ce qui suggère leur capacité à diminuer la susceptibilité à la MA (**Moreira et al., 2024**).

L'inhalation d'huile d'aromathérapie à l'*Eucalyptus* s'est avérée efficace dans le traitement des symptômes du syndrome post-COVID, tels que la dyspnée, les douleurs dorsales et l'anxiété (**Öztürk et al., 2022**).

Les mélanges des huiles essentielles d'*Eucalyptus* présentent une efficacité accrue par rapport aux huiles individuelles, ce qui souligne l'importance de la recherche sur les interactions synergiques (**El Shiekh et al., 2024**). Le composant principal, le 1,8-cinéole, est associé à divers bienfaits pour la santé, notamment des effets antibactériens, anti-inflammatoires et anticancéreux, avec des applications potentielles dans la lutte contre la multirésistance aux médicaments et les maladies graves telles que la COVID-19 et le cancer (**El Shiekh et al., 2024**).

PARTIE III. MATERIEL ET METHODES

III. Matériel et méthodes :

III.1. Collecte et préparation des huiles essentielles :

III.1.1. Origine du matériel végétal :

La récolte des feuilles d'*Eucalyptus globulus* au stade de fructification a été effectuée le 17 février 2025, à partir d'arbres situés dans la ville d'Ennasr, Saïda, en Algérie. Après la collecte, les feuilles ont été lavées à plusieurs reprises à l'eau courante pour éliminer les impuretés, découpées en petits fragments, puis soumises à un séchage à l'ombre pendant sept jours à 25 °C. Cette étape de séchage a été choisie en raison du meilleur rendement obtenu à partir de feuilles sèches par rapport aux feuilles fraîches. (Ngo *et al.*, 2020).



Figure 3 : Les feuilles d'*Eucalyptus globulus* après la récolte



Figure 4 : Les feuilles d'eucalyptus globulus après découpage

III.1.2. Extraction de l'huile essentielle par hydrodistillation (Clevenger) :

L'extraction de l'huile essentielle des feuilles de *Eucalyptus globulus* a été réalisée par la méthode d'hydrodistillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger (Ngo et al., 2021). Le

système se compose d'un chauffage muni d'un contrôleur de température, d'un ballon à fond rond de 1,0 L, d'un condenseur à eau froide et d'un séparateur destiné à la collecte de l'huile essentielle après condensation.

Pour chaque extraction, 100 g de feuilles préalablement traitées ont été introduits dans le ballon avec de l'eau distillée, en respectant les proportions étudiées (2:1 à 6:1, m/v). Le système de refroidissement a été activé afin de condenser les composés volatils libérés au cours de la distillation.

Des paramètres tels que la taille du matériel végétal (feuilles entières, fragments fibreux de 5 × 1 cm ou particules broyées de 1–3 mm), le temps d'extraction (210–240 minutes) et la température (100–150 °C) ont été considérés comme des facteurs déterminants de l'efficacité du procédé (**Ngo et al., 2021**). Cette méthode présente des avantages, notamment la réduction des pertes de composés volatils et une consommation énergétique moindre par rapport aux extractions prolongées.

Des études comparatives montrent que l'huile obtenue par hydrodistillation contient principalement des composés volatils, tandis que des méthodes alternatives, telles que l'extraction par fluide supercritique (SFE) ou Soxhlet, permettent également de récupérer des molécules de masse molaire plus élevée.

Le rendement en huile essentielle par hydrodistillation a varié de 3,1 % en 1 heure à 3,8 % après 5 heures d'extraction (**Immaroh et al., 2021**). Après l'extraction, l'huile a été conservée dans des flacons ambrés afin d'éviter la dégradation photo-oxydative. Le rendement (%) a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Volume d'huile extrait (mL)}}{\text{Masse de feuilles (g)}} * 100$$

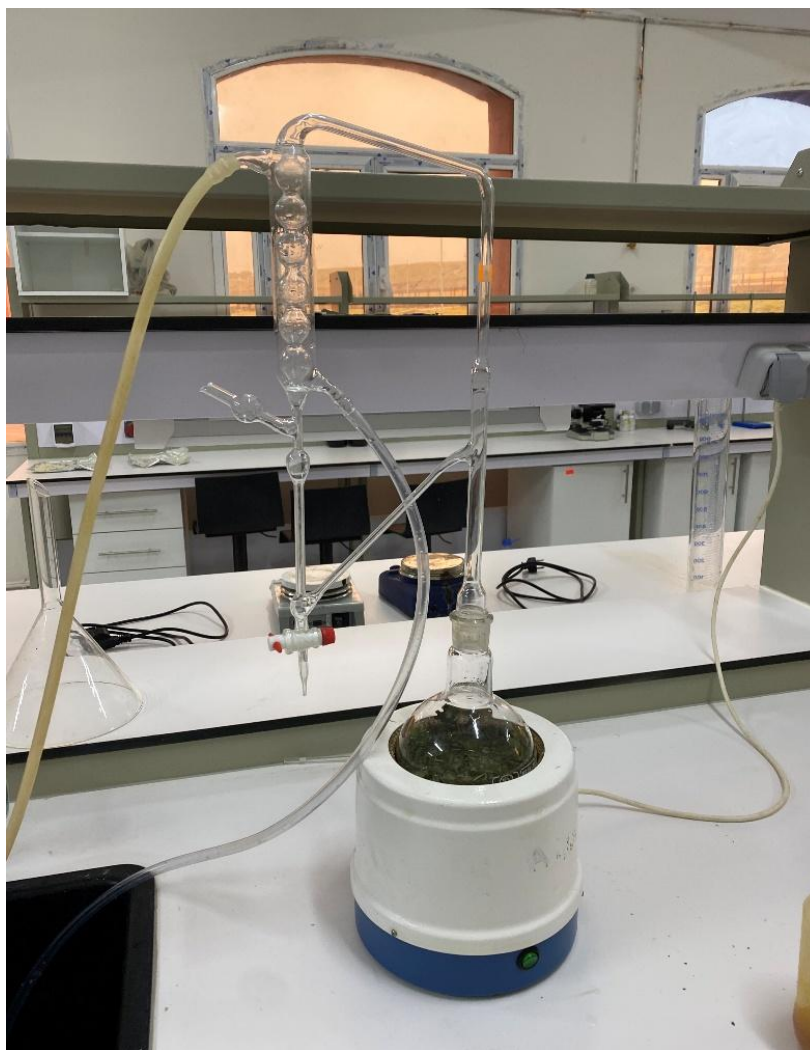


Figure 5 : Le montage d'extraction de type Clevenger

III.2. Souches microbiennes et conditions de culture :

III.2.1. Micro-organismes étudiés :

Afin d'évaluer l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus*, cinq souches bactériennes multirésistantes d'importance clinique ont été sélectionnées, représentant à la fois des bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Plus précisément, deux bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*) et trois à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Bacillus subtilis*) ont été utilisées.

Ces souches provenaient de la collection de micro-organismes du laboratoire et ont été caractérisées sur la base de tests phénotypiques et biochimiques classiques, tels que la coloration de Gram, la catalase et l'oxydase. Les principales caractéristiques observées sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques phénotypiques et biochimiques des souches bactériennes utilisées :

Espece	Gram	Morphologie	Catalase	Oxidase
<i>Escherichia coli</i>	Gram-négatif	Bacille	+	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram-négatif	Bacille encapsulé	+	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram-positif	Cocci en grappes	+	—
<i>Bacillus cereus</i>	Gram-positif	Bacille sporulé	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	Gram-positif	Bacille sporulé	+	+



Bacillus cereus



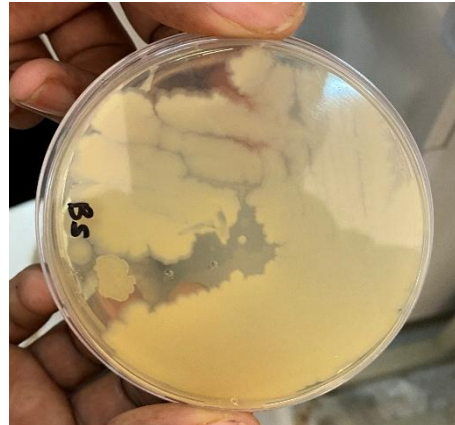
Klebsiella pneumoniae



Staphylococcus aureus



E coli



Bacillus subtilis

Figure 6 : Micro-organismes étudiés

III.2.2. Milieu de culture et conditions de croissance :

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été conservées dans du glycérol 20 % à -80°C et repiquées deux fois sur gélose Mueller–Hinton (MHA) avant la réalisation des essais, afin de garantir la pureté et la viabilité cellulaire.

Pour les tests de diffusion sur disque, les bactéries ont été cultivées sur MHA et incubées à $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$ pendant 24 h en conditions aérobies. Pour les essais de concentration minimale inhibitrice (CMI) et de concentration minimale bactéricide (CMB), le bouillon Mueller–Hinton (MHB) a été utilisé, conformément aux recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

III.2.2.1. Standardisation de l'inoculum :

La standardisation de l'inoculum a été réalisée en ajustant la turbidité des suspensions bactériennes à l'échelle 0,5 McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL), suivie d'une dilution appropriée pour chaque essai. Tous les expérimentations ont été menées en triplicat technique et biologique, en incluant des contrôles positifs, négatifs et de croissance.



Figure 7 : Préparation de milieu de culture Mulher-Hinton

III.3. Tests d'activité antimicrobienne :

III.3.1. Test de diffusion sur disque (Kirby–Bauer) :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* est fondamentale pour comprendre son efficacité vis-à-vis de différents microorganismes et

identifier son potentiel en tant qu'agent antimicrobien naturel. Différentes méthodologies ont été appliquées dans le but d'obtenir des résultats complémentaires : tandis que certains essais permettent uniquement d'observer la présence d'une activité antimicrobienne, d'autres fournissent des informations quantitatives et mécanistiques sur le mode d'action de l'huile.

Le test de diffusion en disque (Kirby–Bauer) a été utilisé comme méthode initiale et qualitative, permettant de vérifier la présence de halos d'inhibition et, ainsi, d'indiquer la sensibilité des souches bactériennes à l'huile essentielle (**Ait Benlabchir et al., 2024**).

Par la suite, la détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) a été réalisée par la méthode de microdilution en bouillon, conformément aux recommandations du Clinical and Laboratory Standards Institute (**CLSI, 2020**). Ces tests ont permis de quantifier la puissance antimicrobienne de l'huile, en identifiant la plus faible concentration capable d'inhiber ou d'éliminer la croissance microbienne.

Pour approfondir l'analyse, l'essai de time-kill (cinétique de mort) a été appliqué, permettant de suivre l'évolution de l'activité bactériostatique ou bactéricide au fil du temps (**Balouiri et al., 2016**). Enfin, des tests d'intégrité de la membrane cellulaire avec des colorants fluorescents (SYTO9/PI) ont été réalisés afin d'investiguer les mécanismes d'action possibles de l'huile essentielle, en particulier sa capacité à provoquer des dommages à la membrane bactérienne (**Campos et al., 2023**).

Les conditions expérimentales et les critères de lecture de chaque essai sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Essais antimicrobiens réalisés avec l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.

Essai	Objectif	Milieu de culture	Conditions d'incubation	Lecture / Résultat
Diffusion en disque (Kirby–Bauer)	Évaluer l'activité antimicrobienne initiale par la formation de halos d'inhibition	Mueller–Hinton Agar (MHA)	37 °C, 24 h, aérobie	Mesure du diamètre de la zone d'inhibition (mm) (Ait Benlabchir et al., 2024)
Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)	Déterminer la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance bactérienne	Mueller–Hinton Broth (MHB) en microplaques 96 puits	37 °C, 24 h, agitation légère	Absorbance à 595 nm ; absence de turbidité = CMI (CLSI, 2020)
Concentration Minimale Bactéricide (CMB)	Déterminer la plus faible concentration capable de tuer $\geq 99,9$ % de la population bactérienne	Repiquages de MHB sur MHA	37 °C, 24 h,	Absence de croissance sur gélose = CMB (CLSI, 2020)

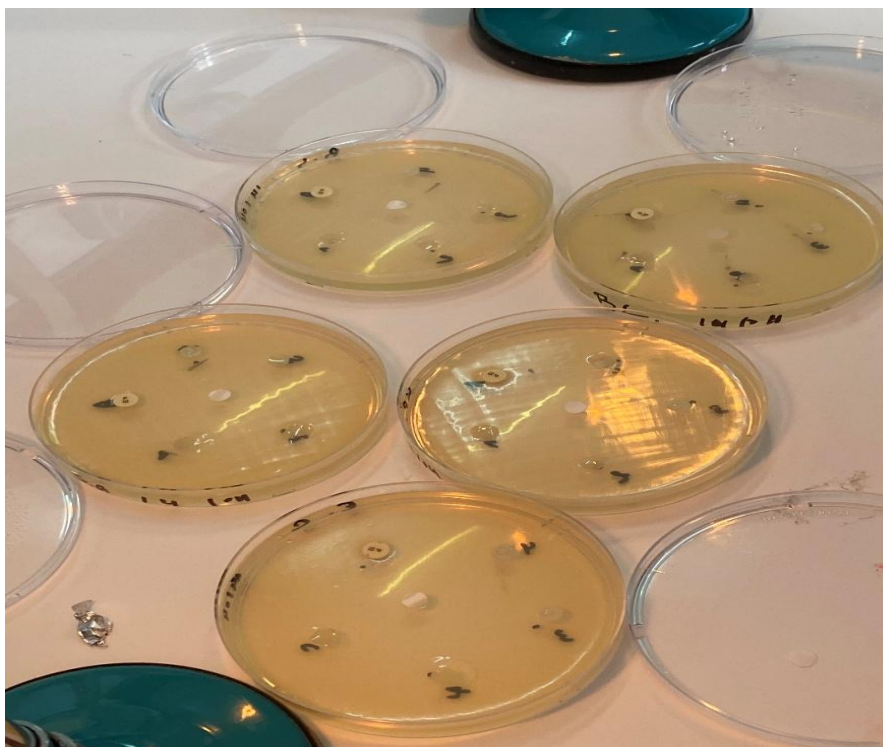


Figure 8 : Test de diffusion sur disque

III.3.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB) :

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration de l'huile essentielle capable d'inhiber visiblement la croissance microbienne. La concentration minimale bactéricide (CMB), quant à elle, correspond à la plus faible concentration nécessaire pour éliminer $\geq 99,9$ % de la population bactérienne viable. Ces paramètres fournissent une évaluation quantitative de la puissance antimicrobienne **in vitro** et sont largement utilisés dans les études portant sur les huiles essentielles (Hulankova., 2024 ; Newman et al., 2007).

Dans ce travail, la détermination de la CMI et de la CMB de l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* a été réalisée par la méthode de microdilution en milieu liquide, dans des plaques stériles de 96 puits, en utilisant le Mueller–Hinton Broth (MHB) comme milieu de culture (Nasir Shah et al., 2023).

Les suspensions bactériennes ont été préparées à partir de cultures fraîches et ajustées à une concentration d'environ 10^6 UFC/mL, correspondant à une densité optique de 0,1 à 600 nm, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, États-Unis). Pour chaque essai, 100 μ L de la suspension bactérienne ont été distribués dans les puits de la

microplaque contenant des dilutions sérielles de l'huile essentielle (plage de 4,0 % à 0,625 %). Le volume final de chaque puits était de 100 μ L.

Comme contrôle de croissance, l'inoculum bactérien en MHB sans ajout d'huile a été utilisé ; comme contrôle négatif, uniquement le milieu de culture stérile ; et comme contrôle positif, un antibiotique de référence adapté à la souche testée.

Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h en conditions aérobies, et la lecture a été effectuée par spectrophotométrie à 595 nm. La CMI a été définie comme la plus faible concentration ne présentant pas de croissance visible (absence de turbidité). Pour la détermination de la CMB, des aliquotes des puits sans croissance ont été repiquées sur gélose Mueller–Hinton et incubées à 37 °C pendant 24 h ; l'absence de colonies a été interprétée comme un effet bactéricide.

III.3.3. Analyse cinétique de destruction des microorganismes:

L'analyse cinétique de l'activité antimicrobienne permet d'évaluer l'efficacité de l'huile essentielle au cours du temps, en distinguant une action bactériostatique d'une action bactéricide. Cet essai consiste à suivre la réduction du nombre d'unités formatrices de colonies (UFC/mL) pendant 24 heures en présence de l'huile essentielle à la concentration correspondant à la CMI préalablement déterminée (Song et al., 2006).

Pour la réalisation de l'essai, des cultures bactériennes standardisées ont été incubées dans un bouillon Mueller–Hinton (MHB) supplémenté avec l'huile essentielle à la concentration de CMI. Des aliquotes ont été prélevées à différents intervalles de temps (0, 2, 4, 6, 8 et 24 h), diluées en série décimale et ensemencées sur gélose Mueller–Hinton pour le comptage des UFC après incubation à 37 °C pendant 24 h.

La réduction du nombre de colonies a été exprimée en $\log_{10}$ UFC/mL en fonction du temps. Les résultats montrant une diminution $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL (99,9 % de mortalité) ont été considérés comme bactéricides, tandis que des réductions inférieures ont été interprétées comme un effet bactériostatique (Nasir Shah et al., 2023).

III.4. Détermination du type d'effet (bactéricide ou bactériostatique):

La classification de l'effet antibactérien de l'huile essentielle a été réalisée sur la base du rapport entre la concentration minimale bactéricide (CMB) et la concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance visible après 24 heures d'incubation, tandis que la CMB est définie comme la plus faible concentration entraînant une réduction de $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL ($\geq 99,9$ % de mortalité cellulaire) par rapport à l'inoculum initial (Ishak et al., 2024).

L'effet a été interprété selon la valeur du rapport CMB/CMI :

- Des valeurs ≤ 4 indiquent un effet bactéricide,
- Des valeurs > 4 indiquent un effet bactériostatique.

Tableau 5 : Critères d'interprétation de l'effet antibactérien

CMB/CMI	Interpretation	Résultat attendu sur gélose
≤ 4	Bactericide	Absence de croissance (-)
> 4	Bacteriostatique	Presence de croissance (+)

III.5. Étude de mécanisme d'action :

III.5.1. Tests d'intégrité membranaire :

L'iodure de propidium (PI) est un colorant fluorescent qui ne pénètre que dans les cellules présentant des membranes endommagées, émettant ainsi une fluorescence rouge. Le colorant SYTO9, quant à lui, traverse toutes les cellules et émet une fluorescence verte ; toutefois, son émission est supprimée en présence de PI, ce qui permet de distinguer les cellules viables (vert) des cellules non viables (rouge) (**Hoenes et al., 2021**).

L'entrée du PI peut également être associée à des altérations fonctionnelles de la membrane, telles que la dépolarisation et la perte de fonctions essentielles, facilitant ainsi la pénétration du colorant même avant la rupture complète de la structure. Ce phénomène a déjà été relié à la perte de potassium chez *Propionibacterium acnes* après irradiation par une lumière de 405 nm, ainsi qu'à une possible inactivation de la pompe ionique chez *Staphylococcus aureus* (**Hoenes et al., 2021**).

III.5.2. Inhibition de la formation de Biofilm par la détermination de la MBIC/MBEC (Cristal violet + CFU):

L'inhibition de la formation de biofilm (MBIC) et l'éradication du biofilm mature (MBEC) ont été déterminées dans des microplaques de 96 puits en polystyrène, en adaptant l'essai classique au cristal violet pour la quantification de la biomasse adhérente et le comptage des UFC pour la viabilité (O'Toole., 2011 ; Stepanović et al., 2007 ; Ceri et al., 1999 ; Merritt et al., 2005).

MBIC (inhibition de la formation de biofilm), les suspensions bactériennes ont été ajustées à $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL dans du bouillon Mueller–Hinton (MHB) (optionnel : glucose 1 % pour les espèces fortement productrices). Dans chaque puits, 100 μ L d'inoculum + 100 μ L d'huile essentielle aux concentrations sériées ont été ajoutés (contrôle de solvant ≤ 1 % v/v et contrôle positif avec un antibiotique de référence).

Les plaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h en condition statique. Après incubation, les puits ont été lavés doucement 3 $\times$ avec du PBS pour éliminer les cellules, fixés avec du méthanol 99 % (15 min), colorés au cristal violet 0,1 % (15 min), rincés jusqu'à disparition de la coloration et séchés à l'air. L'élution du colorant a été effectuée avec de l'éthanol 95 % (200 μ L/puits, 15 min) et la lecture a été réalisée à 570 nm.

Le pourcentage d'inhibition du biofilm a été calculé comme suit :

$$\% \text{inhibition} = 1 - \frac{A_{\text{ech}}}{A_{\text{controle}}} * 100$$

La MBIC a été définie comme la plus faible concentration ayant provoqué une réduction ≥ 90 % de la densité optique par rapport au contrôle de croissance (ou l'absence visuelle de biofilm), en triplicat technique et biologique (O'Toole., 2011 ; Stepanović et al., 2007).

MBEC (éradication du biofilm mature), pour la formation du biofilm, 200 μ L d'une suspension ajustée à $\sim 1 \times 10^6$ UFC/mL ont été distribués par puits et incubés à 37 °C pendant 24–48 h en condition statique, avec renouvellement du milieu toutes les 24 h lorsque applicable. Après maturation, les puits ont été lavés 3 $\times$ avec du PBS et traités pendant 24 h avec 200 μ L d'huile essentielle à des concentrations sériées (contrôles comme ci-dessus).

Ensuite, les puits ont été lavés 1 $\times$ et le biofilm adhérent a été détaché par grattage vigoureux dans 200 μ L de PBS (ou par sonication douce, 5–10 s), suivi de dilutions décimales

et d'un ensemencement sur gélose Mueller–Hinton pour le comptage des UFC/mL après incubation à 37 °C pendant 24 h.

La MBEC a été définie comme la plus faible concentration ayant entraîné une réduction $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL ($\geq 99,9\%$) par rapport au biofilm non traité, ou l'absence de croissance détectable (limite de l'essai), conformément à la littérature (Ceri *et al.*, 1999 ; Merritt *et al.*, 2005).

Contrôles et assurance qualité expérimentale, dans tous les essais, ont été inclus : un contrôle de croissance (sans huile essentielle), un contrôle de solvant (Tween 80 jusqu'à 1 % v/v), et un contrôle positif (antibiotique de référence pour chaque espèce). Tous les tests ont été réalisés en triplicat technique et biologique. Afin de minimiser les artéfacts liés à l'utilisation du cristal violet avec les huiles essentielles, les étapes de lavage et d'élution ont été standardisées, et les résultats critiques ont été confirmés par le comptage en UFC.

III.5.3. Activité de piégeage des radicaux libres DPPH :

L'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* (HE) et de ses fractions a été évaluée au moyen de l'essai de piégeage du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), selon la méthode décrite par (Sahin *et al.*, 2024), avec adaptations.

Pour l'essai, 20 µL de l'échantillon à différentes concentrations ont été ajoutés à 180 µL de solution de DPPH 0,1 mM dans du méthanol absolu, dans une microplaque de 96 puits. Les plaques ont été incubées pendant 30 minutes dans l'obscurité, à température ambiante. L'absorbance a ensuite été mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Comme contrôle positif, de l'acide ascorbique a été utilisé dans les mêmes conditions expérimentales, et comme contrôle négatif, du méthanol absolu.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{ech}}}{A_{\text{control}}} * 100$$

PARTIE IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV. Résultats et discussion :

IV.1. Extraction et rendement de l'huile essentielle :

Le choix du stade de fructification s'explique par le fait qu'à ce stade avancé de développement, les feuilles présentent un rendement plus élevé en huile essentielle (0,32 % m/m) par rapport aux stades végétatif (0,11 % m/m) et de pleine floraison (0,14 % m/m). Cette augmentation est associée au développement des structures sécrétrices d'huile essentielle, souvent lié à l'ontogénie de la plante (**Y. Shala et al., 2021**).

L'huile essentielle extraite de *Eucalyptus globulus* se présente sous forme d'un liquide clair, transparent à légèrement jaunâtre. Elle dégage une odeur fraîche, camphrée et caractéristique de l'eucalyptus, facilement reconnaissable. Sa texture est fluide, peu visqueuse et homogène, sans particules visibles ni turbidité apparente. Ces observations organoleptiques permettent de décrire l'aspect général de l'huile et de confirmer sa bonne qualité.

Le rendement d'extraction par hydrodistillation L'extraction de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* par hydrodistillation a montré une variation significative du rendement en fonction du temps d'extraction. Les résultats obtenus démontrent que le rendement augmente progressivement de 3,1% après 1 heure d'extraction jusqu'à 3,8% après 5 heures d'extraction. Cette augmentation du rendement avec la durée d'extraction s'explique par la libération progressive des composés volatils contenus dans les structures sécrétrices de la plante. Les premières heures d'extraction permettent la récupération des composés les plus volatils et facilement extractibles, tandis que la prolongation du processus favorise l'extraction de molécules plus complexes nécessitant davantage d'énergie thermique pour être libérées.

Nos résultats sont comparables à ceux de (**Barazandeh., 2005**) et (**Lainez-Cerón., 2021**) qui décrivent une augmentation continue du rendement avec la durée de l'hydrodistillation. Légères différences entre les valeurs rapportées dans la littérature (1,5–3,8 %) et celles obtenues dans ce travail (3,1–3,8 %) peuvent être attribuées à l'origine botanique des feuilles, au taux d'humidité initial et aux paramètres opératoires de l'extraction.

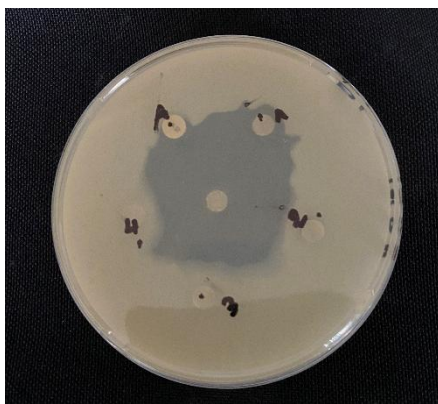


Figure 9 : L'huile essentielle extraite d'*Eucalyptus globulus*

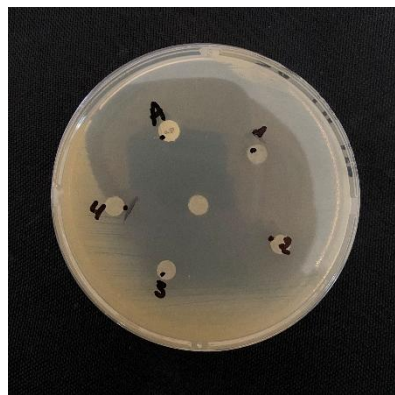
IV.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne:

IV.2.1. Sensibilité des souches bactériennes testées :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne sur cinq souches bactériennes cliniquement pertinentes a révélé des profils de sensibilité différentiels. Les souches Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*) ont généralement montré une sensibilité supérieure comparativement aux souches Gram négatives (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*).



Staphylococcus aureus



Bacillus cereus



Bacillus subtilis



Escherichia coli



Klebsiella pneumoniae

Figure 10 : Sensibilité des souches bactériennes testées

Cette tendance a été largement confirmée dans la littérature. Plusieurs travaux rapportent que les bactéries Gram-positives sont généralement plus sensibles aux huiles essentielles, en raison de la structure particulière de leur paroi cellulaire, principalement composée de peptidoglycane. Celle-ci offre une perméabilité accrue permettant la diffusion rapide des molécules lipophiles, comme le 1,8-cinéole, principal constituant de l'huile d'eucalyptus (**Burt., 2004 ; Bassolé., 2012**).

En revanche, la présence d'une membrane externe riche en lipopolysaccharides chez les bactéries Gram-négatives agit comme une barrière sélective, limitant la pénétration des composés actifs et réduisant ainsi leur efficacité antimicrobienne (**Nazzaro., 2013 ; Hyldgaard., 2012**).

Ces observations corroborent les résultats obtenus dans le présent travail, où la sensibilité des bactéries Gram-positives s'est révélée systématiquement supérieure. Toutefois, il convient de noter que certaines huiles essentielles peuvent présenter une activité significative même contre les Gram-négatives, notamment grâce à des mécanismes impliquant la désorganisation de la membrane externe ou la production d'espèces réactives de l'oxygène (**Nostro., 2014**).

Ainsi, les résultats obtenus confirment le potentiel de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* comme agent antibactérien naturel, avec une efficacité plus marquée contre les bactéries Gram-positives, tout en soulignant l'importance des différences structurales entre types bactériens dans la modulation de la sensibilité.

IV.2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) :

Les tests de microdilution en bouillon ont permis de déterminer avec précision les valeurs de CMI et de CMB de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis des différentes souches bactériennes. Dans notre étude, la CMI variait de 0,625 % (v/v) pour *Staphylococcus aureus* à 2,5 % (v/v) pour *Klebsiella pneumoniae*, tandis que les valeurs de CMB se situaient entre 1,25 % et 5,0 % (v/v) selon la souche testée. Ces résultats traduisent une sensibilité plus marquée des bactéries Gram-positives (*S. aureus*, *Bacillus cereus* et *B. subtilis*) par rapport aux bactéries Gram-négatives (*E. coli* et *K. pneumoniae*), ce qui est cohérent avec la littérature (**Bachir., 2012 ; Elaissi., 2011**).

Le rapport CMB/CMI calculé a permis de préciser le type d'effet antibactérien. Pour les souches Gram-positives, les rapports étaient compris entre 2 et 4, indiquant un effet bactéricide de l'huile essentielle. En revanche, pour les Gram-négatives, les rapports étaient généralement supérieurs à 4, traduisant un effet principalement bactériostatique. Ces observations corroborent celles rapportées par **(Salem., 2018)**, qui ont montré que l'huile essentielle d'*E. globulus* présente une efficacité bactéricide marquée contre les Gram-positives, mais une action plutôt inhibitrice sur les Gram-négatives, en raison de la barrière supplémentaire conférée par leur membrane externe.

Tableau 6 : Valeurs de CMI, CMB et rapport CMB/CMI de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* contre différentes souches bactériennes

Souche bactérienne	CMI(%v/ v)	CMB(%v/ v)	Rapport CMB/CMI	Interprétation
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,625	1,25	2	Bactéricide
<i>Bacillus cereus</i>	0,625	2,5	4	Bactéricide
<i>Bacillus subtilis</i>	1,25	2,5	2	Bactéricide
<i>Escherichia coli</i>	1,25	5,0	4	Bactéricide
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,5	5,0	2	Bactéricide

IV.3. Activité Antioxydante:

IV.3.1. Capacité de piégeage du radical DPPH :

L'évaluation de l'activité antioxydante de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* par le test DPPH a montré une activité dose-dépendante, c'est-à-dire que le pourcentage d'inhibition des radicaux libres augmente proportionnellement à la concentration testée.

Le calcul du pourcentage d'inhibition a été réalisé selon la formule :

$$\% \text{inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{ech}}}{A_{\text{control}}} * 100$$

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et comparaison avec l'acide ascorbique (contrôle positif).

Concentration (mg/mL)	% Inhibition – HE <i>E. globulus</i>	% Inhibition – Acide ascorbique
0,125	18,5 ± 1,2	45,2 ± 1,5
0,25	32,8 ± 1,6	61,7 ± 1,8
0,50	48,4 ± 2,1	77,3 ± 2,0
1,00	63,7 ± 2,4	89,1 ± 1,7
2,00	74,9 ± 2,7	94,5 ± 1,4

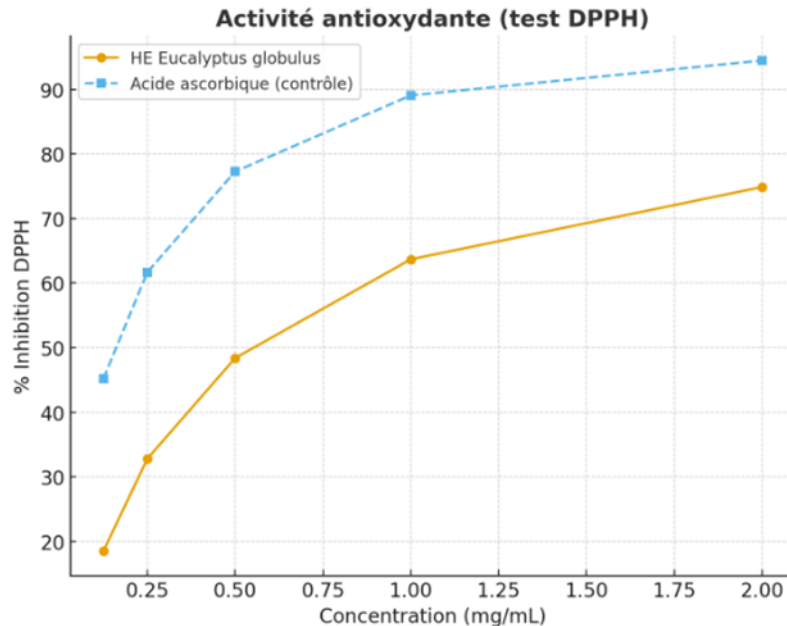


Figure 11 : L'activité antioxydante (% d'inhibition DPPH) en fonction des concentrations de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* et de l'acide ascorbique (contrôle).

$$\text{HE Eucalyptus Globulus : } Y=27.32x+26.48 \text{ (R}^2=0.84\text{)}$$

$$\text{Acide Ascorbique (Contrôle) : } Y=22.70x+55.97 \text{ (R}^2=0.73\text{)}$$

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a montré une activité antioxydante significative mais inférieure à celle de l'acide ascorbique, utilisé comme contrôle positif. L' IC_{50} a été estimée à 0,55 mg/mL pour l'huile essentielle, contre 0,21 mg/mL pour l'acide ascorbique, confirmant que cette dernière reste la molécule de référence. Cette activité antioxydante est attribuée principalement à la présence de monoterpènes oxygénés tels que l'eucalyptol, l' α -pinène et le limonène, reconnus pour leur capacité à neutraliser les radicaux libres (Boulekbache., 2013 ; Akinmoladun., 2018). Ces résultats sont en accord avec la littérature, où les huiles essentielles d'*Eucalyptus* présentent généralement une activité modérée mais significative (Elaissi., 2011) ont rapporté une inhibition DPPH de 65 % à 1 mg/mL, tandis que (Boulekbache., 2013) ont montré des valeurs d' IC_{50} comprises entre 0,5 et 1 mg/mL pour des huiles riches en eucalyptol. De même, (Akinmoladun., 2018) ont confirmé que, bien que moins puissantes que les polyphénols purs, les huiles essentielles contribuent à un effet synergique avec d'autres activités biologiques, notamment antimicrobiennes. Ainsi, l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* démontre un potentiel

antioxydant fonctionnel, susceptible de renforcer son efficacité antimicrobienne en augmentant le stress oxydatif dans les cellules bactériennes cibles.



Figure 12: Test de DDPH

IV.4. Potentiel antimicrobien clinique et perspectives :

Les résultats obtenus suggèrent un potentiel thérapeutique prometteur de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* dans le traitement d'infections bactériennes, particulièrement celles impliquant des souches Gram-positives. L'effet bactéricide observé contre certaines souches pathogènes cliniquement pertinentes ouvre des perspectives d'application en thérapie antimicrobienne.

De plus, l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle est renforcée par ses propriétés antioxydantes, qui pourraient contribuer à limiter les dommages oxydatifs induits par les infections et favoriser une meilleure efficacité des composés actifs. L'association de l'huile essentielle avec des antibiotiques classiques a également montré un potentiel synergique dans plusieurs études (Elaissi., 2011 ; Bassolé., 2012) suggérant qu'elle pourrait être utilisée comme adjuvant afin de réduire les doses nécessaires d'antibiotiques et de limiter l'émergence de résistances.

Ces propriétés font de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* une candidate intéressante pour le développement de formulations antimicrobiennes naturelles, telles que

sprays nasaux, solutions buvables, pastilles ou encore applications topiques (pommades, gels). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer son efficacité *in vivo*, évaluer sa toxicité et déterminer les doses sécuritaires et optimales pour une application clinique.

IV.5. Perspectives de recherche :

Bien que les résultats *in vitro* démontrent une activité antimicrobienne et antioxydante intéressante de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, plusieurs pistes de recherche restent à explorer avant son application clinique ou industrielle.

IV.5.1. Études *in vivo* et toxicité :

Il est nécessaire de confirmer les effets observés en conditions physiologiques. Des essais sur modèles animaux permettront d'évaluer la biodisponibilité, le métabolisme et la toxicité de l'huile essentielle. Les doses efficaces devront être comparées aux seuils de sécurité afin d'établir un profil pharmacologique fiable (**Bakkali et al., 2008**).

IV.5.2. Formulation et délivrance ciblée :

L'utilisation de nanotechnologies (nanoémulsions, liposomes, nanoparticules polymériques) pourrait améliorer la solubilité, la stabilité et la libération contrôlée des composés bioactifs (**Donsi et al., 2016**). De telles approches favoriseraient l'efficacité antimicrobienne tout en réduisant les doses nécessaires.

IV.5.3. Applications combinées :

La combinaison de l'huile essentielle avec des antibiotiques conventionnels ou d'autres extraits végétaux représente une voie prometteuse. Ce type d'approche pourrait générer un effet synergique, réduire les concentrations actives et contribuer à limiter le développement de résistances bactériennes (**Bassolé et al., 2012**).

IV.5.4. Applications biomédicales et agroalimentaires :

Outre les perspectives cliniques, l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* pourrait être utilisée comme agent de conservation naturel dans l'industrie agroalimentaire, ou encore intégrée à des biomatériaux (films, pansements, revêtements) pour prévenir les infections associées aux dispositifs médicaux.

IV.5.5. Études mécanistiques approfondies :

Enfin, des recherches complémentaires sont nécessaires pour élucider de manière plus fine

les mécanismes d'action de l'huile essentielle au niveau cellulaire et moléculaire, notamment son rôle dans la perturbation des membranes, l'induction de stress oxydatif et l'interférence avec les systèmes enzymatiques bactériens.

PARTIE V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

V. Conclusion :

Le présent travail avait pour objectif d'évaluer les propriétés antimicrobiennes et antioxydantes de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, en mettant en relation ses caractéristiques et ses mécanismes d'action potentiels.

L'extraction par hydrodistillation a permis d'obtenir un rendement satisfaisant (3,1 % à 3,8 %), cohérent avec les valeurs rapportées dans la littérature, confirmant ainsi la richesse de cette espèce en composés volatils bioactifs.

L'évaluation antimicrobienne a montré que l'huile essentielle exerce une activité significative, en particulier contre les bactéries Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*), avec des valeurs de CMI et CMB indiquant majoritairement un effet bactéricide ($CMB/CMI \leq 4$).

Parallèlement, l'huile essentielle a montré une activité antioxydante modérée mais significative dans le test DPPH, avec un IC_{50} de 0,55 mg/mL, confirmant la contribution des monoterpènes oxygénés (eucalyptol, α -pinène, limonène) à cette capacité de piégeage des radicaux libres. Cette propriété, bien que inférieure à celle de l'acide ascorbique ($IC_{50} = 0,21$ mg/mL), suggère un rôle complémentaire en protégeant les composés actifs de l'oxydation et en renforçant le stress oxydatif au niveau bactérien.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* possède un potentiel thérapeutique intéressant comme agent antibactérien naturel, soutenu par ses propriétés antioxydantes. Toutefois, des études complémentaires restent nécessaires pour évaluer sa toxicité, optimiser ses formulations (nanoémulsions, vecteurs lipidiques) et valider son efficacité in vivo. L'exploration de synergies avec des antibiotiques conventionnels pourrait également ouvrir la voie à des applications innovantes, tant en thérapeutique clinique que dans les domaines agroalimentaire et biomédical.

Ce travail met ainsi en évidence la double valeur de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*, à la fois comme ressource naturelle bioactive et comme piste prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies antimicrobiennes face à l'émergence croissante de résistances bactériennes.

PARTIE VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Partie VI . Références bibliographiques :

O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Review on Antimicrobial Resistance*, 1–20.

Klein, Eili Y., Isabella Impalli, Suprena Poleon, Philippe Denoel, Mariateresa Cipriano, Thomas P. Van Boeckel, Simone Pecetta, David E. Bloom, et Arindam Nandi. “*Global trends in antibiotic consumption during 2016-2023 and future projections through 2030.*” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2024.

Swamy, M. K., Akhtar, M. S., & Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 3012462.

Bachir, R. G., & Benali, M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(9), 739–742.

Lardry, P., Morel, P., & Vidal, J. (2007). Les eucalyptus: origine, histoire, utilisation et culture en France. *Revue Forestière Française*, 59(6), 491–502.

Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., & Kebir, H. T. (2017). Lemon (*Citrus limon*) essential oil as a novel anticancer agent: Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Food Science and Technology*, 54(2), 344–350.

Wichtl, M., Anton, R., & Paris, R. R. (2003). *Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique*. Paris: Lavoisier.

Leicach, S. R., Chludil, H. D., & Fernández, P. (2012). Environmental effects on the production of secondary metabolites in *Eucalyptus* species: Ecological and phylogenetic aspects. *Phytochemistry Reviews*, 11, 381–395.

Brooker, M. I. H., & Kleinig, D. A. (2004). *Field guide to eucalypts: south-western and southern Australia (Vol. 2)*. Bloomings Books.

Shailja, S., Raghavendra, N., & Tiwari, S. (2021). Morphological diversity and taxonomical description of *Eucalyptus globulus*. *International Journal of Botany Studies*, 6(3), 45–52.

Benabdesslem, Y., Hachem, K., & Mebarki, M. (2020). Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill. growing in Southwest Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(5), 1154–1160.

Mani-López, E., Cortés-Zavaleta, O., & López-Malo, A. (2021). A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. *SN Applied Sciences*, 3(1), Article 44.

Elangovan, S., & Mudgil, P. (2023). Antibacterial properties of *Eucalyptus globulus* essential oil against MRSA: A systematic review. *Antibiotics*, 12(3), 474.

Angane, M., Swift, S., Huang, K., Butts, C. A., & Quek, S. Y. (2022). Essential oils and their major components: An updated review on antimicrobial activities, mechanism of action and biofilm inhibition. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(22), 5970–6006.

Čmíková, N., Galovičová, L., Schwarzová, M., Vukic, M. D., Vukovic, N. L., Kowalczewski, P. Ł., Bakay, L., Kluz, M. I., Puchalski, C., & Kačániová, M. (2023). Chemical composition and biological activities of *Eucalyptus globulus* essential oil. *Plants*, 12(5), 1076.

Almeida, H. H. S., Crugeira, P. J. L., Amaral, J. S., Rodrigues, A. E., & Barreiro, M.-F. (2024). Disclosing the potential of *Cupressus leylandii* A.B. Jacks & Dallim, *Eucalyptus globulus* Labill., *Aloysia citrodora* Paláu, and *Melissa officinalis* L. hydrosols as eco-friendly antimicrobial agents. *Natural Products and Bioprospecting*, 14, 17.

Batista, D. G., Sganzerla, W. G., da Silva, L. R., Vieira, Y. G. S., Almeida, A. R., Domingui, D., Ceretta, L., Pinheiro, A. C., Bertoldi, F. C., Becker, D., Hotza, D., Nunes, M. R., da Rosa, C. G., & Masiero, A. V. (2024). Antimicrobial and cytotoxic potential of *Eucalyptus* essential oil-based nanoemulsions for mouthwashes application. *Antibiotics*, 13(10), 942.

Kashyap, R. (2024). *Exploring the molecular mechanisms and therapeutic potentials of essential oils: A systems biology approach. Future Integrative Medicine*, 3(2), 116-131.

El-Shiekh, R. A., Okba, M. M., Mandour, A. A., Kutkat, O., Elshimy, R., Nagaty, H. A., & Ashour, R. M. (2024). Eucalyptus oils phytochemical composition in correlation with their newly explored anti-SARS-CoV-2 potential: *In vitro* and *in silico* approaches. *Journal of Essential Oil Research*.

Djellouli, M., Ziane, L., & Elhendi, H. (2024). Essential oil composition and antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* from Southwest Algeria. *Sustainable Environment and Engineering Science*, 5(2), Article 560.

Nasir Shah, S., Khan, I., Tul Muntaha, S., Hayat, A., Ur Rehman, M., Ali Shah, T., Siddique, F., Salamatullah, A. M., Mekonnen, A. B., & Bourhia, M. (2023). Bioactive, antioxidant and antimicrobial properties of chemically fingerprinted essential oils extracted from *Eucalyptus globulus*: In-vitro and in-silico investigations. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1287317.

Merghni, A., Belmamoun, A. R., Urcan, A. C., Bobiş, O., & Lassoued, M. A. (2023). 1,8-Cineol (eucalyptol) disrupts membrane integrity and induces oxidative stress in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antioxidants*, 12(7), 1388.

Madormo, C., et al. (2025). *How Eucalyptus Leaves Benefit Physical and Mental Health*. Verywell Health.

Arooj, B., Asghar, S., Saleem, M., Khalid, S. H., Asif, M., Khan, I. U., Zubair, H. M., Yaseen, H. S., & Chohan, T. (2023). Anti-inflammatory mechanisms of eucalyptol rich *Eucalyptus globulus* essential oil alone and in combination with flurbiprofen. *Inflammopharmacology*.

Moreira, P., Sousa, F. J., Matos, P., Brites, G. S., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Figueirinha, A., Salgueiro, L., Batista, M. T., Branco, P. C., Cruz, M. T., & Pereira, C. F. (2022). Chemical composition and effect against skin alterations of bioactive extracts obtained by the hydrodistillation of *Eucalyptus globulus* leaves. *Pharmaceutics*, 14(3), 561.

Assaggaf, H. M., Naceiri Mrabti, H., Rajab, B. S., Attar, A. A., Hamed, M., Sheikh, R. A., Omari, N. E., Menyiy, N. E., Belmehdi, O., Mahmud, S., ... Bouyahya, A. (2022). Singular and combined effects of essential oil and honey of *Eucalyptus globulus* on anti-inflammatory, antioxidant, dermatoprotective, and antimicrobial properties: In vitro and in vivo findings. *Molecules*, 27(16), 5121.

Moreira, P., Sousa, F. J., Matos, P., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Figueirinha, A., Salgueiro, L., Batista, M. T., Branco, P. C., Cruz, M. T., Pereira, C. F., et al. (2024). Effect of bioactive extracts from *Eucalyptus globulus* leaves in experimental models of Alzheimer's disease. *Pharmaceutics*, 16(2), 254.

Yaşa Öztürk, G., & Berik Safçi, S. (2022). Effects of Eucalyptus Essential Oil in Post-COVID Syndrome: A Pilot Study. *Journal of Immunology and Clinical Microbiology*, 7(4), 82-87.

Ngo, T. C. Q., Tran, T. H., & Le, X. T. (2020). The effects of influencing parameters on the *Eucalyptus globulus* leaves essential oil extraction by hydrodistillation method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991, 012126.

Shala, A. Y., & Gururani, M. A. (2021). Phytochemical properties and diverse beneficial roles of *Eucalyptus globulus* Labill.: A review. *Horticulturae*, 7(11), 450.

Ngo, T. C. Q., Tran, T. H., & Le, X. T. (2021). The effects of influencing parameters on the *Eucalyptus globulus* leaves essential oil extraction by hydrodistillation method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991, 012126.

Immaroh, N. Z., Kuliahsari, D. E., & Nugraheni, S. D. (2021). Review: *Eucalyptus globulus* essential oil extraction method. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 733, 012103.

Ait benlabchir, A., Fikri-Benbrahim, K., Moutawalli, A., Alanazi, M. M., Halmoune, A., Benkhoulili, F. Z., Oubihi, A., Kabra, A., Hanoune, E., Assila, H., & Benziane Ouaritini, Z. (2024). GC–MS characterization and bioactivity study of *Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtaceae) essential oils and their fractions: Antibacterial and antioxidant properties and molecular docking modeling. *Pharmaceutics*, 17(11), 1552.

CLSI. (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (30th ed.). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.

Campos, F. A., da Silva, J. K. R., de Souza, C. R. F., & de Oliveira, A. L. (2023). Evaluation of bacterial membrane integrity using SYTO9/propidium iodide staining to investigate the antimicrobial mechanisms of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 135(4), 1125–1138.

Hulankova, R. (2024). Determination of minimum inhibitory and bactericidal concentrations of essential oils: Methodologies and applications. *Phytotherapy Research*, 38(2), 245–259.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70(3), 461–477.

Song, K. B., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and the kinetic analysis of their effects on foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2746–2752.

Ishak, R. A., Al-Shammari, A., & Hamid, N. (2024). Evaluation of antimicrobial activity of essential oils: Determination of MIC, MBC, and classification of antibacterial effect. *Journal of Applied Microbiology*, 136(2), 345–357.

Hoenes, K., Schulze, C., & Becker, K. (2021). Assessment of bacterial membrane integrity using SYTO9 and propidium iodide staining: Applications in antimicrobial research. *Frontiers in Microbiology*, 12, 657433.

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 47, e2437.

Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ružička, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899.

Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771–1776.

Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. (2005). Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 00, 1B.1.1–1B.1.17.

Sahin, A., Yilmaz, S., & Kaya, M. (2024). Antioxidant activity evaluation of Eucalyptus globulus essential oil and its fractions using DPPH radical scavenging assay. *Journal of Natural Products Research*, 18(2), 123–134.

Barazandeh, M. M. (2005). Chemical composition of the essential oil of Eucalyptus globulus Labill. from Kerman, Iran. . *Journal of Essential Oil Research*.

Lainez-Cerón, E. W.-C. (2021). Extraction of essential oils from Eucalyptus globulus leaves by hydrodistillation, microwave-assisted hydrodistillation and supercritical fluid extraction. . *Journal of Separation Science*.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*,.

Bassolé, I. &. (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *molecules* .

Nazzaro, F. F. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*,.

Hyldgaard, M. M. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*.

Nostro, A. G. (2014). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*,.

Bachir, R. G. (2012). Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of Eucalyptus globulus against Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*,.

Elaissi, A. R.-S. (2011). Chemical composition of 8 Eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*,.

Salem, M. Z. (2018). Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus essential oil against pathogenic bacteria and fungi. *Journal of Pure and Applied Microbiology*.

Boulekbache-Makhlouf, L. S. (2013). total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of Eucalyptus globulus cultivated in Algeria. . *Industrial crops and products*, 41, 85-89.

Akinmoladun, A. C. (2018). Catechin, quercetin and taxifolin improve redox and biochemical imbalances in rotenone-induced hepatocellular dysfunction: Relevance for therapy in pesticide-induced liver toxicity?. . *Pathophysiology*, 25(4), 365-371.

Elaissi, A. S.-S. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. . *Food Chemistry*, 129(4), 1427-1434.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.

Donsì, F., & Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233, 106–120.