

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Blida 1
Faculté des Sciences de la Nature et la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme de
Master en Science de la Nature et de la Vie
Option : Génie-Biologique

THEME

Potentielles Applications de la Fraction Aromatique d'*Eucalyptus globulus* (Labill.) comme Conservateur Nutraceutique

Présenté par
BOUMAIZA Asma

Date de Soutenance
Dimanche 28/06/2015 à 11H00

Devant le jury composé de :

M ^{me} Al-Mehdi I.	MAA	Université Blida 1	Présidente
M ^{me} Metidji H.	MAA	Université Blida 1	Examinatrice
M. Ferhat M.A.	MC-A	ENS Kouba (Alger)	Promoteur
M. Boukhatem M.N.	MC-B	Université Blida 1	Co-promoteur

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage pour persévérer et réaliser ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude et mes remerciements à mon promoteur **Monsieur Ferhat**, maitre de conférence, qui m'a aidé à la réalisation de ce modeste travail.

Je remercie mon Co-promoteur **Monsieur Boukhatem**, maitres de conférence, pour ses conseils et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je remercie très sincèrement les honorables membres de jury :

Madame Al Mehdi, maitres assistante à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Blida 1, de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Madame Metidji, maitres assistante à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Blida 1, d'avoir accepté d'apporter un jugement éclairé à ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude et mes remerciements à **Monsieur le chef de laboratoire central de l'intendance** de m'avoir accordé se stage.

Je remercie très sincèrement **Madame Azine**, chef de service de pharmacotoxicologie au Centre de Recherche et de Développement El Harrach, pour son aide précieux.

Je remercie toute l'équipe du **laboratoire d'hygiène de Blida**, pour tout le temps qui m'ont consacré et pour leurs directives précieuses durant toute la période de stage.



Dédicaces



C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail :

*A mes parents qui m'ont encouragé durant mes études et ont fait preuve
de beaucoup de patience et de sacrifice.*

*A mes deux frères Abdelkader et Oussama pour leur affection, tendresse
et soutien moral.*

*A tout ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de ce
travail ne serait ce que par leur humble présence.*

Asma

RESUME

L'objectif assigné à ce travail consiste à apporter une contribution à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (HE) de l'*Eucalyptus globulus* (Labill.), *in vitro* et dans une matrice alimentaire, afin de mieux cerner ses potentielles applications comme conservateur alimentaire à visée thérapeutique.

La composition chimique de l'essence, déterminée par Chromatographie Gazeuse-Spectrométrie de Masse, a révélé la présence de 36 composés. Le composé majoritaire est le fenchone avec un taux de 35.02%, suivi par le camphre (16%) et le 1.8-cinéole (15.7%)

Le screening antibactérien et antifongique de la fraction aromatique a été accompli par 2 méthodes complémentaires sur différentes souches (6 bactéries et 11 champignons). En phase liquide, l'HE a exhibé une activité bactériostatique remarquable sur les germes à Gram + avec des Diamètres des Zones d'Inhibition (DZI) qui varient entre 15 et 85 mm. En phase vapeur, de meilleurs résultats ont été obtenus notamment pour *Candida albicans* et *C. parapsilosis* où une inhibition totale a été notée à la plus grande concentration. De plus, cette action inhibitrice est « dose-dépendante ».

Concernant l'activité antifongique dans une matrice alimentaire, la combinaison HE-traitement thermique (80°C/10 min) a été efficace dans la réduction totale de la croissance fongique dans les jus fruités et sucrés d'Orangina®, comparativement au jus conservé avec des additifs de synthèse.

Sur le plan thérapeutique, le potentiel anti-inflammatoire de l'HE a été exploré *in vivo*. Par la méthode de l'œdème à la carraghénine, le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème a révélé que le lot traité avec l'HE, à la dose de 25 µl/kg, est celui qui a présenté le taux le plus élevé (36%), suivi par le contrôle positif (Diclofenac) avec un taux de 34.6%. Par ailleurs, l'HE a présenté une activité spasmolytique intéressante à 250µl/kg, statistiquement comparable au médicament.

L'essence d'*E. globulus* peut être référencée comme une source potentielle de molécules naturelles antimicrobiennes et constitue, éventuellement, une sérieuse alternative, particulièrement pour la prévention et/ou traitement des maladies inflammatoire et nociceptive.

Mots-clés: Antimicrobien naturel; Analgésique; *Eucalyptus globulus*; Fenchone; Huile essentielle; Microatmosphère.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the antimicrobial effect of *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oil (EGEO), *in vitro* and in a real food system, to better understand its potential applications as a food preservative agent or as nutraceutical ingredient.

The chemical composition of the EGEO was determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and revealed the presence of 36 compounds. Fenchone was found to be the major component with a rate of 35.02%, followed by camphor (16%) and 1.8-cineole (15.7%)

Antimicrobial screening of the EGEO was accomplished by two complementary assays (disc diffusion and vapor diffusion methods) against several bacterial and fungal strains (6 bacteria and 11 fungi). In the liquid phase, EGEO exhibited a potent antimicrobial effect against Gram + strains, with Diameters of Inhibitory Zones (DIZ) varied from 15 to 85 mm. In the vapor phase, our results revealed that EGEO inhibited totally *Candida albicans* and *C. parapsilosis* at the highest quantity. Moreover, this inhibitory effect was "dose-dependent."

Regarding the antifungal activity in the real food matrix, the combination of EGEO-Thermal treatment (80°C/10 min) was effective to reduce and eliminate the fungal growth in the fruit juice of Orangina®, compared to the juice preserved with synthetic preservatives.

The anti-inflammatory potential of the EGEO was explored *in vivo*. By the method of carrageenan induced paw edema, our results revealed that the group of mice treated with EGEO (25 µl/kg) presented the maximum percentage (36%) of edema reduction, followed by the positive control (diclofenac) with a rate of 34.6%. Else, EGEO exhibited, *in vivo*, a promising analgesic effect at the dose of 250 µl/kg, statistically similar to the positive control (Spasfon, 80mg).

EGEO can be referenced as a potential source of natural antimicrobial molecules and represents a serious alternative, especially for prevention / treatment of analgesic and inflammatory illnesses.

Keywords: Natural preservative; Analgesic effect; *Eucalyptus globulus*; Fenchone; Essential oil; Vapor phase.

ملخص

إن الهدف من هذه الدراسة هو إظهار نشاط مضاد للجراثيم الذي يمتلكه الزيت العطري لكافور الكالتوس، في المختبر وفي المادة الغذائية، من أجل فهم أفضل التطبيقات المحتملة لها كمادة حافظة الطعام لأغراض علاجية.

التركيب الكيميائي لزيت عطري، والتي تحددها *اللوني للغاز / قياس الطيف الكتلي* كشفت وجود 36 مركبات و fenchone مع نسبة 35.02٪ ، تليها الكافور 16٪ و 1.8-سينول 15.7٪

استعملنا طريقتين لتقييم نشاط مضاد الجراثيم . في الحالة السائلة الزيت العطري له نشاط ملحوظ على الجراثيم غرام + بأقطار لمناطق التثبيط ما بين 15 و 85 مل . في الحالة الغازية هنالك نتائج جيدة في ما يخص المبيضات البيض و المبيضات المرطبة حيث لاحظنا أن هنالك تثبيط كامل ضف إلى ذلك هذا التأثير المثبط هو " معتمد على الجرعة"

أما بالنسبة لنشاط مضاد الفطريات في المادة الغذائية فإن تركيبة الزيت العطري -المعالجة الحرارية (80 / 10 دقائق) كانت فعالا في الحد من النمو الإجمالي للفطريات في عصير الفواكه Orangina بالمقارنة مع العصير الذي يحتوي على الحافظ الاصطناعي علاجيا ، نشاط مضاد الالتهاب للزيت العطري تم اكتشافها في الجسم الحي ، من خلال طريقة ذمة الكاراجينان ، حساب نسبة تخفيض ذمة كشف أن المجموعة التي تلقت العلاج بنسبة 25 ميكرو / كغ هو الذي قدم أعلى معدل يليه الشاهد الإيجابي (ديكلوفيناك) بمعدل 34,6 ٪ أيضاً الزيت العطري يمتلك نشاط ضد التشنج مهم بجرعة 250 ميكرو / كغ مقارنة مع الشاهد الإيجابي .

الزيت العطري يمكن اعتبارها كمصدر الجزيئات الطبيعية مضادات الجراثيم و كبديل خاص للوقاية أو علاج أمراض الالتهاب و مسببة الألم.

الكلمات الجوهرية : مضاد الجراثيم الطبيعي ، مسكن الألم ، كافور الكاليتوس ، fenchone ، الزيت العطري ، الحالة الغازية

TABLE DES MATIERES

Résumé

Abstract

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Liste des Abréviations

Introduction	1
--------------	---

partie 1 : Etude Bibliographique

1. Condensé historique sur l' <i>Eucalyptus</i>	3
2. <i>Eucalyptus globulus</i> : données botaniques	3
3. Etymologie et noms vernaculaires	4
4. Classification botanique	4
5. Origine et répartition géographique	7
6. Ecologie	7
7. Production et commerce international	7
8. Usages	8
9. Huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i>	8
9.1. Composition chimique	8
9.2. Indications thérapeutiques de l'huile essentielle	9
9.3. Contre-indications et effets indésirables	10
9.4. Recherches cliniques sur l'eucalyptus	10
10. Perspectives	12

partie 2 : Etude expérimentale

chapitre 1 : Matériel et Méthodes

1.1. Matériel végétal et huile essentielle	13
1.2. Matériel animal	13
1.3. Milieux de cultures	13
1.4. Souches microbiennes	14
1.5. Étude analytique de l'huile essentielle	14
1.5.1. Contrôles physicochimiques	14
1.5.1.2. Mesure des indices chimiques	15
1.5.1.3. Mesure des grandeurs physiques	15

1.5.2. Analyses chromatographiques de l'huile essentielle	16
1.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i>	17
1.6.1. Méthode de l'aromatogramme (Technique en milieu solide)	17
1.6.2. Méthode en phase vapeur (Microatmosphère)	18
1.7. Test « Biocontrôle » : activité antifongique dans une matrice alimentaire	19
1.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue	19
1.9. Evaluation de l'activité antispasmodique (test de torsion)	20

Chapitre 2 : Résultats et Discussion

2.1. Etude analytique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	21
2.1.1. Propriétés organoleptique et physico-chimique	21
2.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle	22
2.2. Screening antimicrobien de l'huile essentielle	25
2.2.1. Résultats de l'aromatogramme	25
2.2.2. Résultats de microatmosphère	29
2.2.3. Etude comparative : Aromatogramme versus Microatmosphère	31
2.2.4. Activité antifongique de l'essence dans une matrice alimentaire	32
2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue <i>in vivo</i>	34
2.4. Etude de l'activité antispasmodique <i>in vivo</i>	35

Conclusion	37
-------------------	----

Références Bibliographiques	39
------------------------------------	----

Annexe	44
---------------	----

LISTE DES TABLEAUX

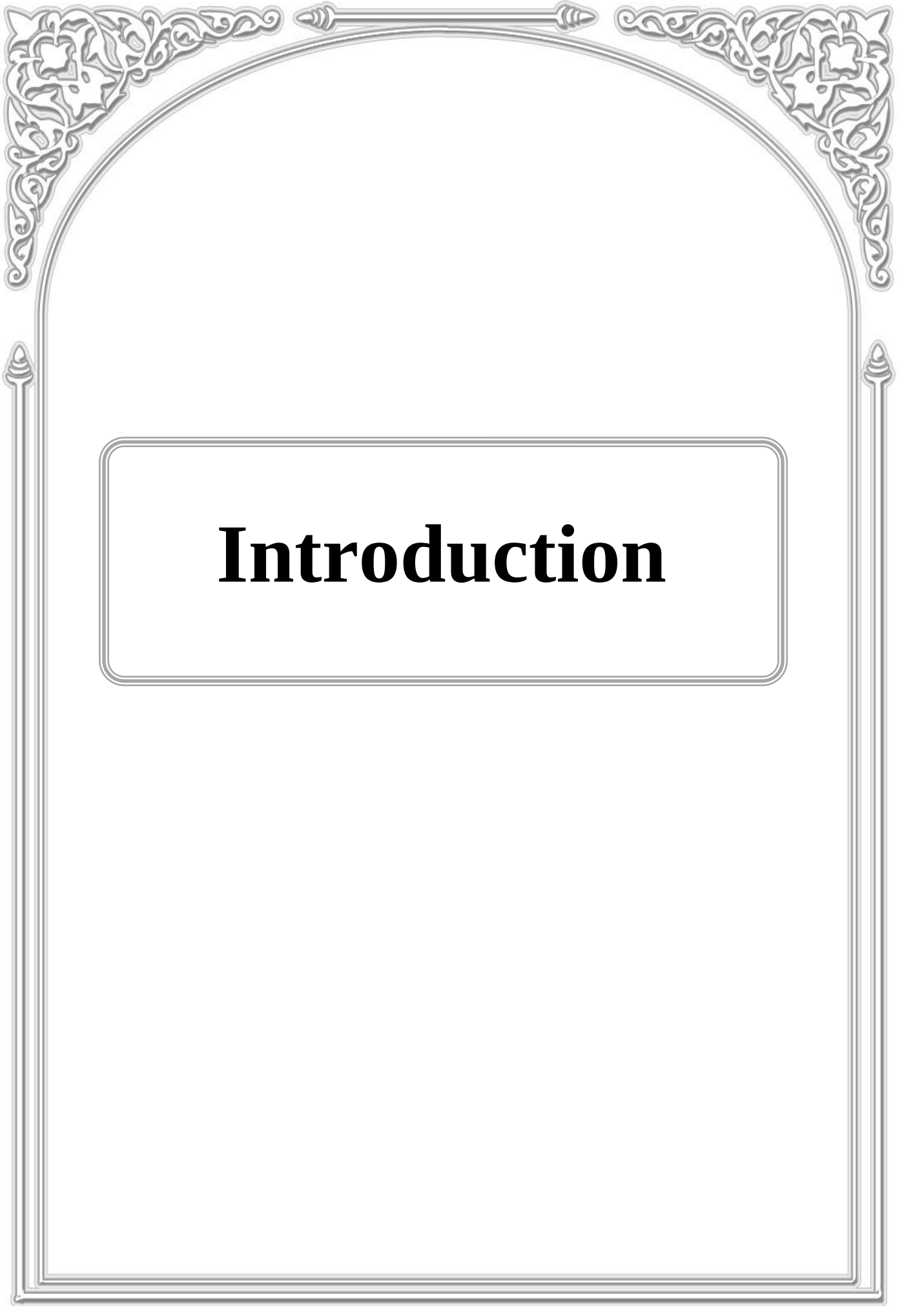
Titre	Page
Tableau I : Souches bactérienne et fongique utilisées dans le screening antimicrobien.	14
Tableau II : Paramètres physico-chimique et organoleptique de l'essence d' <i>Eucalyptus</i> .	21
Tableau III : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> distillée à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau.	22
Tableau IV : Composition chimique de l'essence d' <i>Eucalyptus</i> provenant de plusieurs pays.	24
Tableau V : Activité antibactérienne <i>in vitro</i> de l'essence d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	25
Tableau VI : Activité antifongique de l'essence aromatique d' <i>Eucalyptus globulus in vitro</i> .	26
Tableau VII : Activité antibactérienne de l'essence aromatique des espèces du genre <i>Eucalyptus</i> déterminée <i>in vitro</i> par diffusion en milieu gélosé (aromatogramme).	28
Tableau VIII : Réduction de l'inflammation dans les pattes postérieures gauches des souris.	34

LISTE DES FIGURES

Titre	Page
Figure 1. Illustration des feuilles et fruits d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	5
Figure 2. Aspect morphologique de l' <i>Eucalyptus globulus</i> .	6
Figure 3. Localisation géographique mondiale de la culture de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	7
Figure 4. Illustration de la méthode de l'aromatogramme	18
Figure 5. Illustration de la méthode de Microatmosphère	18
Figure 6. Structure chimique de quelques composés dans l'essence d' <i>Eucalyptus</i> .	23
Figure 7. Photo de quelques germes microbiens testés lors du screening antimicrobien <i>in vitro</i> avec 3 volumes croissants en essence d' <i>Eucalyptus globulus</i>	30
Figure 8. Etude comparative de l'activité antifongique de l'essence d' <i>Eucalyptus globulus</i> (aromatogramme vs microatmosphère)	31
Figure 9. Cinétique de la croissance fongique dans les jus Orangina®.	32
Figure 10. Activité analgésique périphérique de l'essence d' <i>Eucalyptus globulus in vivo</i> .	35

LISTE DES ABREVIATIONS

– AFNOR : Association Française de Normalisation	– ® : Marque enregistrée
– ATB : Antibiotique	– AINS : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien
– ATCC : American Type Culture Collection	– AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique
– ATF : Antifongique	– ANOVA : Analyse des Variances
– CG-SM : Chromatographie Gazeuse couplée avec un Spectromètre de Masse	– C : Chloramphénicol
– CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse	– DL : Dose Létale
– DZI : Diamètre de Zone d’Inhibition	– E : Erythromycine
– ECBU : Examen Cytobactériologique des Urines	– GRAS : Généralement reconnu sain
– FID : Flamme Ionisation Detector	– Ha : Hectare
– GN : Gélose Nutritive	– HEX: Hexomédine
– HE : Huile Essentielle	– i.p. : Intra-péritonéale
– IA : Indice d’Acide	– IPA : Institut Pasteur d’Alger
– IR : Indice de Rétention	– NF : Norme Française
– ISO : Organisation Internationale de Normalisation	– OMS : Organisation Mondiale de la Santé
– MHA : Muller-Hinton Agar	– ONAB : Office National du Bétail
– NMRI : Naval Medical Research Institute	– pH : potentiel d’Hydrogène
– PAM : Plantes Aromatique et Médicinale	– Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne
– SAB : Sabouraud additionné de Chloramphénicol	– PPG : Pattes Postérieures Gauches
– UFC : Unité Formant Colonie	– T- : Témoin négatif
– v/v : volume/volume	– T+ : Témoin positif



Introduction

INTRODUCTION

L'incidence, de plus en plus fréquente, des intoxications alimentaires collectives, associées à l'altération des denrées alimentaires contaminées par les micro-organismes, justifie la mise au point de nouveaux produits, de source naturelle, ayant la capacité d'inhiber la croissance de ces pathogènes et ce, sans affecter les qualités organoleptiques des aliments (**Burt, 2004**).

Les nouveaux agents antimicrobiens utilisés en industrie alimentaire doivent maintenant être le plus naturel et sécuritaire possible. Ces dernières années, les laboratoires agro-alimentaires et pharmaceutiques ont beaucoup investi dans le développement d'extraits de produits naturels à base de plantes pour contrecarrer la résistance des germes pathogènes. Par ailleurs, des études semblent montrer l'intérêt dans la bio-préservation de molécules issues de Plantes Aromatique et Médicinale (PAM) (**Holley et Patel, 2005 ; Carson et Hammer, 2011 ; Hyldgaard et al., 2012**).

Parmi ces antimicrobiens naturels, se trouvent les composés terpéniques des huiles essentielles (HE). Ces huiles sont d'un intérêt croissant pour les industries et la recherche scientifique en raison, d'une part, de leurs activité antimicrobienne (**Hyldgaard et al., 2012**) et, d'autre part, la majorité sont classées dans la liste des substances « GRAS » (Generally Recognized As Safe) (**Tisserand et Young, 2014**). Plusieurs études concernant les propriétés antimicrobiennes des HE, que ce soit *in vitro* ou dans un produit commercialisé, peuvent être trouvées dans la littérature (**Burt, 2004 ; Hyldgaard et al., 2012**).

A côté des propriétés antimicrobiennes, les HE ont montré des activités antivirale, antiparasitaire, anti-oxydante, anti-inflammatoire et spasmolytique (**Edris, 2007 ; Bakkali et al., 2008**). Ainsi, les nombreuses propriétés thérapeutiques des HE et leur bienfaits sur la santé en font à la fois des ingrédients « nutraceutiques » et des « bio-conservateurs » très prometteurs pour l'industrie. Ces substances qualifiées de nutraceutiques sont vantées pour leurs propriétés préventives et curatives. Les consommateurs s'intéressent, de plus en plus, aux bienfaits des aliments pour la santé et commencent à regarder au-delà des avantages nutritionnels pour s'intéresser à la prévention des maladies et aux composés susceptibles d'améliorer la santé que contiennent de nombreux aliments (**Dudonné, 2009**).

Bien qu'une grande partie de ces composés bioactives naturels aient été catalogués, il reste encore de nombreuses autres substances alimentaires à identifier et à évaluer. Ce dernier travail fait apparaître des molécules « aromatiques bioactives » issues d'un arbre à parfum, l'*Eucalyptus globulus* (Labill.), référencée par la médecine traditionnelle et supposant ainsi des activités biologique et pharmacologique intéressantes (**Silva et al., 2003 ; Cermelli et al., 2008 ; Batish et al., 2008 ; Djenane et al., 2011 ; Boukhatem et al., 2014**). Introduite en Algérie

durant la période coloniale (1854), l'espèce *E. globulus* a été implantée dans la pleine marécageuse de la Mitidja pour combattre la malaria, et cela grâce à son pouvoir desséchant et aux émanations balsamiques produites par l'essence de ses feuilles.

Utilisée pour ses vertus médicinales, notamment antitussives et expectorantes, l'essence aromatique n'en a pas moins des propriétés fébrifuges, toniques, astringentes, antiseptiques, hémostatiques et vermifuges (**Coppen, 2002 ; Silva *et al.*, 2003 ; Batish *et al.*, 2008**). Toutes ces considérations nous ont amené à envisager des possibilités de valorisation de l'essence de cet arbre à parfum, en vue d'offrir une alternative aux conservateurs de synthèse.

De ce fait, l'objectif assigné à notre travail consiste à étudier le pouvoir antibactérien et antifongique de la fraction aromatique de l'eucalyptus, au demeurant très peu exploitée dans les domaines nutraceutique et agro-alimentaire malgré ses immenses potentialités thérapeutique et antiseptique. Aussi, deux méthodes microbiologiques et approches techniques ont été examinées lors de cette étude. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE en phases liquide (aromatogramme) et vapeur (microatmosphère), deux techniques préliminaires, a été effectuée pour sélectionner les souches sensibles à l'action inhibitrice de l'essence aromatique. Et afin de s'affranchir de la barrière *in vitro*, un essai « Biocontrôle » a été conduit afin de mieux cerner l'efficacité de la l'essence aromatique (en combinaison avec un traitement thermique), comme conservateur alimentaire naturel, et ce dans une matrice alimentaire (boisson gazeuse sucrée et fruitée type Orangina®).

En outre, la composition chimique de l'essence a été déterminée, par Chromatographie en phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (CG-SM), afin d'établir le profil chromatographique et le chémotype de l'essence de cet arbre à parfum.

De plus et pour valider les propriétés curatives de cette fraction aromatique, l'activité anti-inflammatoire, a été abordée *in vivo* via le test de l'œdème des pattes induit par la carraghénine. Aussi, l'action anti-nociceptive (analgésique) de cette essence a été exploré *in vivo* par le « test de torsion ».



Partie 1

Etude Bibliographique

1. Condensé historique sur l'*Eucalyptus*

Les *Eucalyptus* sont utilisés pour soigner depuis des milliers d'années sur son continent d'origine, l'Australie. Les feuilles étaient utilisées par les aborigènes pour traiter les fièvres (notamment la malaria), d'où son nom commun d'arbre à la fièvre ou « Australian fever tree ». Les aborigènes vivants en Tasmanie avaient également compris l'intérêt de l'eucalyptus pour son rôle assécheur de zones marécageuses pour d'éradiquer les insectes, porteurs de maladies (**Batish et al., 2008 ; Martinetti, 2013**).

L'*Eucalyptus* a été découvert par l'explorateur et botaniste français Jacques-Julien Houtou de La Billardière en 1792, en Australie. Quand les premiers explorateurs arrivèrent sur les littoraux de ce continent, ils virent des énormes forêts d'*Eucalyptus* et baptisèrent ce nouveau continent "le pays des brouillards bleus" (**Botineau, 2010**).

Le nom botanique fut créé par le botaniste français Charles Louis L'Héritier de Brutelle en 1792 qui est l'*Eucalyptus globulus* (Labill.). Les eucalyptus furent introduits en France en 1828. De nombreux pays ont rapidement intégré les usages médicaux des feuilles d'eucalyptus dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, Île de la Réunion et Europe.

La production commerciale d'huile essentielle (HE) d'*Eucalyptus* a débuté en 1860, dans la région de Victoria en Australie. Actuellement, l'Australie, le Maroc, l'Espagne et certains pays de l'Europe de l'Est sont parmi les principaux producteurs (**Louppe, 2008 ; Martinetti, 2013**).

Dès la fin du XIX^e siècle, l'essence d'eucalyptus fut largement employée dans un but thérapeutique, pour traiter bronchites et rhumes, ainsi que pour son action antiseptique. Ces vertus ont été rapidement reconnues et l'eucalyptus fait, désormais, partie des plantes dont l'usage traditionnel est reconnu par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ; il figure également sur la liste des plantes médicinales de la Pharmacopée Française.

Au XIX^e siècle, on utilisait l'HE pour aseptiser les cathéters urinaux dans les hôpitaux anglais. De nos jours, elle entre dans la fabrication de rince-bouche (Listerine®, par exemple) et de dentifrices, de nombreuses préparations pharmaceutiques destinées aux diverses affections des voies respiratoires (Vicks Vaporub®, par exemple) et de solvants endodontiques utilisés en dentisterie. On s'en sert aussi comme dégraissant industriel (**Lis-Blchin, 2006 ; Leicach et al., 2012 ; Goetz et Ghedira, 2012**).

2. *Eucalyptus globulus* : données botaniques

L'*Eucalyptus globulus* (**Figure 2a**) pousse surtout dans les régions chaudes. Il a néanmoins besoin d'une grande quantité d'eau pour croître. L'eucalyptus commun ou gommier bleu est un arbre sempervirent qui peut croître jusqu'à 30-55 m de haut.

Les feuilles d'*Eucalyptus globulus*, persistantes, ont la particularité d'être totalement différentes selon l'âge du rameau qui les porte. Les feuilles des arbres matures sont alternes, étroites et d'un vert foncé luisant (**Figure 2b**). Ces feuilles matures renferment de nombreuses

poches sécrétrices. Elles sont riches en HE responsable des propriétés thérapeutiques. Les feuilles poussent sur des tiges cylindriques et mesurent de 15 à 35 cm de long.

Les boutons floraux, en forme de toupie, sont côtelés et recouverts d'un opercule aplati portant un bouton central. Les fleurs, de couleur crème (**Figure 2d**), sont solitaires à l'aisselle des feuilles.

Les fruits (**Figure 2e**) ligneux mesurent de 1,5 à 2,5 cm de diamètre et ont une capsule très dure, en tombant au sol qu'ils laissent échapper les graines, fécondées par des grains de pollen apportés principalement par les insectes (**Boullard, 2001 ; Louppe, 2008 ; Goetz et Ghedira, 2012**).

3. Etymologie et noms vernaculaires

Le nom "eucalyptus" vient du grec "eu" qui signifie "bon" ou "bien" et de "kalypto" qui signifie "couvrir", car les pétales et sépales sont soudés. Le nom commun de "gommier" fait allusion à la gomme résineuse rouge qu'ils exsudent quand ils sont blessés (**Lis-Balchin, 2006 ; Louppe, 2008**).

Diverses appellations ont été attribuées à l'*E. globulus*. Nous citerons quelques unes :
En français : eucalyptus officinal ; gommier bleu ; arbre à la fièvre ; arbre au koala (**Aït Youssef, 2006**).

En arabe : kalibtous, kritus, kalitus

En targui ou berbère : Calitous.

En anglais : Australian fever tree ; Bleu gum tree ; Tasmanian bleugum (**Goetz et Ghedira, 2012**).

4. Classification botanique

La classification botanique de l'espèce *E. globulus* (**Goetz et Ghedira, 2012**) est la suivante :

Règne :	Plantes
Embranchement :	Phanérogames
Sous-embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous classe :	Dialypétales
Série :	Caliciflores
Ordre :	Myrtales
Famille :	Myrtacées
Genre :	<i>Eucalyptus</i>
Espèce :	<i>Eucalyptus globulus</i> (Labill.)

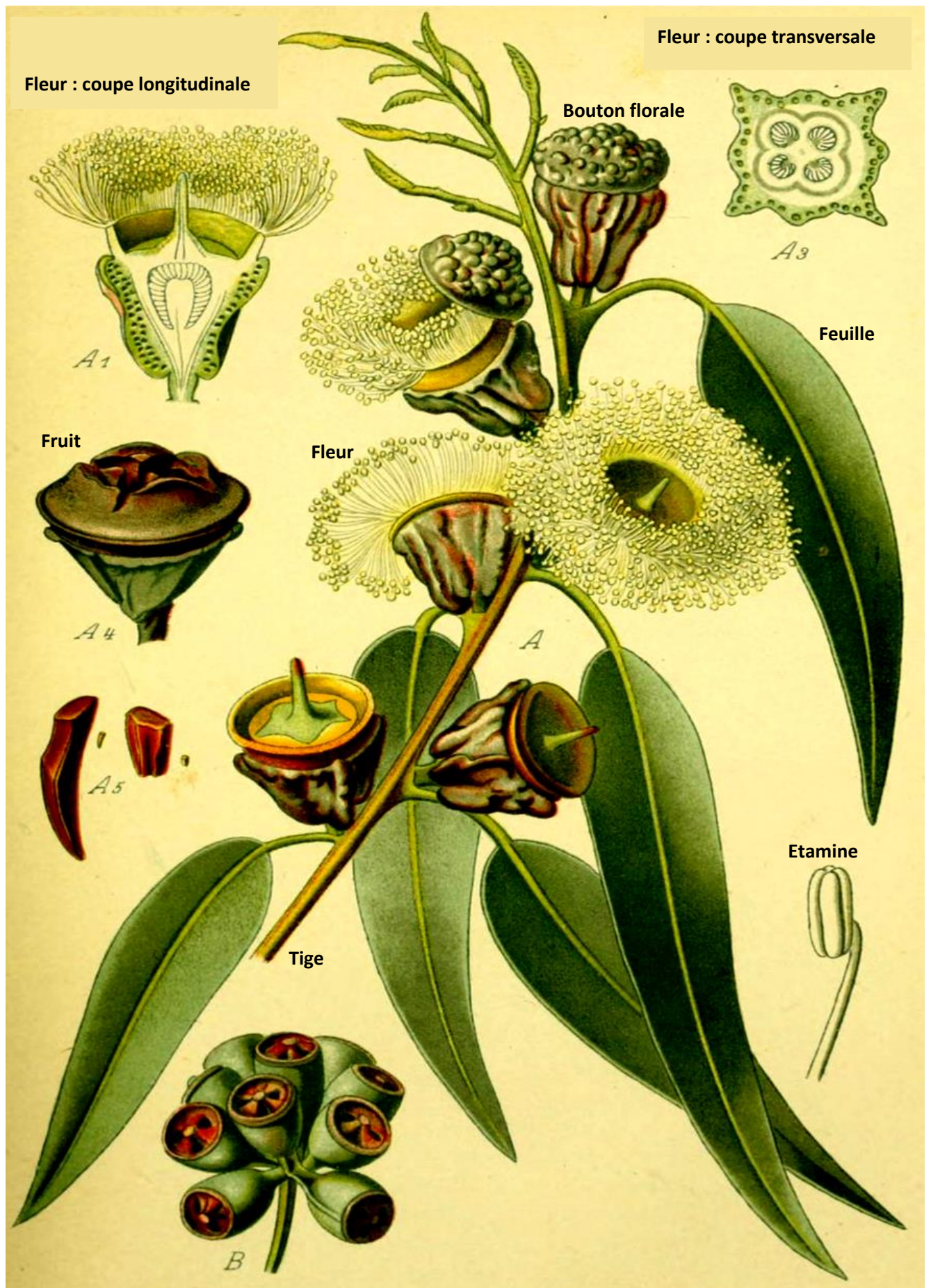


Figure 1. Illustration des feuilles et fruits d'*Eucalyptus globulus*.

(www.images.google.fr).



Fleur →

Fruit →

Feuille →



a. port d'un arbre isolé

b. feuille, fruit et fleur



c. Tronc

d. Fleur

e. Jeunes fruits



f. Semis



g. Pousse de jeune plante

Figure 2. Aspect morphologique de l'*Eucalyptus globulus*. (www.flickr.com)

5. Origine et répartition géographique

Eucalyptus globulus est spontané en Tasmanie et dans le sud-est de l'Australie, mais il est actuellement largement planté et naturalisé dans les régions subtropicales du monde entier. En Afrique tropicale, on le rencontre dans les régions fraîches d'altitude. L'espèce a été introduite en Algérie en 1854, et implantée dans la pleine marécageuse de la Mitidja pour combattre la malaria, et cela grâce à son pouvoir desséchant et aux émanations balsamiques produites par

l'essence de ses feuilles. Le genre comprend plus de 700 espèces dont la plus répandue est *E. globulus*. La distinction entre différentes espèces serait essentiellement basée sur la morphologie des anthères (Ait Youssef, 2006 ; Louppe, 2008).

6. Ecologie

Eucalyptus globulus pousse dans les régions tropicales à 2000–2800 m d'altitude, et sous des climats doux et tempérés à 0–1000 m d'altitude. La pluviométrie annuelle moyenne se situe entre 500–2400 mm. Si les semis sont sensibles aux gelées, l'arbre les tolère de mieux en mieux avec l'âge. Ayant besoin d'un bon drainage, il pousse mieux sur des sols profonds, sablo-argileux. *E. globulus* préfère un sol au pH de 5–7, et ne supporte pas les sols très calcaires ou alcalins. Sa multiplication se pratique par semis des graines à l'automne (Figure 2fg), dans des godets, sous serre. Les plantes sont repiquées au printemps, et les feuilles sont récoltées en été, en choisissant les plus allongées et étroites, portées par les branches plus âgées (Wei et Xu, 2003 ; Tassin et al., 2011).

7. Production et commerce international

Pour l'année 1995, les plantations mondiales d'*Eucalyptus* ont été estimées à environ 18 millions d'ha, dont 2.2 million en Afrique, principalement en Afrique du Sud (Figure 3). On estime que, dans le monde, jusqu'à 2,5 millions d'ha sont plantés d'*Eucalyptus globulus*, essentiellement dans des régions de climat tempéré, comme l'Espagne, le Portugal, le Chili et l'Australie. En Ethiopie, près de 145 000 ha d'*Eucalyptus* ont été plantés, dont une proportion importante d'*Eucalyptus globulus*. C'est la Chine qui domine le marché mondial des huiles d'*Eucalyptus* (Coppen, 2002 ; Lis-Balchin, 2006 ; Louppe, 2008).

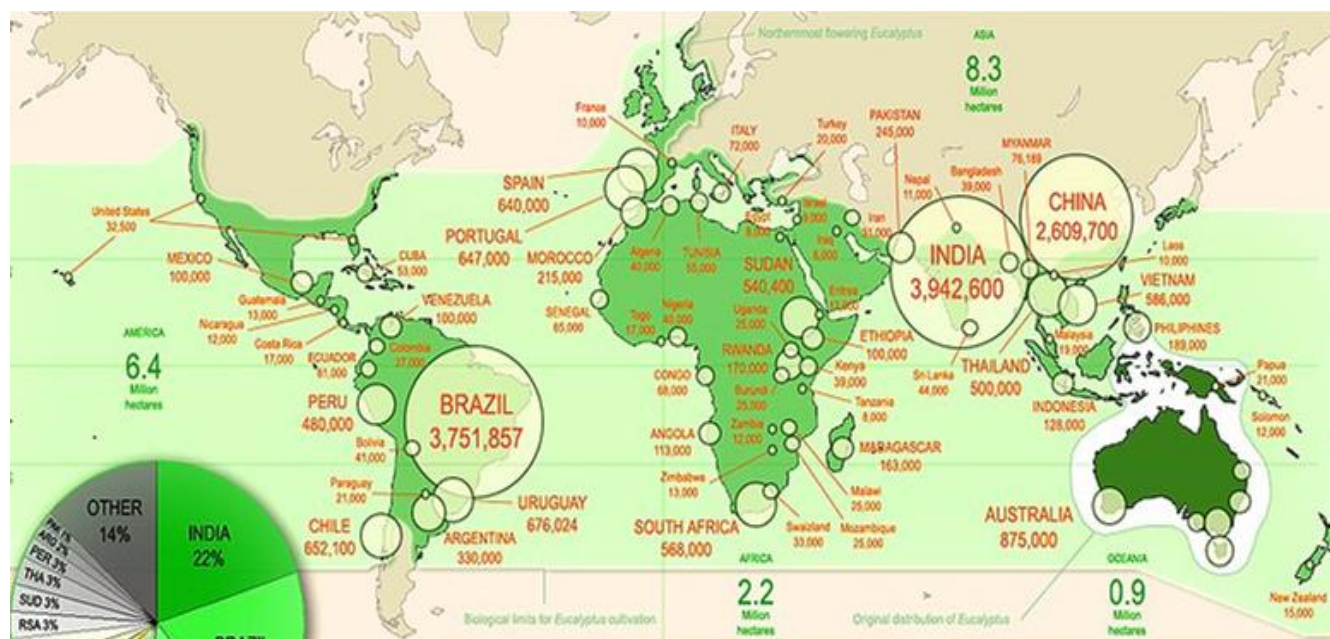


Figure 3. Localisation géographique mondiale de la culture de l'*Eucalyptus globulus* (Intensité de la coloration verte correspond à une forte production) (www.images.google.fr)

8. Usages

Les propriétés remarquables d'*Eucalyptus globulus* sont appréciées à leur valeur et on se préoccupe d'en tirer partie, non seulement pour la thérapeutique, mais encore pour l'assainissement des pays marécageux (**Ait Youssef, 2006**). En effet, les propriétés absorbantes dont il procure, les émanations aromatiques qu'il répand autour de lui, prévoit qu'il peut jouer un rôle salubre dans les pays marécageux et d'exercer une action salubre sur laquelle on avait cru pouvoir compter pour assainir les pays infestés par le paludisme (**Batish et al., 2008 ; Leicach et al., 2012**).

E. globulus a également servi dans les reboisements; ses forêts donneraient en 15 ou 20 ans ce que l'on obtiendrait en 100 ou 150 ans dans les forêts ordinaire. Le rôle d'*Eucalyptus globulus* est très important pour le bois de feu et la production de charbon de bois, de même que comme source de pâte pour la fabrication de papiers d'impression ou d'écriture, de papiers spéciaux. Grâce à son système racinaire dense, il se prête à la lutte contre l'érosion. *E. globulus* est également planté en brise-vent, et les jeunes plants constituent des haies vives efficaces car elles sont immangeables par le bétail. On s'en sert pour la restauration des terres, notamment l'assèchement des marais (**Leicach et al., 2012**).

Les feuilles d'*Eucalyptus globulus* sont la principale source d'huile d'eucalyptus dans le monde. Utilisée pour ses vertus médicinales, notamment antitussives et expectorantes, elle n'en a pas moins des propriétés fébrifuges, toniques, astringentes, antiseptiques, hémostatiques et vermifuges (**Martinetti, 2013**).

Les fleurs, source de nectar pour les abeilles, donnent un miel qui a un goût de raisin muscat.

En médecine traditionnelle africaine, l'infusion ou la décoction de feuilles se prend ou s'emploie en usage externe dans le bain, en lotion ou en lavement, contre l'asthme, la bronchite, l'amygdalite, les rhumes, les troubles urinaires et les hémorragies. On inhale la vapeur des feuilles séchées et bouillies en cas d'asthme, de toux, de grippe, de croup et de diphtérie, ou bien on inhale la poudre fine des feuilles. Au Soudan on boit la décoction des feuilles, et à Madagascar on fait chauffer les feuilles dont on inhale ensuite la vapeur, dans les deux cas pour soigner le paludisme. Les feuilles réduites en poudre ou écrasées ou bien la décoction de feuilles sont appliquées sur les abcès et les plaies. En friction, la pâte de poudre de feuilles sert à soigner les rhumatismes. Au Kenya, la décoction de feuilles est utilisée dans l'eau du bain pour traiter la varicelle chez les enfants. En Ethiopie, on fait des gargarismes à base d'extrait de feuilles en cas de méningite. En Afrique australe, on utilise les feuilles contre les maux d'estomac. La résine gommeuse de la plante s'utilise contre la diarrhée. Diverses préparations à base de feuilles sont utilisées comme insectifuge, et au Kenya, on se sert des feuilles, fraîches ou séchées, pour lutter contre les escargots (**Coppen, 2002 ; Louppe, 2008**).

9. Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

9.1. Composition chimique

L'essence d'eucalyptus est extraite par entraînement à la vapeur d'eau des feuilles sèches (adultes plus riches en huile) ou encore des tiges terminales fraîches. Le rendement de l'opération d'extraction de l'HE varie de 1 à 3% (**Louppe, 2008**).

Il existe plus des centaines de variétés d'*Eucalyptus*, et toutes ne possèdent pas les mêmes composants. Cependant, il y a certains composants qui reviennent dans la majorité des cas, et ceux-ci sont bien souvent ceux qui sont à l'origine des bienfaits que l'on attribue à l'eucalyptus.

Parmi ces composés, le cinéol ou eucalyptol (70% à 80%) est sans doute le plus connu car il est un expectorant, peut soulager la toux, et lutter contre les problèmes des voies respiratoires. Les autres constituants de cette HE sont très divers, nombreux et minoritaires. Pinène, limonène, et au moins 250 autres composés dont citronellal, cryptone, pipéritone viendront étoffer la liste des nombreux composés aux vertus médicinales de l'eucalyptus (**Batish et al., 2008 ; Leicach et al., 2012 ; Silvant, 2015**).

9.2. Indications thérapeutiques de l'huile essentielle

Les propriétés de l'eucalyptus sont dues principalement à un éther-oxyde terpénique contenu dans l'HE produite par les feuilles. Anciennement nommée eucalyptol, cette substance porte désormais le nom de cinéol. Le cinéole, qui représente 55 à 70% de la composition de l'essence, est un fluidifiant des sécrétions ORL et bronchiques. L'alpha terpinéol (entre 9 et 15%) est un anti infectieux polyvalent et bien toléré (**Louppe, 2008**).

L'HE a démontré une activité antibactérienne et antifongique. Elle a aussi une activité anti-amibienne et larvicide. Des extraits aromatiques ont fait ressortir *in vivo* des effets analgésiques et anti-inflammatoires chez les rats et les souris. Rien ne prouve toutefois qu'elle ait une action antipaludéenne ; en effet, la croyance selon laquelle *E. globulus* aurait des effets antipaludéens pourrait remonter à l'époque où il avait été planté afin d'assécher les marais du sud de l'Europe ; de là son rôle indirect dans la lutte contre le paludisme. Les HE des feuilles ont montré des effets anti-inflammatoires et inhibiteurs sur l'activation du virus d'Epstein-Barr ainsi qu'une activité anti-tumorale (**Louppe, 2008**).

Sur un plan médicinal, l'eucalyptus présente de nombreuses vertus. Expectorant, antiseptique et astringent, cet arbre, venu d'Australie, permet de lutter contre les inflammations des voies respiratoires et digestives. Ses feuilles constituent un bon remède contre le rhume, la rhinite, la sinusite, la bronchite ou encore l'état grippal. L'eucalyptus aide aussi à lutter contre l'asthme et peut être utilisé pour la désinfection de plaies (Goetz et Ghédira, 2012).

L'OMS reconnaît l'usage traditionnel des *E. globulus* pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme. Elle reconnaît l'emploi de l'HE pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (voie externe) (**Silva et al., 2003**).

Plusieurs préparations pharmaceutiques offertes en vente libre renferment de l'huile essentielle d'eucalyptus : pommades, sirops, pastilles, comprimés et vaporisateurs pour combattre les infections des voies respiratoires; rince-bouche ou dentifrices pour prévenir l'inflammation de la bouche; liniments pour soulager les douleurs rhumatismales (**Escop, 2003 ; Festy et Pacchioni, 2014**).

9.3. Contre-indications et effets indésirables

L'essence aromatique d'eucalyptus nécessite quelques précautions. Elle ne doit pas, par exemple, être utilisée en usage interne, sans avis médical. Par ailleurs, à terme, l'ingestion d'eucalyptus peut avoir un effet néfaste sur les reins. C'est pourquoi son utilisation doit se faire avec prudence, dans le cas d'une infection urinaire. Dans de rares cas, l'utilisation de l'eucalyptus peut provoquer des nausées, des vomissements ou des diarrhées. Ces effets indésirables sont toujours passagers.

L'HE est neurotoxique (épileptogène) à forte dose (DL 50= 1.7 ml/kg chez le rat en i.p.), à dose moindre, quelques troubles digestifs, de l'hypotension et de la confusion mentale; aux doses thérapeutiques usuelles (0.05 à 0.2 ml/jour) aucun risque toxique (**Lis-Balchin, 2006 ; Louppe, 2008**).

Plusieurs sources déconseillent également l'usage interne chez les enfants. De nombreux cas de suffocation chez les jeunes enfants ont été attribués à L'HE d'*Eucalyptus*. Une étude au cours de laquelle ont été analysés 109 de ces incidents (**Day et al., 1997**), révèle que, dans 74 % des cas, il s'agissait d'enfants de moins de 2 ans qui se sont servis d'HE d'un vaporisateur ou d'un diffuseur à leur portée.

Des essais sur des souris n'ont démontré aucune toxicité sur l'embryon ou le fœtus. Aucun cas d'avortement, d'accouchement prématuré ou de malformation à la naissance n'a été signalé chez les humains. Cependant, certaines sources préfèrent recommander aux femmes enceintes ou qui allaitent d'éviter l'eucalyptus en l'absence de données toxicologiques complètes (**Goetz et Ghédira, 2012**).

9.4. Recherches cliniques sur l'eucalyptus

Les chercheurs croient que les propriétés médicinales de l'eucalyptus sont surtout attribuables à l'eucalyptol (1,8-cinéole) que renferment ses feuilles. C'est pourquoi on s'entend généralement pour dire que, pour être efficace, l'HE doit renfermer de 70 % à 85 % de cette substance (**Goetz et Ghédira, 2012**).

Des essais cliniques ont démontré que le 1-8-cinéol permet de réduire la dose de corticostéroïdes prise par des patients souffrant de rhume ou d'asthme. Des études scientifiques sont menées pour préciser une éventuelle action sur les cellules cancéreuses. En revanche, l'utilité de l'eucalyptus

dans le traitement du diabète, bien que faisant l'objet de nombreuses rumeurs, n'a jamais été prouvée.

Plusieurs études cliniques menées avec le myrtol, un composé isolé du myrte (*Myrtus communis* L.) et riche en 1,8-cinéole, ont aussi donné de bons résultats pour le traitement des infections des voies respiratoires (Matthys *et al.*, 2000 ; Behrbohm *et al.*, 1995 ; Meister *et al.*, 1999) et de la sinusite (Behrbohm *et al.*, 1995 ; Federspil *et al.*, 1997). Bien qu'on ne puisse extrapoler directement ces résultats à l'huile essentielle d'eucalyptus, des études *in vitro* ou menées sur des animaux indiquent que celle-ci a des propriétés bactéricides, fongicides, antivirales et antimicrobiennes (Coppen, 2002). Le myrte est une plante aromatique méditerranéenne de la même famille que l'eucalyptus.

- **Bronchite chronique :** Un essai clinique mené auprès de 242 sujets atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique a démontré que la prise de cinéole (200 mg, 3 fois par jour) durant 6 mois a réduit la fréquence et la durée des exacerbations plus efficacement qu'un placebo (Worth *et al.*, 2009). Tous les sujets recevaient en parallèle leur traitement médical standard. En outre, 2 études cliniques menées avec le myrtol, un composé isolé du myrte (*Myrtus communis*) et riche en cinéole, ont donné de bons résultats pour le soulagement de la toux et la réduction de la fréquence des exacerbations chez des gens atteints de bronchite chronique (Meister *et al.*, 1999).

- **Asthme :** Dans l'étude publiée par Juergens *et al.* (2003), il est suggéré que l'eucalyptol, un des ingrédients de l'huile d'eucalyptus, possède des propriétés mucolytiques permettant de fluidifier le mucus des voies respiratoires, et pourrait ainsi être utilisé en complément de stéroïdes dans le traitement de l'asthme d'intensité sévère.

Des études réalisées chez l'animal indiquent que ses effets bénéfiques contre l'asthme s'expliqueraient par ses propriétés anti-inflammatoires, en particulier sa capacité de diminuer la production des molécules responsables de l'inflammation et appelée cytokines (Silva *et al.*, 2003; Vigo *et al.*, 2004).

- **Infections et inflammations des voies respiratoires :** Au cours de trois essais cliniques, le 1,8-cinéole que contient l'eucalyptus s'est révélé efficace pour réduire la dose de corticostéroïdes utilisée par des sujets souffrant d'asthme (Juergens *et al.*, 2003) et pour combattre le rhume (Kehri *et al.*, 2004 ; Tesche *et al.*, 2008).

- **Action analgésique :** Les études sur les humains manquent pour confirmer l'efficacité de l'eucalyptus pour combattre l'inflammation et la douleur qui en découle. Des essais sur des souris ont cependant permis d'observer que l'eucalyptus exerce une activité antidouleur (Santos et Rao, 2000). On pense généralement que cette activité serait attribuable aux propriétés antioxydantes de la plante (Grassmann *et al.*, 2000). De plus, une étude préliminaire suggère qu'une combinaison d'huiles incluant de l'huile de l'eucalyptus pourrait abaisser la douleur et les symptômes dépressifs chez des patients souffrant d'arthrite (Kim *et al.*, 2005).

▪ **Hygiène buccale** : Des données préliminaires ont établi que l'eucalyptus peut combattre la plaque dentaire et les bactéries qui la causent (**Osawa et al., 1996**). Des dentifrices et des rince-bouche renfermant de l'HE d'eucalyptus ont donné des résultats bénéfiques au cours d'essais cliniques portant sur l'hygiène buccale (plaque dentaire, gingivite) (**Fine et al., 2000; Charles et al., 2001**). Ces produits (Listerine® et génériques) contiennent généralement aussi du thymol et du menthol.

Au cours d'un essai publié en 2008, 97 sujets souffrant de gingivite modérée ont consommé de la gomme à mâcher contenant un extrait d'eucalyptus (0,4 %) ou un placebo, cinq fois par jour, durant 12 semaines : la gomme à mâcher à l'extrait d'eucalyptus, quelle que soit sa concentration, a été plus efficace que celle renfermant un placebo pour améliorer la santé des gencives des participants (**Goetz et Ghédira, 2012**).

▪ **Insectifuge** : L'HE d'eucalyptus est un remède traditionnel pour éloigner les insectes piqueurs (**Baudoux, 2000**). Au cours d'une étude croisée menée en Suède, un insectifuge à base d'eucalyptus (Citriodiol®) a réduit de moitié les morsures de tiques subies par 111 participants à des activités de plein air (**Gardulf et al., 2004**). Au cours d'un essai effectué en Malaisie, un produit à base d'eucalyptus a été très efficace pour prévenir les morsures de sangsues (**Kirton, 2005**).

10. Perspectives

L'avenir d'*Eucalyptus globulus* semble particulièrement assuré. La demande mondiale en produits forestiers industriels a augmenté et ne cessera d'augmenter, les plantations fournissant une proportion croissante de ces produits. *Eucalyptus globulus* constitue une source non négligeable de ce genre de produits ; il ne pourra que continuer à gagner en superficie plantée dans les principaux pays de production. L'intensification ininterrompue des plantations d'*E. globulus* dans ces pays contribuera également à renforcer la production.

En Afrique tropicale, l'accroissement de la population a provoqué une envolée de la demande en bois de construction. Dans les pays montagneux où *Eucalyptus globulus* est déjà répandu ainsi que dans ceux où il n'est pas encore très utilisé, il gagnera en importance grâce à ses possibilités de production. Par la suite, tant les changements qui interviendraient sur les marchés nationaux africains qu'une forte demande qui émanerait des marchés mondiaux pourraient permettre aux pays africains de se tourner vers des plantations industrielles d'*Eucalyptus globulus* plus intensives.

Un autre aspect concernant les perspectives qui se dessinent pour *Eucalyptus globulus* est l'usage de son HE. On lui a certes prêté un nombre incalculable d'usages médicaux, encore faut-il vérifier rigoureusement de nombreuses propriétés pharmacologiques. L'engouement croissant que suscitent les remèdes naturels pourrait doper encore plus le rôle de l'HE, à la fois sur les marchés internationaux et locaux en Afrique (**Louppe, 2008**).



Partie 2

Etude expérimentale



Chapitre 1

Matériel et méthodes

Notre étude expérimentale s'est étalée sur une période de quatre mois, mois de mars jusqu'au mois de juin, les différentes expérimentations que nous avons réalisées ont été faites dans les structures suivantes :

- Centre de Recherche et de Développement (CRD) SAIDAL (Alger).
- Le laboratoire central de l'intendance EL Harrach.
- Le laboratoire d'hygiène Blida.

L'objectif assigné à ce travail consiste à apporter une contribution à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle (HE) de l'*Eucalyptus globulus* (Labill.), *in vitro* et dans une matrice alimentaire, aussi de déterminer *in vivo* la activité anti-inflammatoire, et l'action spasmolytique ; afin de mieux cerner ses potentielles applications comme conservateur alimentaire à visée thérapeutique.

1.1. Matériel végétal et huile essentielle

L'huile essentielle de l'eucalyptus officinal (*Eucalyptus globulus* Labill.) a été fournie par la société « Ziphee.Bio » spécialisée dans la production des huiles essentielles et des engrais biologiques, sise à Lakhdaria (Bouira). L'HE a été extraite à partir de la partie aérienne fraîche de l'arbre (feuilles et rameaux) en 2013. Le procédé d'extraction utilisé est l'entraînement à la vapeur d'eau conduit à échelle industrielle. Aussi, l'HE est certifiée « 100% naturelle » car n'ayant été additionnée ou mélangée à aucun solvant organique durant la phase de production. Elle a été conservée dans des flacons stériles teintés à 4°C et à l'abri de l'air et de la lumière, pendant toute la durée de notre travail, pour éviter d'éventuels phénomènes d'oxydation ou de contamination.

1.2. Matériel animal

Les différentes analyses pharmacologiques ont été effectuées sur des souris de souche NMRI provenant de l'animalerie du Centre de Recherche et de Développement (CRD) SAIDAL (Alger). Au total, une soixantaine de souris, de sexe mâle et femelle et dont le poids moyen est de 20 g, ont été utilisées. Ces animaux ont été stabulés dans des cages en plastique à une température ambiante et un éclairage de 12 heures par jour, avec un régime alimentaire de granulés d'origine ONAB et de l'eau de manière *ad-libitum*. L'expérience a porté sur des souris saines et adultes.

1.3. Milieux de cultures

Lors du screening microbien, nous avons utilisé des milieux de culture solides, en l'occurrence la gélose Muller-Hinton (MHA) pour les bactéries et la gélose Sabouraud-Chloramphénicol (SAB) pour les champignons. Aussi, des milieux de culture sélectifs ont été

utilisés (gélose Chapman et gélose Hecktoen) pour identifier et sélectionner certaines bactéries. Tous ces milieux de culture proviennent de la société Idéal-Labo (Blida).

1.4. Souches microbiennes

L'activité antibactérienne a été évaluée sur 2 souches de référence ATCC (American Type Culture Collection) et 4 souches bactériennes isolées cliniquement à partir des denrées alimentaires ou de prélèvements purulents des malades. Toutes les souches entérobactériennes ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida à l'aide de galeries biochimiques miniaturisées (API 20 E).

Concernant les souches fongiques, nous avons utilisé 5 champignons filamenteux (moisissures) et 6 levures (**Tableau I**). Ces souches ont été identifiées au niveau du service Mycologie de l'Institut Pasteur d'Alger (IPA). L'identification des moisissures est principalement réalisée par examens macro et microscopique.

Tableau I : Souches bactérienne et fongique utilisées dans le screening antimicrobien.

Souches bactériennes	Origine	Souches fongiques	Origine
Bactéries à Gram -		<i>Candida albicans</i>	ATCC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC	<i>Candida albicans</i> Ca1	Infection cutanée
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Pus (pied diabétique)	<i>Candida albicans</i> Ca2	Infection cutanée
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	Eau de puits	<i>Candida parapsilosis</i>	Alimentaire
<i>Escherichia coli</i>	Eau de surface	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alimentaire
Bactéries à Gram +		<i>Trichosporon</i> sp.	Infection cutanée
<i>Bacillus ceureus</i>	ATCC	<i>Aspergillus niger</i> (An1)	Infection cutanée
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus	<i>Aspergillus niger</i> (An2)	Infection cutanée
	(pied diabétique)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Air
		<i>Aspergillus flavus</i>	Air
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404

1.5. Étude analytique de l'huile essentielle

Les nombreux paramètres intervenant dans la composition des HE ont amené les organismes de normalisation (AFNOR, ISO) à édicter un certain nombre de règles qui

concernent les propriétés organoleptiques, physico-chimiques et le profil chromatographique des huiles aromatiques.

1.5.1. Contrôles physicochimiques :

Selon les recommandations de la Pharmacopée Européenne (**Ph. Eur, 2007**), les contrôles physico-chimiques des HE sont nécessaires pour évaluer leur qualité.

1.5.1.1. Propriétés organoleptiques :

En concertation avec d'autres personnes, les différentes caractéristiques organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de l'essence d'eucalyptus officinal ont été notées.

1.5.1.2. Mesure des indices chimiques :

- Détermination de l'Indice d'Acide (IA) :

• Définition :

Il s'agit du nombre de milligrammes d'Hydroxyde de Potassium (KOH) nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'HE. Cet indice est déterminé selon les indications de la norme ISO 1242 : 1999 (T 75-103).

• Mode opératoire et calcul :

Après la pesée d'une quantité de 2g d'HE que nous l'introduisons dans le ballon en additionnant 5 mL d'éthanol (95°) et 5 gouttes au maximum d'indicateur de couleur (rouge de phénol), la titration de ce liquide se fera avec une solution de KOH (0.02 mol/L) jusqu'à l'obtention d'un virage de coloration persistant pendant 30 secondes. Le volume de la solution KOH utilisé est noté alors. L'IA est calculé par l'équation suivante :

$$IA = \frac{V * C * 59.11}{m}$$

IA : Indice d'Acide ; V : volume (mL) KOH utilisé ; C : concentration KOH (mol/L) ; m : masse (g) prise d'essai (2 g).

- Mesure de la miscibilité à l'éthanol :

L'évaluation est effectuée selon les indications de la norme NF T 75-101 : 1999. Très souvent les HE, de caractère lipophile, sont solubles dans les solvants organiques courants. Une composition chimique, riche en terpénoïdes et souvent en molécules polaires, permet la solubilisation des HE dans l'éthanol.

• Principe :

Cette évaluation consiste en l'addition graduelle, à une prise d'essai de l'HE, d'une solution d'éthanol, de titre alcoométrique adéquat, ce qui permet de voir la miscibilité de l'HE. Une HE est dite miscible à V volumes ou plus d'éthanol de titre alcoométrique déterminé, à la température de 20°C, lorsque le mélange d'un volume de l'HE considérée avec V volumes de cet éthanol est limpide.

- **Mode opératoire :**

A l'aide d'un tube à essai, un mélange hydro-éthanolique (70°) est ajouté à l'HE. L'addition est effectuée par fractions de 0.5 mL jusqu'à miscibilité complète, en agitant énergiquement après chaque addition. Lorsque le mélange est parfaitement limpide, le volume du mélange utilisé est noté.

1.5.1.3. Mesure des grandeurs physiques :

- **Détermination de la densité relative à 20°C (d^{20}) :** NF ISO 279 :1999 (T 75-111)

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'HE à la masse d'un volume égal d'eau à 20°C.

- **Mode opératoire et calcul :**

Les méthodes homologuées prévoient l'utilisation d'un pycnomètre. Or dans notre pratique courante et par manque d'une quantité suffisante d'HE, nous étions dans l'obligation de procéder par une méthode de routine qui consistait à prélever, par une micropipette, un volume de 200 µl et de le peser avec une balance analytique de précision.

- **Détermination de l'indice de réfraction :** NF ISO 280 : 1999 (75-112)

C'est le rapport entre le sinus des angles d'incidence et de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'HE maintenue à une température constante. La détermination de l'indice de réfraction (n^{20}_D) pour une HE permet seulement de vérifier sa pureté et si elle est conforme aux normes établies.

- **Mode opératoire et calcul :**

Régler le réfractomètre en mesurant l'indice de réfraction de l'eau distillée qui doit être de 1.333 à 20°C. Après ouverture du prisme secondaire, une quantité de 2 gouttes d'HE est déposée sur la partie centrale du prisme principal. Le prisme secondaire sera fermée ensuite doucement ce qui permettra à l'HE de s'étaler entre les prismes principal et secondaire en un film mince. La lecture de la mesure s'effectue à une température stable et cette valeur sera modifiée suivant le changement de température.

1.5.2. Analyses chromatographiques de l'huile essentielle :

- **Conditions opératoires :**

Les analyses chromatographiques ont été effectuées sur un chromatographe en phase gazeuse, à régulation électronique de pression, de type Hewlett Packard (série HP 6890, Palo Alto, Californie, USA), équipé d'une colonne capillaire HP-5 (30 m x 0.25 mm) avec une épaisseur de film de 0.25 µm, d'un détecteur FID réglé à 280 °C et alimenté par l'Hélium et un injecteur *split-splitless* réglé à 250 °C. Le mode d'injection est *split*. Le gaz utilisé est l'azote avec un débit de 1.7 mL.min⁻¹. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C.min⁻¹. L'appareil est piloté par un système informatique de type « *HP Chem*

Station », gérant le fonctionnement de l'appareil et permettant de suivre l'évolution des analyses chromatographiques.

L'identification des constituants a été réalisée en se basant sur leurs Indices de Rétention (IR). Cette dernière est réalisée sur un Chromatographe en Phase Gazeuse de type Hewlett-Packard (série HP 6890) couplé avec un Spectromètre de Masse (série HP 5973). La fragmentation est effectuée par impact électronique sous un champ de 70eV. La colonne utilisée est une colonne capillaire HP-5MS (30 m x 0.25 mm), l'épaisseur du film est de 0.25 µm. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison de 2 °C.min⁻¹. Le gaz vecteur est l'hélium dont le débit est fixé à 1.2 mL.min⁻¹. Le mode d'injection est *split* (rapport de fuite : 1/70).

L'appareil est relié à un système informatique gérant une bibliothèque de spectre de masse (Wiley7, NIST 2002). L'identification des constituants est basée sur la comparaison de leurs spectres de masse (CG/SM) respectifs avec les spectres de la bibliothèque et de la bibliographie (Adams, 2007) et sur la base de calcul des Indices de Rétention. L'IR d'un composé A est indépendant du débit, de la longueur de la colonne et de la quantité injectée. Il dépend de la phase stationnaire et de la température.

Les IR sont calculés selon la formule suivante :

$$\text{IR} = 100n + \left[\frac{\text{TR}_c - \text{TR}_n}{\text{TR}_{(n+1)} - \text{TR}_n} \right] \times 100$$

n : Nombre d'atomes de carbone de l'alcane élué avant le composé ;

TR_c : Temps de rétention du composé ;

TR_n : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

TR_(n+1) : Temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le composé.

1.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique consiste à estimer l'inhibition de la croissance des germes soumis à l'HE d'*E. globulus*. Deux méthodes qualitatives complémentaires (aromatogramme et microatmosphère) ont été examinées dans ce screening antimicrobien.

1.6.1. Méthode de l'aromatogramme (Technique en milieu solide)

Cette méthode utilisée par certains auteurs (Tyagi et Malik, 2011) est la technique que nous avons utilisée pour évaluer, dans un premier temps, l'activité antimicrobienne de l'HE. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des HE sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte Pétri. Elle nous permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'HE et en déduire

ainsi la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cet extrait aromatique. Dans cette méthode (**Figure 4**), nous avons utilisé des disques de 9 mm de diamètre (Antibiotica-Testblattchen, Schleicher & Schuell, D-3354, Dassel, Allemagne) que nous avons imprégnés d'une certaine quantité d'HE. Le disque sera déposé au centre d'une boîte Pétri contenant un milieu gélosé préalablement ensemencé par une souche microbienne. L'étude du pouvoir antimicrobien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme. La seule différence réside dans le remplacement des antibiotiques (ATB) par des extraits aromatiques.

Dans notre étude, nous avons testé l'activité antimicrobienne de l'HE en imprégnant les disques, séparément, par 3 doses croissantes à savoir 20, 40 et 60 μL d'HE par disque. Ceci a été fait dans le but d'apprécier l'action « Dose-Dépendante » de l'HE sur l'inhibition de la croissance des germes microbiens. Chaque boîte Pétri est ensuite fermée et incubée dans l'étuve à température adéquate (37°C pendant 24h pour les bactéries et 25°C pendant 3 à 5 jours pour les levures et les moisissures, respectivement). L'essence diffuse à partir du disque au sein de la gélose et y détermine un gradient de concentration. Les bactéries et champignons croissent sur toute la surface de la gélose sauf là où elles rencontrent une concentration d'essence aromatique suffisante qui inhibe leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque et dont le Diamètre de la Zone d'Inhibition (DZI) est mesuré et exprimé en mm.

Et afin de mener une étude comparative du pouvoir antibactérien d'HE avec des produits de références, nous avons utilisé des disques Antibiotiques (ATB) (Bio-Rad, France) comme témoins positifs, à savoir : Amoxicilline/Acide clavulanique (AMC, 20/10 μg), Erythromycine (E, 15 μg) et Chloramphenicol (C, 30 μg), vu leur spectre d'action très large. Concernant souches mycélienne et à cause de la non disponibilité des disques antifongiques, nous les avons substitués par une solution antiseptique d'Hexomédine (Biopharm, Alger) à 0.1% comme contrôle positif.

1.6.2. Méthode en phase vapeur (Microatmosphère)

Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés de la phase volatile de l'HE. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse (**Figure 5**) sont encore peu nombreux (**Tyagi et Malik, 2011**).

La différence entre cette méthode et l'aromatogramme réside principalement dans la position du disque imprégné. Ce dernier est déposé au centre du couvercle de la boîte Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience. Celui-ci n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. De la même manière que l'aromatogramme, nous avons appliqué 3 doses croissantes en HE. En premier lieu, 20 μL d'HE est déposée sur un disque de papier filtre de 20 mm de diamètre. Dans le 2^{ème} essai, un disque de 40 mm a été imprégné par 40 μL d'HE alors que pour le dernier, un disque de 60 mm a été chargé par 60 μL d'HE. Le diamètre du disque diffère selon la quantité

d'HE à imprégner afin d'obtenir un bon étalement et, par conséquent, une meilleure évaporation de l'HE.

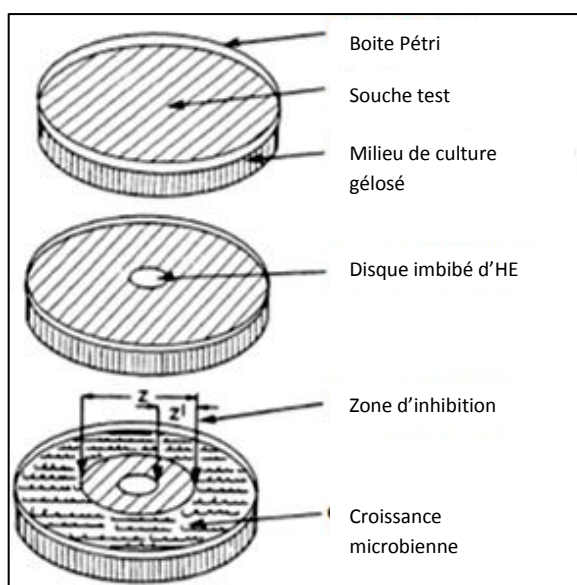


Figure 4. Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Zaika, 1988).

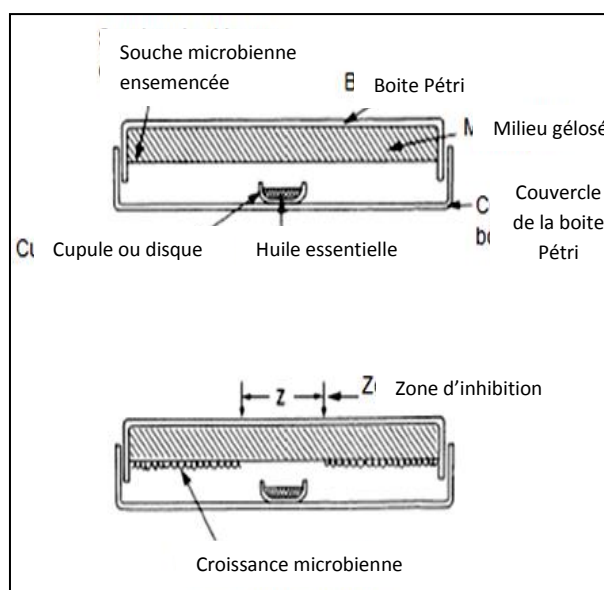


Figure 5. Illustration de la méthode de Microatmosphère (Zaika, 1988).

La préparation de l'inoculum, l'ensemencement, l'incubation et la lecture des résultats ont été menés de la même manière que la première méthode. La boîte est fermée avec le couvercle en bas et mise à l'étuve à température adéquate. Il se produit une évaporation des substances qui, en contact avec les germes ensemencés, va inhiber leur croissance. A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par une zone translucide sur la gélose, de contour plus ou moins nette et à tendance circulaire.

1.7. Test « Biocontrôle » : activité antifongique dans une matrice alimentaire

Afin d'évaluer l'activité antifongique de l'HE dans un modèle alimentaire, nous avons opté pour une boisson gazeuse sucrée et fruitée type Orangina® produite localement (unité Djguaguen, Blida). De par son pH acide et la présence de deux conservateurs alimentaires (E 202 : Sorbate de potassium et E211 : Benzoate de sodium), ces types de boissons constituent un milieu défavorable pour la croissance bactérienne. Cependant, leur qualité organoleptique peut être altérée du faite de la possibilité d'une croissance fongique, apte à résister aux conditions d'osmophilie et d'acidophilie. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi une souche levuriforme (*Saccharomyces cerevisiae*) pour provoquer une contamination dans cette boisson alimentaire et d'apprécier ainsi sa cinétique de croissance en présence de l'HE (en combinaison

ou non avec un traitement thermique) ou des conservateurs chimiques (Tyagi *et al.*, 2013 ; Tyagi *et al.*, 2014).

A cet effet, 3 types de jus Orangina® ont été testés. Le contrôle positif est représenté par un lot de boissons où des conservateurs de synthèse (Benzoate de sodium et Sorbate de potassium) aient été additionnés. Deux autres lots de boissons ont été supplémentés de différentes concentrations en HE (0.08%, 0.2% et 0.4%). L'un de ces lots va subir un traitement thermique type « pasteurisation » (80 °C pendant 10 minutes) et ce pour apprécier l'effet synergique de ce traitement avec la présence des HE pour une meilleure efficacité antifongique dans les boissons fruitées.

Toutes ces boissons ont été contaminées préalablement par une suspension fongique de *Saccharomyces cerevisiae*. Par la suite, des dilutions décimales ont été réalisées (5.10^{-2}) dans l'eau physiologique (NaCl, 0.9%). Ces dilutions vont être analysées par ensemencement en nappe sur milieu gélosé (SAB) qui sera incubé à 25°C pendant 48-72h. La lecture des résultats se résume à dénombrer toutes les colonies levuriformes. Cette analyse correspond alors à J-0. La même démarche opératoire sera répétée à J-1, à J-2 et à J-6 pour les 3 types de boissons, conservés dans un réfrigérateur (4°C) entre temps, et ce afin d'apprécier la cinétique de croissance fongique.

1.8. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue

1.8.1. Principe :

Le principe du test, décrit par Winter *et al.* (1962), consiste à provoquer un gonflement aigue de la patte d'une souris. Il est réalisé par une injection d'une substance inflammatoire sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche. Ceci provoque une réaction qui peut être réduite par des substances anti-inflammatoires. Cette réaction se traduit par un œdème d'installation rapide et persistant. La mesure est effectuée en comparant, à la fin de l'expérience (après 4 heures), le poids (en grammes) des pattes droites et gauches des souris provenant de différents lots (Témoin +, Témoin – et HE).

1.8.2. Déroulement de l'essai :

Trois doses en HE ont été testées (250 µl/kg, 25 µl/kg et 2.5 µl/kg) diluées dans l'eau physiologique (0.9% NaCl). L'efficacité de ces dilutions est appréciée en comparaison avec le Témoin positif (Diclofénac). Nous avons constitué 5 lots contenant chacun 6 souris. Le 1^{er} recevra, par voie orale, de l'eau physiologique (Témoin -) à raison de 0.5 ml. Le second sera traité par un anti-inflammatoire de référence : Clofénal® (Diclofénac de sodium, 75 mg/kg). Ce traitement sera administré *per os*. Les trois autres lots restants seront traités par les différentes doses en HE, oralement et individuellement. L'induction d'une inflammation aigue est faite par injection de 0.025 mL d'une solution de carraghénine (1%) au niveau de la patte postérieure gauche (PPG). Après 4 heures, toutes les souris ont été sacrifiées et leur pattes ont été coupées pour mesurer leur poids.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée par le pourcentage de réduction de l'œdème chez les souris traitées par rapport au contrôle négatif, selon la formule suivante :

$$\% \text{ de réduction de l'œdème} = \left[\frac{(\Delta T -) - \Delta E}{(\Delta T -)} \right] \times 100$$

$\Delta T -$: Différence entre la moyenne des poids des pattes (droite - gauche) pour le lot Témoin- (eau physiologique 0.9% NaCl) ;

ΔE : Différence entre la moyenne des poids des pattes (droite - gauche) pour le lot essai (HE ou Témoin +)

1.9. Evaluation de l'activité antispasmodique (test de torsion)

1.9.1. Principe :

Réduire, par des substances antalgiques, la douleur provoquée chez les souris par l'injection d'une substance irritante capable d'entraîner des mouvements de torsion. Nous avons utilisé ce test (Writhing test) pour l'évaluation de l'activité antalgique périphérique (**Ouédraogo et al., 2012**).

1.9.2. Mode opératoire :

Les animaux ont été répartis au hasard en 5 lots comprenant six souris chacun :

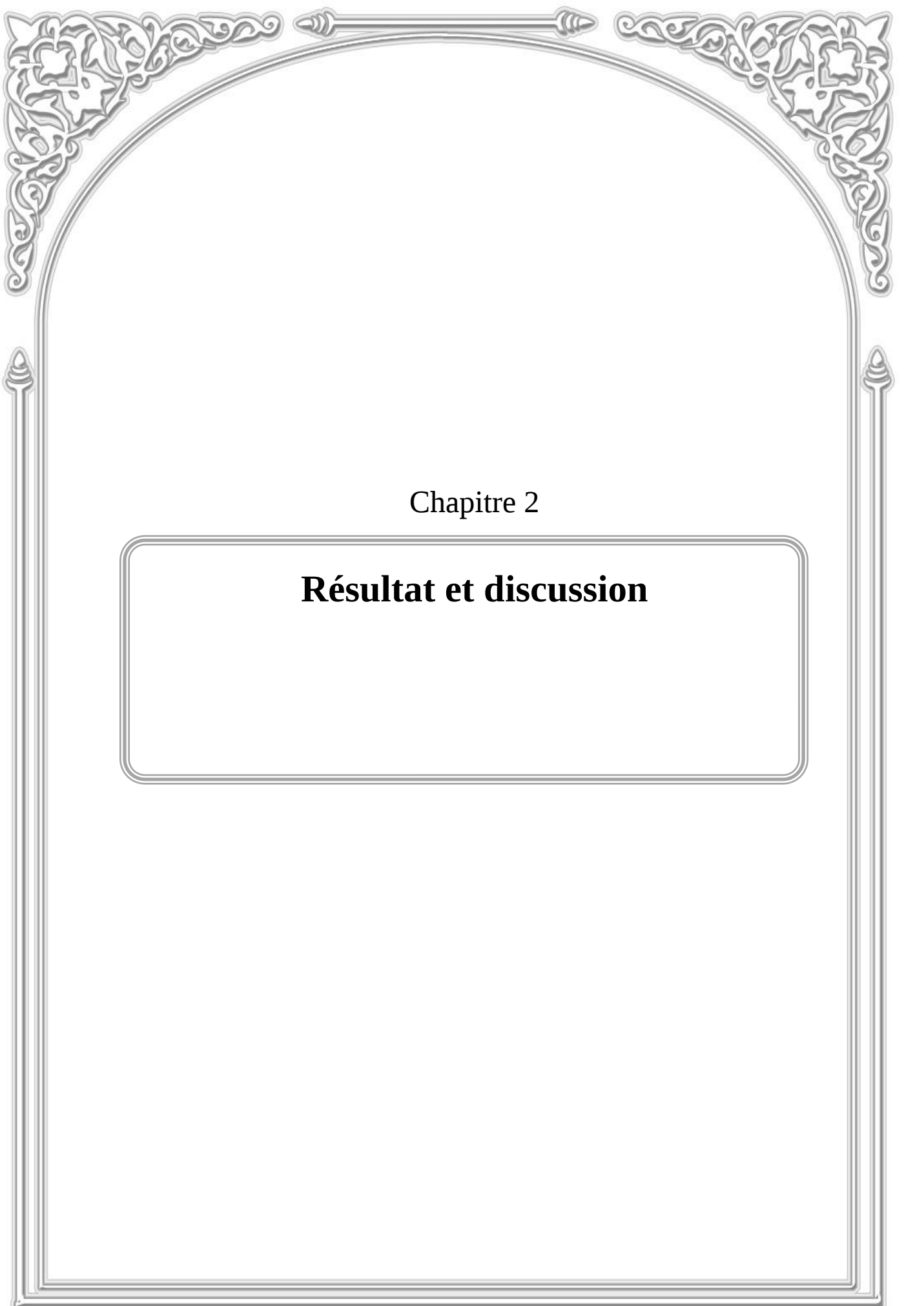
- Le 1^{er} lot, Témoin -, recevra 0.5 mL de l'eau physiologique par voie orale (*per os*) ;
- Le 2^{ème} lot, Témoin +, recevra par la même voie, 0.5 ml d'une solution d'un médicament antispasmodique, Spasfon[®] (Triméthylphloroglucinol, comprimé 80 mg, Lab. Cephalon, France).
- Les 3 lots restants recevront, par voie orale, différentes doses en HE (250 µl/kg, 25 µl/kg et 2.5 µl/kg et qui correspondent à 1%, 0.1% et 0.01% respectivement), à raison de 0.5 ml par souris.

Trente minutes après les différents traitements, une injection de 0.2 ml d'une solution d'acide acétique (1%) a été faite par voie i.p. pour chaque souris. Le syndrome douloureux se caractérise par des mouvements d'étirement des pattes postérieures et de torsion de la musculature dorso-abdominale.

Après l'injection de la solution d'acide acétique et un temps de latence de 5 minutes, nous avons compté, pour chaque souris, le nombre torsions pendant les 10 minutes suivantes.

1.9.3. Etude statistique :

Les résultats sont exprimés en moyenne du nombre de contractions abdominales $\pm$ écart-type. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance (ANOVA) suivie par le test *post-hoc* de Tukey pour comparaison par paires. $P < 0.05$ a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée avec le logiciel Statistica (version 8, StatSoft, USA).



Chapitre 2

Résultat et discussion

2.1. Etude analytique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

2.1.1. Propriétés organoleptique et physico-chimique

Le contrôle des paramètres physico-chimiques de l'HE d'*Eucalyptus globulus* a été déterminé selon des méthodes de référence. Les résultats obtenus sont colligés dans le **Tableau II**.

Tableau II : Paramètres physico-chimique et organoleptique de l'essence d'*Eucalyptus globulus*.

Paramètres		Résultats	Normes AFNOR (2000)
Propriétés physiques	Indice de réfraction à 20°C	1.462	1.459 0 - 1.467 0
	Densité relative à 20°	0.805	0.906 – 0.923
Propriété chimiques	Indice d'acide (IA)	0.67	<10
	Miscibilité à l'éthanol (70°) (v/v)	1/3	1/2-1/5
Propriétés organoleptiques	Aspect	Liquide et limpide	Liquide et limpide
	Couleur	Jaune clair	Jaune
	Odeur	Camphrée	Camphrée voir balsamique

A la lecture des résultats colligés dans le **Tableau II**, il apparaît que les indices physico-chimiques, tels que l'indice de réfraction, la miscibilité à l'éthanol et l'indice d'acide, semblent être en accord avec ceux des normes en vigueur (**AFNOR, 2000**). Selon **Coppen (2002)**, les valeurs des constantes physico-chimiques varient selon les conditions pédoclimatiques.

Concernant les constantes chimiques, la valeur obtenue de l'IA demeure faible et inférieure aux normes (<10). Nous pouvons conclure que l'essence d'*E. globulus* était bien conservée durant son stockage. En effet, cet indice donne une appréciation sur le taux d'acide libres. Plus sa valeur est faible (inférieure à 2), meilleure sera la qualité de l'HE. Ceci constitue un gage d'une conservation acceptable (**Salle, 1991**). En effet, une huile fraîche ne contient que très peu d'acides libres. C'est pendant la période de stockage que l'huile peut subir des dégradations telle que l'hydrolyse des esters. Par ailleurs, **Lazouni et al. (2007)** ont déjà constaté des variations des indices d'acide et d'ester en fonction de la température et de la période de stockage.

La détermination des propriétés physico-chimiques est une étape nécessaire mais demeure non suffisante pour caractériser l'HE. Il sera primordial de déterminer le profil chromatographique de cette fraction aromatique.

2.1.2. Composition chimique de l'huile essentielle

Les résultats de la composition chimique de l'HE d'*E. globulus*, accomplie par CG-SM, sont rapportés dans le **Tableau III** Les différents composés ont été listés selon leur Indices de Rétention (IR).

Tableau III : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* distillée à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau.

N°	Composés	IR	%
Monoterpènes hydrocarbonés			5,48
1	Tricyclène	926	0,1
2	α -Pinène	926	0,94
3	Camphène	942	2,39
4	β -Pinène	994	0,16
5	δ -Carène	1101	1,08
6	Terpinolène	1120	0,81
Monoterpènes Oxygénés			69,69
7	1,8-Cinéole	1027	15,71
8	α -Fenchone	1087	35,02
9	Fenchol	1112	0,73
10	Camphre	1158	16,13
11	Bornéol	1176	0,4
12	Terpin-4-ol	1183	0,33
13	<i>p</i> -Cymen-8-ol	1191	0,37
14	Myrténol	1194	0,37
15	<i>trans</i> -Carveol	1217	0,07
16	Carvone	1269	0,16
17	Cyclosativène	1368	0,4
Sesquiterpènes hydrocarbonés			4,31
18	α -Cubebène	1354	0,06
19	α -Copaène	1376	0,44
20	<i>E</i> -Caryophyllène	1425	0,12
21	Aromadendrène	1439	0,18
22	β -Selinène	1485	0,27
23	α -Selinène	1494	0,13
24	α -Muuroolène	1499	0,16
25	γ -Cadinène	1513	0,38
26	δ -Cadinène	1524	1,65
27	α -Calacorène	1542	0,24
28	Selina-3,7(11) dien	1542	0,41
29	Cadalène	1674	0,27
Sesquiterpènes Oxygénés			4,36
30	Oxyde de Caryophyllène	1570	0,46
31	Ledol	1565	0,52
32	Veridiflorol	1590	2,88
33	α -Muurolol	1645	0,5
Autres Composés Oxygénés			7,92

34	Acétate de Bornyl	1285	4,38
35	<i>cis</i> -Acétate de Carvyl	1362	3,4
36	Acétate de Géranyl	1394	0,14

IR : Indice de Rétention calculé à partir d'une colonne apolaire (HP5 MS).

Au total 36 composés ont été identifiés dans cette essence aromatique. A la lecture du profil chromatographique obtenu, il apparait clairement que le fenchone est le composé majoritaire de cette huile avec un taux de 35.02%, suivi par le camphre (16%) et le 1.8-cinéole (15.7%) encore appelé eucalyptol (**Figure 6**). Deux autre composés, de la famille des esters (acétate de bornyl et acétate de carvyl) ont été détectés mais à des quantités faibles, de l'ordre de 4.3 et 3.4 %, respectivement. Les autres composés ont été détectés mais à des teneurs inférieures à 3%. Par ailleurs, cette huile aromatique est composée majoritairement de monoterpènes oxygénés avec un taux supérieur à 70%.

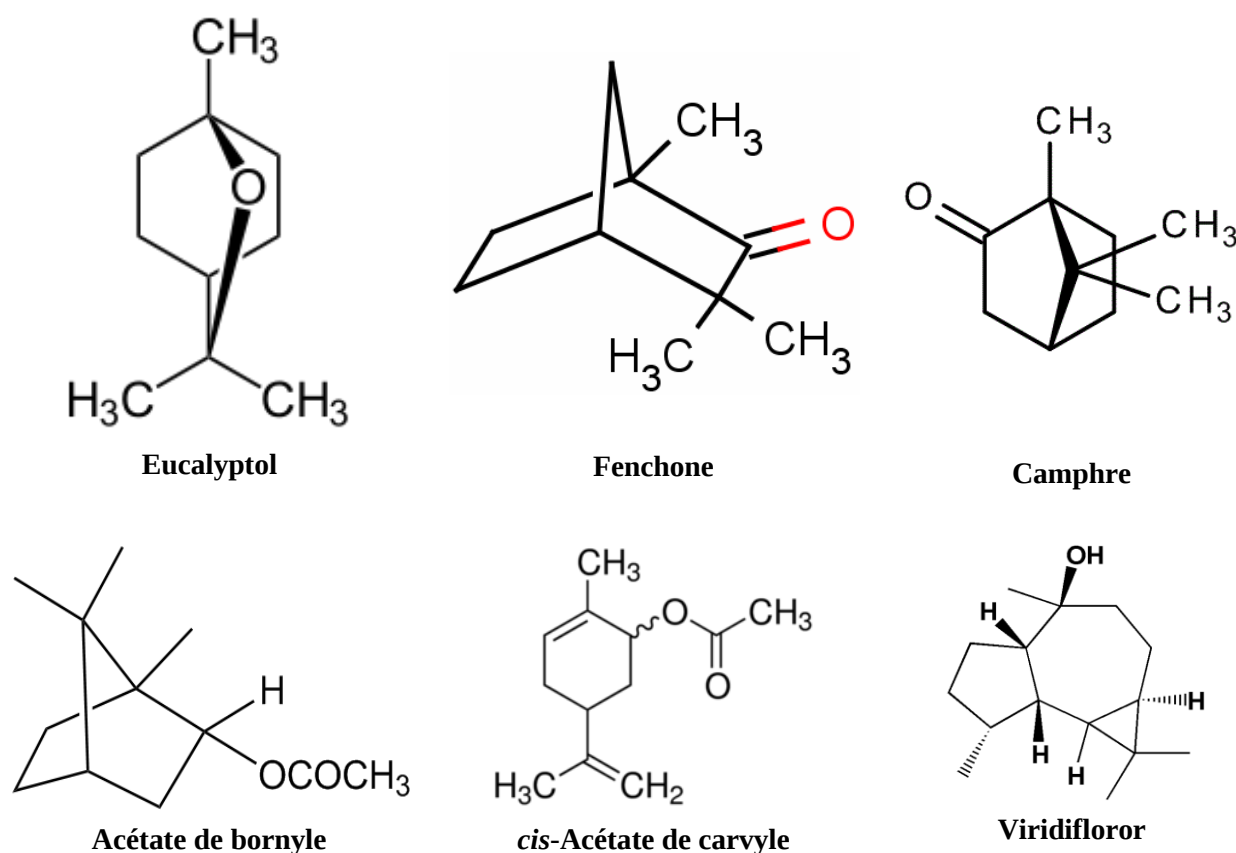


Figure 6. Structure chimique de quelques composés détectés dans l'essence d'*Eucalyptus globulus*.

Dans notre étude, le fenchone est le constituant majoritaire de l'essence aromatique d'eucalyptus officinal, suivi par le 1.8-cinéole qui n'est présent qu'à faible teneur (15%). Des résultats contradictoires aux nôtres ont été rapportés par plusieurs auteurs (**Shieh, 1996 ; Cimanga et al. 2002 ; Tsiri et al., 2003 ; Su et al., 2006 ; Louppe et al., 2008**) qui ont révélé que la concentration de ce composé (eucalyptol) paraît très élevé, avec des taux qui oscillent entre 44 à 90 %.

En revanche, le résultat rapporté par l'étude de **Singh (1988)** a révélé la présence du *p*-cymène comme composé majoritaire avec un taux de 75%, suivie du pinène (7%) et terpinène (4%). Les travaux effectués par **Chalchat *et al.*, (1997)** sur les échantillons de la même espèce, acclimatée au Rwanda, ont démontré que le cryptone caractérise ses HE avec environs 11%. Les essences de cette espèce présentent, également, le α -terpinène, l'aromadendrène et l'allo-aromadendrène avec des teneurs moyennes respectives de 4, 3 et 10 %.

D'après l'étude menée par **Coppen (2002)**, l'essence du gommier bleu récolté en Espagne est composée majoritairement du 1,8-cinéol (59.4%) encore appelé eucalyptol, suivi par le α -pinène (20.1%) et aromadendrène (4.6%). Ces résultats sont aussi en contradiction avec les nôtres particulièrement en ce qui concerne les deux composés majoritaires. Dans la même étude, l'analyse d'eucalyptus récolté en Portugal a révélé la présence du 1,8-cinéol (66.8%) comme composé majoritaire, suivi par α -pinène (14.5%), α -terpinéol (2.6%), *p*-cymène (2.3%) et enfin l'aromadendrène (2.2%).

Toujours et dans le même sillage, le **Tableau IV** rapporte la composition chimique de la fraction aromatique de cet arbre à parfum (*E. globulus*) provenant de différents écosystèmes.

Tableau IV : Composition chimique de l'essence d'*Eucalyptus globulus* provenant de plusieurs pays.

Abondance relative (%)							
	Mulyaningsih <i>et al.</i> , 2010	Goldbeck <i>et al.</i> , 2014	Vilela <i>et al.</i> , 2009	Elaissi <i>et al.</i> , 2012	Manika <i>et al.</i> , 2013	Kumar <i>et al.</i> , 2012	Tyagi et Malik, 2011
Pays	Allemagne	Brésil	Brésil	Tunisie	Inde	Inde	Inde
Composés							
α -Pinène	1.53	8.30	-	12.0	1.2	-	4.2
β - myrcène	-	-	0.49	-	0.1	1.88	1.5
α -Phellandrène	2.61	-	-	-	-	0.93	1.3
Limonène	-	-	-	2.3	-	10.09	17.8
<i>p</i> -Cymène	0.49	1.79	-	1.0	-	-	9.5
1,8-Cinéole	14.55	71.05	89.95	53.7	63.7	33.62	45.4
γ -Terpinène	0.18	-	0.25	-	0.8	2.92	8.8
Linalool	0.12	-	-	-	0.3	2.34	0.5
Pinocarvone	-	0.75	0.30	1.7	-	-	0.4
Bornéol	0.41	-	-	-	-	-	0.1
Terpinen-4-ol	1.87	-	0.72	-	1.4	2.42	1.4
α -Terpinéol	0.85	0.79	0.62	3.3	0.9	4.72	3.6
Géraniol	Trace	-	-	-	0.3	0.24	0.1
Aromadendrène	31.17	-	-	3.7	13.5	-	-
Viridiflorol	0.24	-	-	1.7	-	-	-
Globulol	10.69	3.51	-	7.0	3.4	-	-

(-) non détectés. Les composés en gras ont été retrouvés comme majoritaires dans l'huile essentielle

En résumé, une revue de la littérature scientifique fait apparaître que les facteurs pédoclimatiques exercent une grande influence sur la variabilité dans le profil chromatographique des extraits aromatiques des PAM. Cette variabilité dépend des périodes de la récolte (estivale ou hivernale) des plantes à parfum, des caractéristiques du climat et particulièrement de la température, de la durée d'ensoleillement, de la pluviométrie, de l'altitude et de la nature de sol. En outre, la composition chimique d'une HE est tributaire de plusieurs facteurs, biotique et abiotique. Plusieurs études ont été faites dans ce sens dans le but de justifier les fluctuations qui ont été observées dans le tracé chromatographique d'une seule plante aromatique (Gilly, 1997 ; Bruneton, 1999 ; Elaissi *et al.*, 2012).

2.2. Screening antimicrobien de l'huile essentielle

L'activité antimicrobienne de l'essence aromatique d'*Eucalyptus globulus*, effectuée par 2 méthodes différentes et complémentaires (aromatogramme et microatmosphère), a été testée sur des souches de référence (ATCC) et des souches microbiennes isolées cliniquement. Au total, 4 bactéries à Gram – et 2 à Gram + ainsi que 6 souches de levure et 5 champignons filamenteux ont été utilisées dans ce test. Les résultats de ce screening antimicrobien sont consignés dans les **Tableaux V** et **VI**. A noter que le diamètre du disque (9 mm) a été inclus dans le calcul du Diamètre de la Zone d'Inhibition (mm). Pour ce test, des volumes croissants en HE ont été utilisés pour apprécier l'action « Dose-Dépendante » de l'essence d'eucalyptus officinal.

2.2.1. Résultats de l'aromatogramme

A la lecture des résultats obtenus lors de ce screening antimicrobien de l'essence du gommier bleu, il apparaît clairement que les bactéries à Gram + sont les plus sensibles à l'action inhibitrice de l'essence avec des DZI qui s'échelonnent entre 35 et 48 pour le moyen dosage (40 µl/disque). De plus, *Staphylococcus aureus* a été totalement inhibé (85 mm) à la dose la plus élevée. A noter aussi que cette activité antibactérienne est « Dose-dépendante » pour la majorité des souches testées. Pour les bactéries à Gram -, *Pseudomonas aeruginosa* demeure le germe le plus résistant et ce quelque soit la dose utilisée.

Tableau V : Activité antibactérienne *in vitro* de l'essence aromatique d'*Eucalyptus globulus*.

	DZI (mm)								
	Aromatogramme			Microatmosphère					
Souches microbienne	Quantité HE (µl/disque)						Antibiotiques		
Bactéries à Gram -	20	40	60	20	40	60	AMC	E	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC)	-	-	-	-	-	-	R	16	14
<i>Enterobacter sakazakii</i>	12	15	25	-	85	85	R	19	27

<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	-	10	19	-	-	-	R	22	12
<i>Escherichia coli</i>	11	19	34	-	-	36	12	19	7
Bactéries à Gram +									
<i>Bacillus ceureus</i> (ATCC)	15	35	50	24	40	59	25	35	24
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	48	85	41	85	85	26	R	16

(-) Aucune zone d'inhibition ; DZI : Diamètre de la Zone d'Inhibition (diamètre du disque 9 mm a été inclus dans le calcul de la DZI) ; R : Résistant ; HE : Huile Essentielle ; ATCC : American Type Culture Collection ; AMC : Amoxicilline/Acide clavulanique (20/10 µg) ; E : Erythromycine (15 µg) ; C : Chloramphenicol (30 µg).

Le screening de l'activité antimicrobienne de l'huile aromatique a révélé que les bactéries à Gram + sont plus sensibles à l'action inhibitrice par rapport aux Gram -. En fait, ces dernières possèdent une résistance intrinsèque aux agents biocides, qui est en relation avec la nature de leur paroi bactérienne (Tyagi et Malik, 2011 ; Daroui-Mokaddem, 2012 ; Elaissi *et al.*, 2012). Cependant, d'autres auteurs ont rapporté, dans leurs travaux, qu'il n'existe aucun lien apparent entre l'action bactéricide des molécules terpéniques et la nature de la paroi bactérienne (Zaika, 1988 ; Dorman et Deans, 2000 ; Wilkinson, 2003).

Concernant les souches fongiques (Tableau VI), les isolats levuriformes sont les plus sensibles au pouvoir inhibiteur de l'essence en milieu liquide où les DZI obtenus oscillent entre 20 et 40 mm pour la dose la plus élevée, ce qui est largement supérieur aux valeurs obtenues avec l'Hexomédine, une solution antiseptique prise comme contrôle positif, sauf pour le *Candida albicans* (Ca1) où nous avons noté une inhibition totale par l'Hexomédine. Par ailleurs, la souche de *Saccharomyces cerevisiae*, une levure incriminée dans les altérations et la dégradation de la qualité marchande des denrées alimentaires (Tyagi *et al.*, 2013), a manifesté une grande sensibilité à l'action inhibitrice de l'essence aromatique, en particulier pour le dosage le plus élevé où le DZI obtenu était de l'ordre de 49 mm, comparativement au contrôle positif qui n'a exhibé aucune inhibition.

En ce qui concerne les champignons filamenteux, encore appelé moisissures, des résultats moins reluisants ont été obtenus pour la majorité des souches étudiées exceptée *Aspergillus niger* (An1) qui s'est montré relativement sensible à l'action inhibitrice de l'essence avec des DZI variant entre 12 et 29 mm pour les différentes doses utilisées. De plus, cette action antifongique demeure supérieure comparativement au contrôle positif (Héxoméline, 0.1%) qui n'a manifesté aucun pouvoir inhibiteur.

Tableau VI : Activité antifongique de l'essence aromatique d'*Eucalyptus globulus* *in vitro*.

Souches fongiques	DZI (mm)						Antiseptique
	Aromatogramme			Microatmosphère			
	Quantité HE (µl/disque)						
Levures	20	40	60	20	40	60	HEX (40 µl)
<i>Candida albicans</i> (ATCC)	-	11	40	-	-	-	30
<i>Candida albicans</i> Ca1	10	25	27	-	-	53	85

<i>Candida albicans</i> Ca2	14	19	24	85	85	85	13
<i>Candida parapsilosis</i>	12	17	20	85	85	85	30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11	37	49	-	-	59	-
<i>Trichosporon</i> sp.	16	34	39	21	85	85	42
Moisissures							
<i>Aspergillus niger</i> (An1)	12	21	29	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i> (An2)	-	10	15	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC)	-	-	14	-	43	85	14

(-) Aucune zone d'inhibition ; DZI : Diamètre de la Zone d'Inhibition (le diamètre du disque 9 mm a été inclus dans le calcul de la DZI) ; HE : Huile Essentielle ; ATCC : American Type Culture Collection ; HEX : solution antiseptique d'Hexomédine (0.1%) (Biopharm, Alger, Algérie).

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique des métabolites terpéniques des espèces du genre *Eucalyptus*. Nos résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs (**Daroui-Mokaddem, 2012 ; Elaissi et al., 2012**). Le mécanisme d'action des extraits aromatiques sur les souches fongiques n'a pas été totalement élucidé. Cependant, certaines études soulignent que l'action antifongique de ces substances terpéniques est due à une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique suivie d'une rupture de celle-ci, entraînant une fuite du contenu cytoplasmique et donc la mort de la levure. La lyse des cellules de levure a été montrée par la libération de substances absorbant à 260 nm (**Burt, 2004 ; Chami et al., 2005**).

In vivo, l'incidence croissante des infections fongiques, plus particulièrement celles provoquées par les levures du genre *Candida* pousse à rechercher de nouveaux agents antifongiques qui ne soient pas fongistatiques, toxiques et générateurs de résistance comme ceux déjà utilisés (**Abyaneh et Rai, 2013**). La recherche d'une alternative thérapeutique s'avère donc nécessaire. D'où l'intérêt d'essayer de transposer les résultats de l'action anti-candidosique de l'essence d'eucalyptus officinal, obtenus *in vitro*, sur des modèles *in vivo*.

L'activité antimicrobienne de la fraction aromatique d'*E. globulus* est due principalement à son profil chromatographique. Les alcools et les composés oxygénés (eucalyptol, camphre, fenchone, acétate de géranyle) sont réputées comme des molécules terpéniques à fort pouvoir antimicrobiens (**Dormans et Deans, 2000 ; Cimanga et al., 2002 ; Sartorelli et al., 2007**).

L'étude menée par **Bouaoun et al. (2007)** a révélé que l'activité antimicrobienne de l'essence d'*Eucalyptus* est attribuée principalement à l'eucalyptol (1.8-cinéole) qui est un monoterpène appartenant à la classe des éthers. Il a des propriétés anti-oxydantes et antibactériennes et donc explique l'origine de l'activité antimicrobienne de cette huile. Ce composé est réputé d'avoir une grande inhibition sur la croissance de certains germes bactériens tels que *S. aureus* (**Pitarokili et al., 2003**) et *E. coli* et *B. subtilis* (**Sonboli et al., 2006**).

Un autre travail approfondi, mené par une équipe allemande (**Mulyaningsih et al., 2010**) et publié dans la revue de « Phytomedicine », a révélé que l'essence d'*E. globulus* a exhibée un pouvoir antibactérien intéressant vis-à-vis des germes multirésistants aux ATB, comme c'est le cas du *S. aureus* résistant à la Méthicilline (SARM) ou encore l'*Enterococcus faecalis* résistant à

la Vancomycine. Les mêmes auteurs révèlent aussi que c'est l'aromadénène est le constituant le plus efficace dans l'inhibition de la croissance bactérienne, alors que l'eucalyptol et le globulol sont peu actifs mais présentant tous de même une action synergique dans le test de la cinétique d'inhibition.

Dans notre étude, la composition chimique de l'HE utilisée est dominée par la présence de molécules oxygénées. Les principaux constituants, fenchone, eucalyptol et camphre, représentent les 3/4 de la quantité totale. Ils appartiennent à la classe des monoterpènes oxygénés.

D'une manière générale, certains auteurs s'accordent, à l'heure actuelle, pour affirmer que les propriétés antiseptiques et/ou bactéricides de l'essence végétale sont dues à la présence dans l'essence d'une grande proportion de molécules reconnues pour avoir une activité antiseptique propres comme les alcools.

Or vouloir relier directement les vertus thérapeutiques d'une HE à la seule présence des composés majoritaires est illusoire. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de façon synergique (**Mulyaningsih et al., 2010**). De cette manière, la valeur d'une huile tient à son « Totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires. Il se dégage, de ces études expérimentales, que le phénomène « synergie-inhibition » prend ici toute sa valeur démonstrative (**Salle, 1991**).

En revanche, nos résultats semblent être en total désaccord avec ceux obtenus par d'autres études (**Pattnaik et al., 1997 ; Đakov et al., 2011 ; Proenza et al., 2013**) notamment pour le germe de *Pseudomonas aeruginosa* (**Tableau VII**). Par conséquent, il est difficile, voire problématique, de faire des comparaisons entre les valeurs des DZI de différents travaux (**Tableau VII**). Beaucoup des HE ont la réputation d'être des antimicrobiens, néanmoins les résultats actuellement publiés sont controversés. Les deux raisons principales sont, d'une part, la très grande variabilité de la composition chimique des essences et, d'autre part, le manque de fiabilité des méthodes microbiologiques appliquées aux produits insolubles. La méthode de l'aromatogramme, que nous avons adoptée, est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume de l'huile placé sur les disques de papier, l'épaisseur de la couche d'agar et si un dissolvant est employé, varient considérablement entre les études. Ceci signifie que cette méthode est utile pour le choix des HE actives et pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne, mais la comparaison des données éditées n'est pas toujours faisable. Il est connu aussi que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien (**Burt, 2004 ; Hyldgaard et al., 2012**).

Tableau VII : Activité antibactérienne de l'essence aromatique des espèces du genre *Eucalyptus* déterminée *in vitro* par la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme).

Auteurs	Deans et	Pattnaik	Cimanga	Prabuseenivasan	Đakov	Elaissi	Proenza
---------	----------	----------	---------	-----------------	-------	---------	---------

(Année)	Ritchie (1987)	<i>et al.</i> (1997)	<i>et al.</i> (2002)	<i>et al.</i> (2006)	<i>et al.</i> (2011)	<i>et al.</i> (2012)	<i>et al.</i> (2013)
Pays	Grande- Bretagne	Inde	Congo	Inde	Serbie	Tunisie	Cuba
Gram +							
<i>Staphylococcus aureus</i>	00*	12	00	00	27	9	23
<i>Bacillus subtilis</i>	7.5	-	21	00	-	-	22
<i>Enterococcus faecalis</i>	00	-	-	-	-	8.7	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	-	28	-	-
Gram -							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	00	20	9.5	00	12	8.7	10
<i>Escherichia coli</i>	00	20	15	8.5	28	8	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	00	15	16.5	00	28	-	-
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	-	-	-	25	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	00	-	00	00	24	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	15	7	-	29	-	-

*Diamètre des Zones d'Inhibition en mm (diamètre du disque (6 mm) n'a pas été inclus); (-) non déterminé.

Le mode d'action des HE sur les cellules bactériennes n'est pas clairement élucidé. Compte-tenu de la diversité des molécules présentes dans les huiles, l'activité antibactérienne semble résulter d'une combinaison de plusieurs modes d'action, impliquant différentes cibles cellulaires (Hyltdgaard *et al.*, 2012).

De façon générale, il a été observé une diversité d'actions toxiques des HE sur les bactéries comme la perturbation de la membrane cytoplasmique, la perturbation de la force motrice de proton, fuite d'électron et la coagulation du contenu protéique des cellules.

En outre et dans un autre registre, l'usage de l'essence des espèces du genre *Eucalyptus* sera particulièrement indiqué comme un conservateur antimicrobien naturel dans les denrées alimentaires, en substitution aux additifs chimiques de synthèses, non dénués d'effets indésirables (Laird et Phillips, 2012).

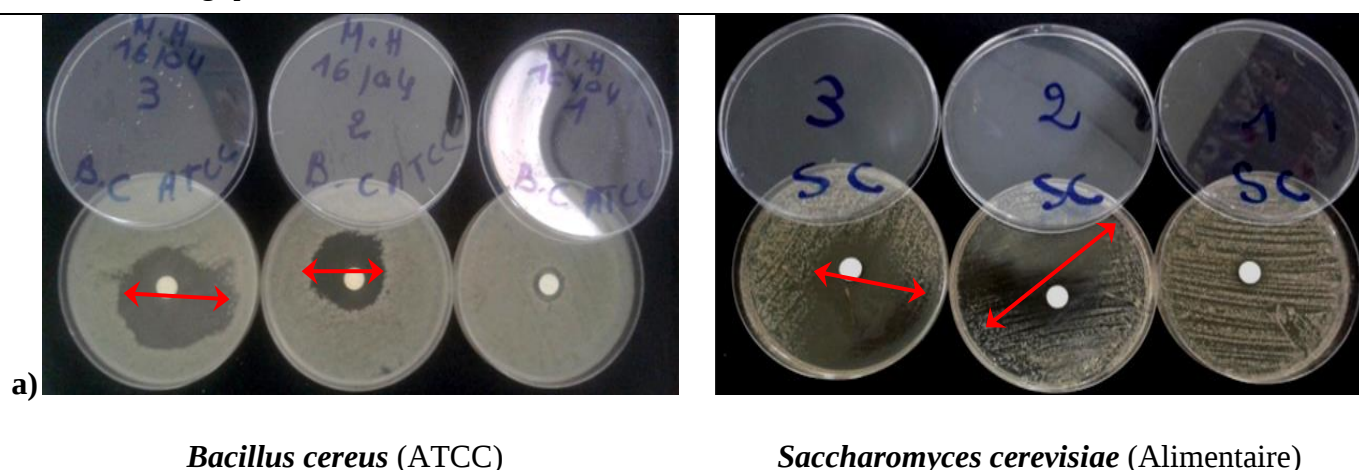
2.2.2. Résultats de microatmosphère

Un screening antimicrobien de l'essence aromatique d'eucalyptus officinale a été réalisé en microatmosphère pour apprécier l'efficacité inhibitrice des souches microbiennes en phase vapeur. Les résultats de ce screening sont colligés dans les **Tableaux V et VI**.

En concordance avec les résultats obtenus en aromatoigramme, l'essence aromatique demeure toujours active contre l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram + avec DZI qui varient entre 59 et 85 mm et nous avons notée aussi une inhibition totale du staphylocoque pathogène (85 mm) (**Figure 7**). Par contre, les bactéries à Gram – ont manifesté une grande résistance exceptée une espèce pathogène de la famille des entérobactéries (*Enterobacter sakazakii*) qui a été inhibée totalement. Dans le même sillage que les résultats obtenus en aromatoigramme, le bacille pyocyanique (*P. aeruginosa*), impliqué dans les infections nosocomiales, demeure le plus résistant à l'action inhibitrice de la phase vapeur.

Concernant les souches fongiques unicellulaires, de meilleurs résultats ont été obtenus où nous avons noté une inhibition totale (85 mm), avec le dosage le plus élevé, des levures *C. albicans* (Ca2), *C. parapsilosis* et *Trichosporon* sp. Cependant et avec les moisissures, aucune action antifongique n'a été constatée exceptée pour l'isolat d'*Aspergillus brasiliensis* (ATCC) qui a manifesté une certaine sensibilité à l'action fongistatique de la vapeur aromatique (**Figure 7**).

Inouye et al. (2001), en testant l'activité de cette huile en phase gazeuse contre des agents pathogènes des voies respiratoires, ont montré que la phase vapeur de l'HE d'*E. globulus* possède une grande action inhibitrice sur la majorité des germes testés. Ces résultats ont été corroborés par plusieurs travaux (**Bachir Raho et Benali, 2008 ; Bachir Raho et Benali, 2012**). Une étude Japonaise (**Abe et al., 2002**), publiée dans le « *Journal Japonais de Mycologie Médicale* », a établi que l'essence d'eucalyptus ainsi que ses composés majoritaires réduisent, de façon significativement différente, la croissance mycélienne de *C. albicans*. Ils ont démontré que le mode d'action de la vapeur réside dans la déformation morphologique et la rupture de la membrane cellulaire. Par conséquent, ces altérations réduisent l'aptitude d'adhérence des cellules fongiques et donc la réduction de leur virulence.



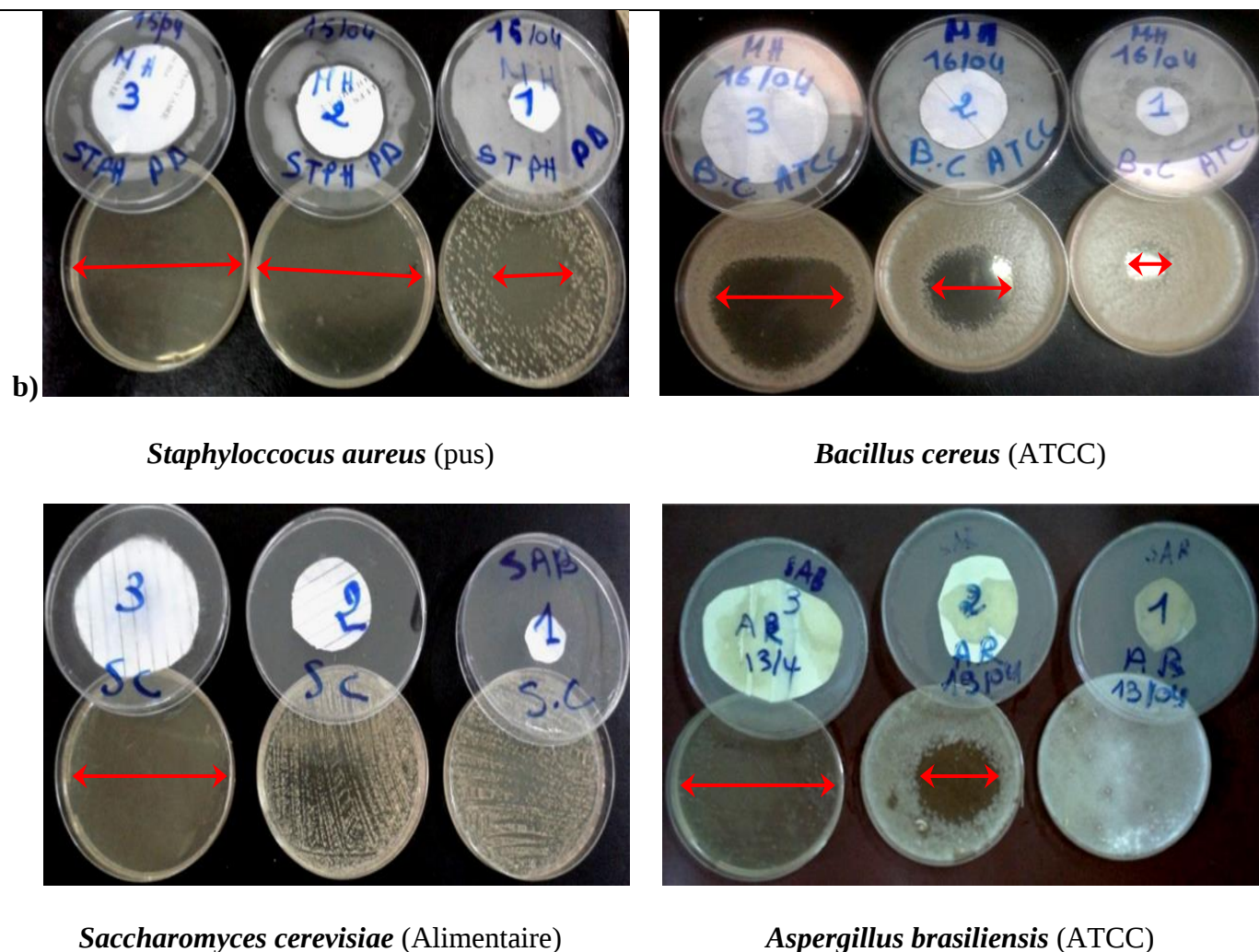


Figure 7. Photo de quelques germes microbiens testés lors du screening antimicrobien *in vitro* avec 3 volumes croissants en essence d'*Eucalyptus globulus* : a) Aromatogramme; b) Microatmosphère.

1,2 et 3 : correspondent respectivement aux doses suivantes : 20, 40 et 60 µl.

En thérapie, l'essence d'eucalyptus officinale pourra trouver une place comme désinfectant atmosphérique en milieu hospitalier afin de lutter contre les infections nosocomiales et les contaminations aéroportées, ainsi que pour le contrôle de l'hygiène de l'air, entraînant un effet bénéfique au niveau de la qualité de l'air (**Laird et Phillips, 2012**).

Le pouvoir antimicrobien de la phase gazeuse des terpénoides n'est pas surprenant du moment que plusieurs travaux ont été publiés en ce sens mais la littérature scientifique reste peu prolixe (**Tyagi et Malik, 2011 ; Laird et Phillips, 2012**). A l'heure actuelle, nous pouvons affirmer, sans conteste, qu'il existe des centaines de publications et autres travaux publiés mettant en exergue le potentiel antimicrobien des extraits végétaux aromatiques en phase liquide (**Tableau VII**). Cependant, ce nombre ne dépasse pas, au mieux, une vingtaine d'articles de recherche ou revues de synthèse qui mettent en évidence l'effet bactériostatique de ces produits volatils en microatmosphère.

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* sont très encourageants pour une éventuelle application *in vivo*, voire même dans une matrice alimentaire.

2.2.3. Etude comparative : Aromatogramme versus Microatmosphère

A la lecture comparative des résultats obtenus entre les deux méthodes (aromatogramme et micro-atmosphère), il apparaît clairement que cette dernière technique est la plus appropriée pour estimer l'action antifongique de l'essence aromatique de l'eucalyptus officinale, en particulier vis-à-vis des levures où une action fongicide a été notée à la plus faible concentration pour les *Candida albicans* (Ca2), *C. parapsilosis* et *Trichosporon* sp (**Figure 8**). En revanche et concernant les champignons filamenteux, c'est la phase liquide qui a exhibé un pouvoir antifongique le plus élevé comparativement à la phase vapeur, en particulier pour les espèces du genre *Aspergillus*.

Concernant le screening antimicrobien par la méthode de microatmosphère, il a été constaté, qu'avec certains germes, la phase volatile de l'HE est plus active que la phase liquide. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'en contact direct, les HE diffusent mal en milieu gélosé à cause de leur non miscibilité et, par conséquent, un contact réduit entre le germe et l'HE. Par contre et en microatmosphère, l'HE est très volatile et, de ce fait, il y aura une bonne diffusion sur une gélose ensemencée préalablement (**Goni et al., 2009 ; Laird et Phillips, 2012**).

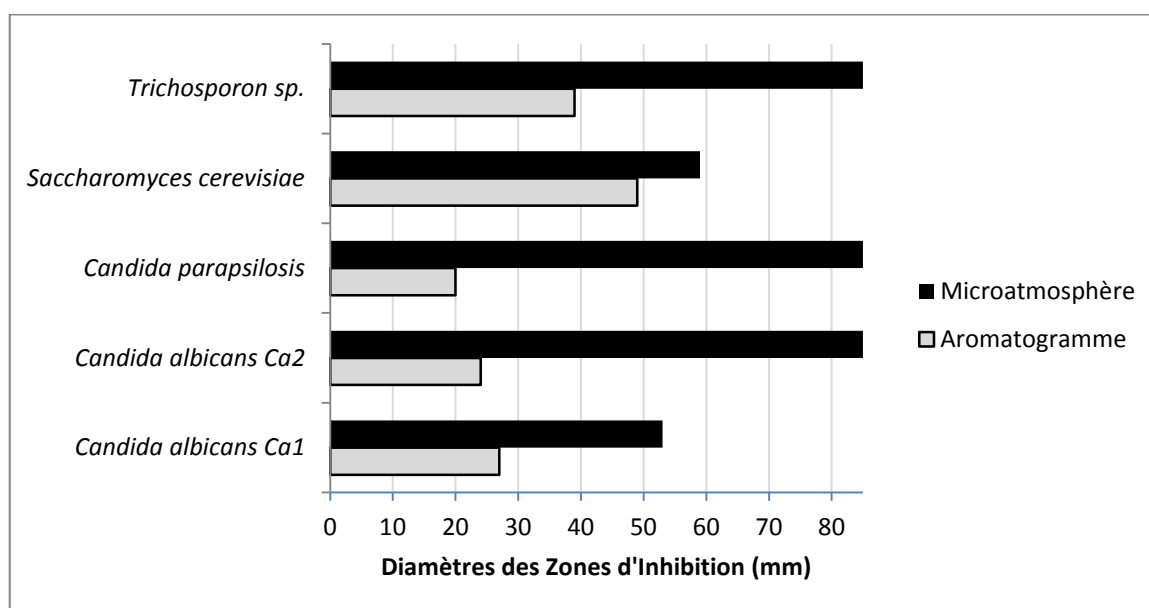


Figure 8. Etude comparative de l'activité antifongique de l'essence d'*Eucalyptus globulus* testée sur cinq levures (aromatogramme vs microatmosphère)

En résumé et eu égard des résultats obtenus, aucun consensus ne peut être dégagé quant à la méthode la plus idéale à mettre en exergue le pouvoir antimicrobien des mélanges terpéniques distillées des plantes aromatiques. Cette activité antimicrobienne pourrait être due à l'effet combinatoire de ses phases vapeur et liquide. Dans tous les cas, cette action inhibitrice de la croissance bactérienne paraît supérieure à celle des ATB utilisés comme référence, notamment pour les bactéries à Gram+.

2.2.4. Activité antifongique de l'essence dans une matrice alimentaire

L'efficacité antifongique de l'essence aromatique d'eucalyptus officinal a été vérifiée en incorporant cette huile dans une matrice alimentaire (jus de fruit gazeifié de type Orangina®). A cet effet, l'essence a été ajoutée au jus pour l'obtention, au final, de plusieurs concentrations (0.08%, 0.2% et 0.4%) en HE. Trois types de boissons gazeuses fruitées ont été inclus dans cette étude. Notre choix s'est porté sur un jus non pasteurisé exempt de conservateurs (NP), un jus pasteurisé exempt de conservateurs (P) et un jus pasteurisé avec 2 aditifs conservateurs (E202, E211) (PC). Ce choix a été fait pour apprécier l'efficacité antifongique de l'HE seul ou en synergie avec un traitement thermique de type pasteurisation (chauffage à 80°C mn pendant 10 minutes), en comparaison avec le produit fini (jus + conservateurs chimiques). Et pour mieux étudier la cinétique de la croissance fongique, nous avons introduit dans chaque échantillon une suspension de *saccharomyces cerevisiae*. Les résultats de cette étude sont consignés dans la **Figure 9**.

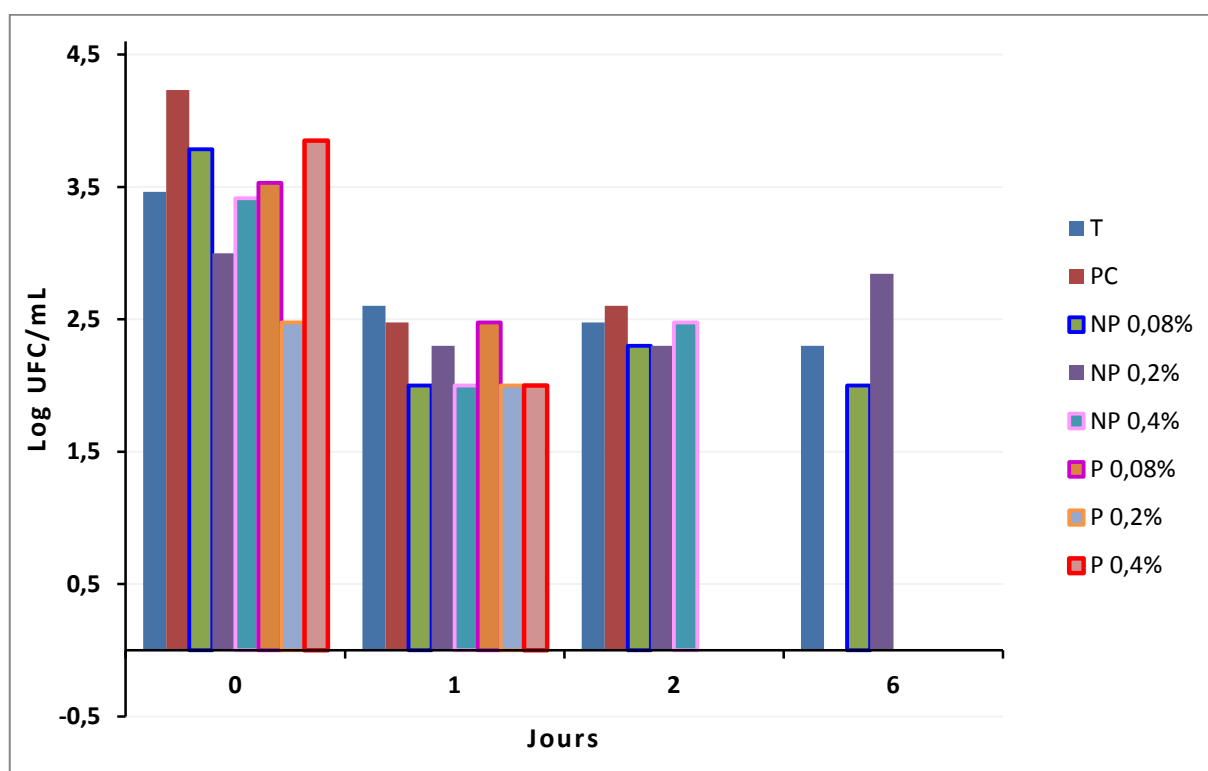


Figure 9. Cinétique de la croissance fongique dans les jus Orangina®.

(NP : Jus Non Pasteurisé + Huile essentielle ; P : Jus Pasteurisé + Huile essentielle ; PC : Jus Pasteurisé + Conservateurs de synthèse (E202, E211) ; T : Témoin négatif ; UFC : Unité Formant Colonie)

A la lecture des résultats de la cinétique fongique, il en ressort qu'à J-0, les résultats que nous avons obtenus révèlent une contamination fongique dans les 3 types de jus Orangina®. Ceci nous semble raisonnable du moment qu'il n'y a pas eu un contact assez long entre la souche fongique et l'HE. Cependant et à J-1, une diminution de la croissance fongique, dans toutes les

boissons sucrées, a été notée. La même constatation a été rapportée à J-2 sauf pour les boissons sucrées pasteurisées et supplémentées en HE (P 0.08%, P 0.2% et P 0.4%) où nous avons notés une absence totale de toutes contaminations fongiques. Ceci prouve qu'il y a une synergie d'action entre l'essence aromatique et le traitement thermique. Ceci a été confirmé aussi à J-6 où l'effet antifongique du couple HE-Traitement thermique s'est maintenu durant le temps. Par ailleurs, il a été noté que la boisson non pasteurisée supplémentée de 0.4 % en HE (NP 0.4%) a présenté une absence totale de contamination fongique alors que les autres boissons non pasteurisées (NP 0.08%, NP 0.2%), une croissance fongique n'a pas été éliminée et s'est maintenue entre 2 et 3 Log UFC/ml.

En résumé, le traitement thermique a été efficace dans l'élimination totale de la croissance fongique dans les boissons supplémentées en HE et ce qu'elle quelles soient les doses utilisées, alors qu'en absence de traitement thermique, uniquement la dose la plus élevée en HE qui s'est montrée efficace dans la matrice alimentaire.

Concernant le pouvoir biocide de l'essence du gommier bleu, la majorité des scientifiques ont consenties leur effort à évaluer cette activité *in vitro* (**Tyagi et Malik, 2011 ; Elaissi et al., 2012 ; Bachir Raho et Benali, 2012 ; Pereira et al., 2014 ; Pombal et al., 2014**). A nos jours, rares sont les travaux qui ont été consacrés à l'étude de l'efficacité antimicrobienne de cette huile dans une matrice alimentaire. Un seul travail, publié dans la revue « BioMed Research International » par **Tyagi et al. (2014)**, a mis en exergue l'efficacité de l'essence d'eucalyptus dans une matrice alimentaire (jus de fruit naturel à base d'oranges et de pommes). Des résultats similaires aux nôtre ont été rapportés par cette équipe qui a démontré qu'un traitement thermique à 70°C pendant 90 secondes uniquement été suffisant pour inhiber toute croissance fongique (*S. cerevisiae*) dans le jus de fruit.

Néanmoins et en dépit de toutes ces recherches, notre travail demeure prometteur pour mettre en exergue les potentielles applications de cette fraction aromatique en biopréservation alimentaire dans les boissons fruitées commercialisées. De plus et dans le cas des boissons sucrées et fruitées type Orangina[®], il est établi que l'efficacité de l'huile augmente avec la diminution du pH de l'aliment, de la température de stockage. Cela est d'autant plus intéressant que les quantités d'huiles nécessaires pour le contrôle de la croissance fongique dans les aliments conservés à basse température pourraient être réduites (**Hyldgaard et al., 2012 ; Ait-Ouazzou et al., 2012**). Ceci permettra de diminuer leurs concentrations et de réduire, au minimum, des effets sensoriels défavorables.

Néanmoins et en dépit de tous ces points positifs, beaucoup de verrous biotechnologiques devraient être levés avant que ces huiles aromatiques puissent être considérées comme additifs alimentaires.

2.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue *in vivo*

Les résultats de l'évolution de l'inflammation, à travers la mesure du poids des pattes chez le groupe expérimental et le groupe témoin, sont colligés dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII : Réduction de l'inflammation dans les pattes postérieures gauches des souris.

Traitement	Dose	Poids PPG (m ± ET)	% Réduction œdème
T-	-	0.1451 ± 0.015 ^B	-
HE	250 µl/kg	0.1435 ± 0.016 ^B	15.26319
HE	25 µl/kg	0.1316 ± 0.018 ^A	35.99819
HE	2.5 µl/kg	0.1273 ± 0.021 ^A	14.17449
T+	75 mg/kg	0.1130 ± 0.008 ^A	34.60682

T⁻ : Témoin négatif (eau physiologique, 0.9% NaCl) ; T⁺ : Témoin positif (Clofenal[®], 75 mg/Kg) ; Poids PPG: Poids (g) des Pattes Postérieures Gauches ; HE : Huile Essentielle ; m ± ET : Moyenne ± Ecart-Type.

Les lettres alphabétiques identiques dans la même colonne signifient qu'il n'y a pas de différence significative ($P > 0.05$) au risque de 5% avec le test ANOVA suivi par Tukey *post-hoc* multi comparaison.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire sont rapportés dans le **Tableau VIII** qui présente les variations du pourcentage de réduction de l'œdème (patte postérieure gauche des souris) des différents essais (T⁺ et HE), par rapport au témoin négatif (eau physiologique). A noter que toutes les doses ont été administrées *per os*. Le témoin négatif, traité avec l'eau physiologique, est le lot qui a présenté le poids de gonflement le plus important (0,14516 g). En plus, le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème a révélé que le lot traité avec l'HE (25 µl/kg) est celui qui a présenté le taux le plus élevé (35.99%) suivie par le lot traité avec le médicament où la réduction était de 34.6%. En outre, aucune différence, sur le plan statistique ($p > 0.05$), n'a été décelée entre ces deux lots et, par conséquent, notre échantillon d'HE présente le même pouvoir anti-inflammatoire que le médicament de référence.

De nombreux végétaux sont connus pour leur activité anti-inflammatoire, c'est le cas en particulier du gommier bleu (Silva *et al.*, 2003 ; Vigo *et al.*, 2004 ; Tsai *et al.*, 2011). Bien que les vertus thérapeutiques de l'essence de cet arbre à parfum soient connues, très peu sont les publications scientifiques qui mettent en exergue cette activité. Une étude brésilienne (Silva *et al.*, 2003), publiée dans le « Journal of Ethnopharmacology », a démontré que l'essence aromatique de 3 espèces du genre *Eucalyptus* (*E. citriodora*, *E. tereticornis* et *E. globulus*) a exhibé, *in vivo*, une action anti-inflammatoire intéressante et significativement différente du contrôle négatif par la méthode de l'œdème induit par Dextrane dans les pattes des animaux.

Cette constatation a été confirmée, *in vitro*, par d'autres travaux ultérieurs (Tsai *et al.*, 2011). Par ailleurs, une autre équipe brésilienne (Medeiros *et al.*, 2007) a mis au point une formulation galénique (lotion), à visée thérapeutique, contenant l'eucalyptus comme ingrédient principal. L'efficacité de cette formulation a été validée pour la réduction de l'inflammation locale induite par un agent phobogène chez les souris.

Il est mentionné, dans plusieurs articles de synthèse et des livres consacrés à l'aromathérapie, que les essences aromatiques des plantes à parfum, contenant en quantité importante d'alcools et de cétones monoterpéniques, sont utilisées depuis longtemps, comme anti-inflammatoire par voie externe mais délaissées en tant qu'anti-inflammatoire *per os* alors qu'elles pourraient être facilement associées aux anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) afin d'en augmenter l'activité et d'en diminuer les effets néfastes sur les muqueuses. (Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012).

Sur le plan méthodologique, il est donc nécessaire de tester l'activité anti-inflammatoire par d'autres méthodes. A titre d'exemples, nous citerons la méthode à l'huile de croton pour apprécier l'activité topique (sur la peau) des HE. En outre, l'activité anti-inflammatoire subaiguë pourra être estimée via le test de granulome au pellet de coton (Yu *et al.*, 2013).

2.4. Etude de l'activité antispasmodique *in vivo*

L'activité analgésique périphérique de l'essence du gommier bleu a été évaluée par le dénombrement des spasmes ou des contractions abdominales induites, chez les souris, par injection intra-péritonéale de l'acide acétique. Les résultats de cette étude sont consignés dans la Figure 10.

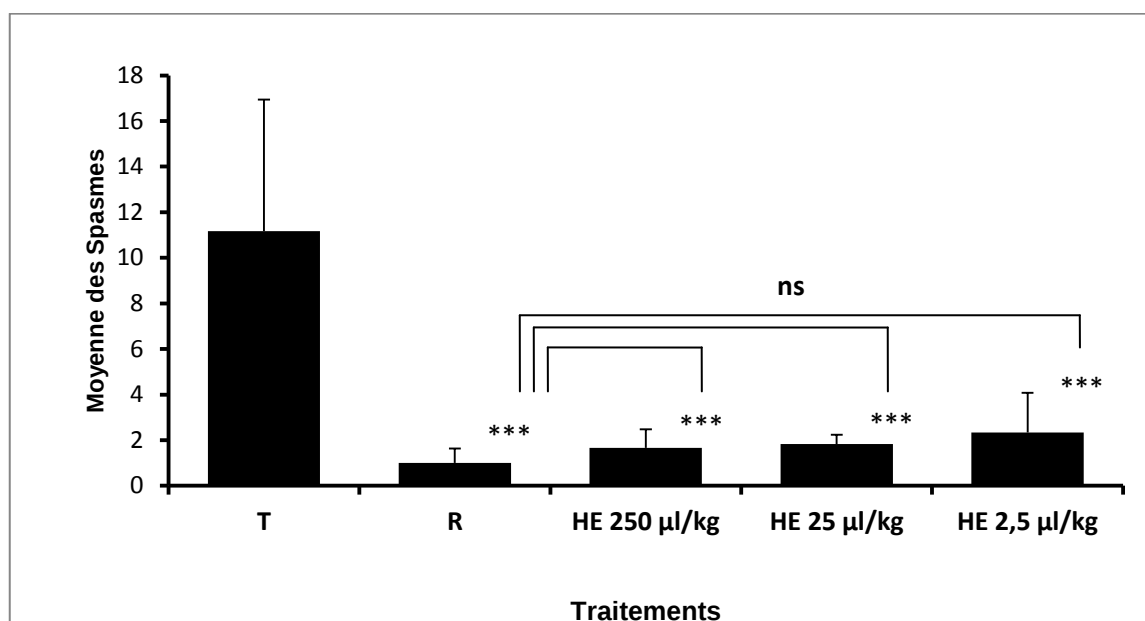


Figure 10. Activité analgésique périphérique de l'essence aromatique d'*Eucalyptus globulus* *in vivo*.

T : Témoin négatif (eau physiologique, 0.9% NaCl) ; R : Témoin positif (Spasfon, comprimé à 80mg/kg) ; HE : Huile Essentielle ; ns : Différence non significative ($P>0.05$) ; *** Différence Très Hautement Significative ($P<0.001$) avec le test d'ANOVA suivi par un test de comparaison par paire de Tukey.

L'étude de l'activité antispasmodique de l'HE, appelée encore activité analgésique périphérique, a été évaluée *in vivo* sur des souris. Les différentes doses en HE ont été administrées *per os*. L'activité antispasmodique a été exprimée par le nombre de contractions en dix minutes.

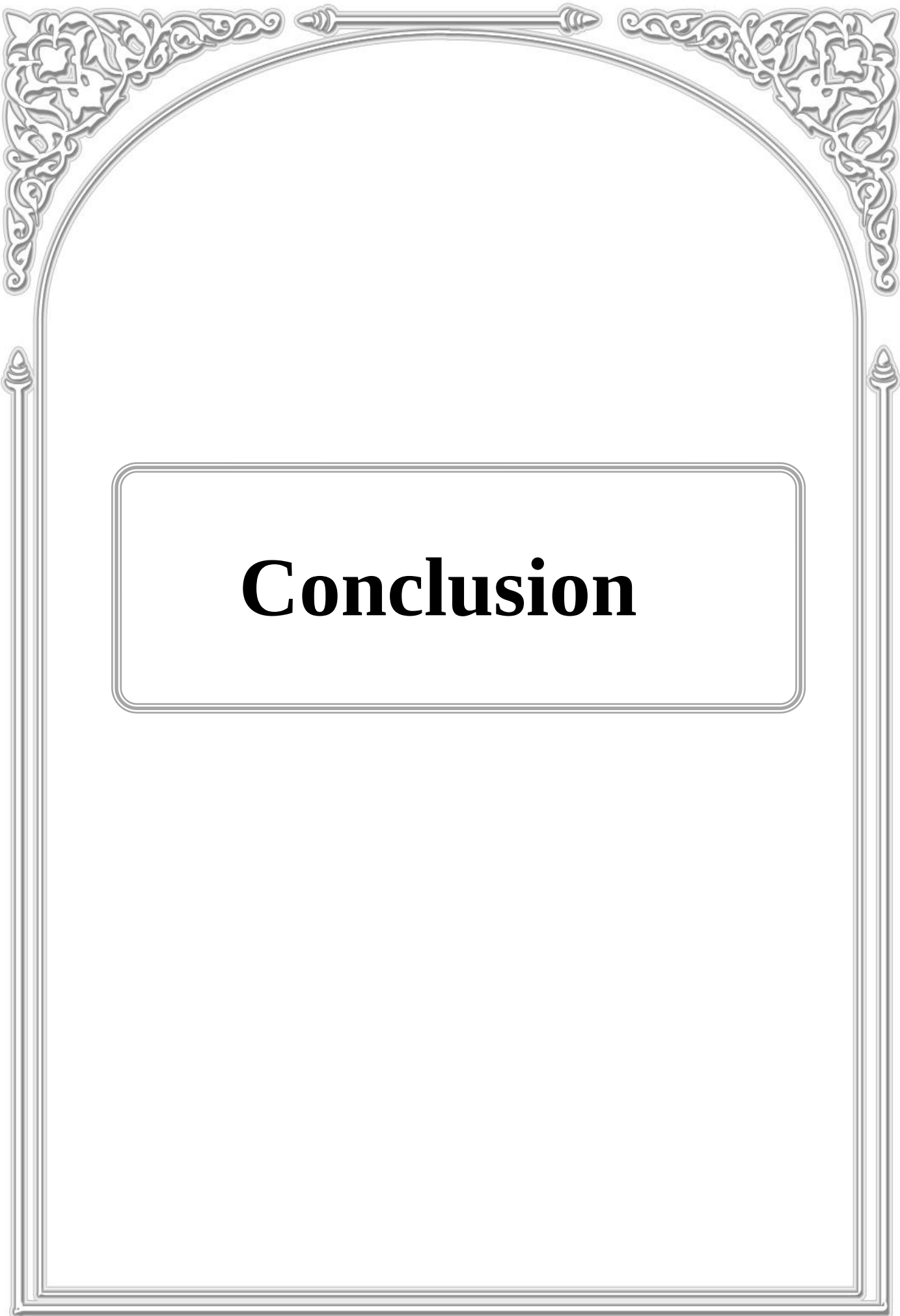
Il en ressort, d'après les résultats obtenus, que le lot traité avec le médicament (Témoin+) est celui qui a présenté la moyenne de spasmes la plus faible (1 contraction pour 10 minutes). En revanche, le nombre de contractions le plus élevé (11.167) a été enregistré pour le lot traité avec l'eau physiologique (Témoin-). Concernant nos échantillons en HE, nous remarquons que plus la dose en HE à administrer augmente, plus le nombre de spasmes diminue. En outre, cette action analgésique est « dose-dépendante ».

Par ailleurs, aucune différence, sur plan statistique ($P>0.05$) n'a été signalée entre le lot du contrôle positif et les lots traités avec l'HE et ce qu'elle que soit la dose administrée (**Annexe 2**).

Les plantes aromatiques ont des propriétés spasmolytiques de par leur contenu en HE. De nombreuses études, *in vitro*, réalisées sur des préparations isolées d'intestins, tels que l'iléon de cobaye, la souris ou le chat, ont prouvé que les hybrides aromatiques de l'*Eucalyptus* antagonisent les spasmes induits par l'acétylcholine et l'histamine au niveau du muscle lisse (**Silva et al., 2003**). Les mêmes auteurs ont révélé aussi que ces huiles à parfum sont douées d'une activité analgésique centrale, prouvée par le test de la plaque chauffante, statistiquement similaire à la morphine.

Le mécanisme d'action probable serait que les composants aux propriétés lipophiles (faible poids moléculaire) des HE s'intégreraient de manière réversible aux membranes cellulaires des muscles lisses ce qui inhibe l'entrée de calcium dans les cellules et empêcherait, à terme, la contraction de ces organes. Cette propriété se retrouve aussi au niveau du colon ; en effet, l'introduction dans le gros intestin d'HE sous forme diluée diminue les spasmes (**Kaloustian et Hadji-Minaglou, 2012**).

La massothérapie et l'aromathérapie ont donné naissance, ces dernières années, à la masso-aromathérapie, qui gagne en sérieux et en crédibilité. Elle permet de lutter contre les algies, les états inflammatoires et les contractures musculaires. Buckle, dans son livre consacré à l'aromathérapie, traite dans des articles séparés du traitement des douleurs et des inflammations (**Buckle, 2003**).



Conclusion

CONCLUSION

Cette présente étude avait pour objectif de mettre en évidence les activités antimicrobienne, anti-inflammatoire et anti-nociceptive de l'essence aromatique d'un arbre à parfum (*Eucalyptus globulus*), en vue de la valoriser comme conservateur alimentaire ou encore comme ingrédient nutraceutique.

A cet effet, l'essence aromatique du gommier bleu, extraite à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau, a été analysée par techniques chromatographique. Trois composés majoritaires dominant le profil chromatographique de cette huile : fenchone, camphre et eucalyptol.

Une fois l'étape de la caractérisation chimique achevée, un screening antimicrobien de cette huile a été accompli par deux méthodes complémentaires sur une large gamme de souches microbiennes. En phase liquide, l'essence s'est avérée efficace dans l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram +. En phase vapeur, de meilleurs résultats ont été obtenus notamment avec les espèces fongiques unicellulaires (levures) où une inhibition totale a été constatée pour des germes potentiellement dangereux (*Candida albicans* et *C. parapsilosis*). Cette activité antimicrobienne est « dose-dépendante » et paraît plus supérieure à l'Hexomedine (antiseptique). Ces résultats obtenus sont très encourageants pour une éventuelle utilisation dans un projet visant à assainir les ambiances en milieu hospitalier.

L'efficacité antifongique de l'essence a été vérifiée en l'incorporant dans une matrice alimentaire (jus de fruit gazéifié type Orangina®). En combinaison avec un traitement thermique, l'essence d'eucalyptus a permis une réduction totale de la croissance fongique, en comparaison avec le contrôle négatif.

L'autre volet abordé, lors de cette étude, était la détermination de certaines propriétés thérapeutiques de la fraction aromatique du gommier bleu. *In vivo*, l'étude de l'activité anti-inflammatoire aigüe a établi l'efficacité de l'huile essentielle, en comparatif avec le médicament de référence. En outre, l'essence présente une action spasmolytique car son administration a permis de réduire, d'une façon significative, le nombre de spasmes chez les souris.

Outre leurs propriétés anti-nociceptive et anti-inflammatoire, la fraction aromatique d'eucalyptus officinal améliore la durée de conservation des aliments ; Elle apparaît comme une solution naturelle et efficace pour faire partie intégrante de l'arsenal thérapeutique ou nutraceutique.

Comme perspectives, il serait intéressant d'apprécier l'action antifongique de cette essence en comparaison avec les composés purifiés afin de tirer des conclusions sur les possibles effets synergiques entre différents composés, majoritaire et minoritaire. **Une approche récente consiste à combiner l'utilisation des métabolites terpéniques avec des antibiotiques. C'est là une nouvelle stratégie pour surmonter les problèmes de résistance et des effets secondaires associés aux médicaments.**

En outre, il nous paraît utile de tester l'action antimicrobienne de l'huile essentielle sur une large gamme de microorganismes, en particulier des germes multi-résistants ou ceux impliqués dans les infections nosocomiales, les dermatophytes ou encore des champignons phytopathogènes.

Il serait temps de s'affranchir la barrière *in vitro* et de passer aux études *in vivo*, voire cliniques. Le mode d'action des huiles au niveau cellulaire des germes microbiens a été rarement abordé. De même que la cinétique d'inhibition au cours de la croissance fongique.

L'image positive que véhiculent les produits naturels est un acquis qui ne devra pas occulter l'aspect toxicologique.

En définitive, l'objectif premier de notre travail a été atteint puisque nous avons contribué à la valorisation de la fraction aromatique de l'eucalyptus officinal comme source potentielle de conservateur nutraceutique. L'essence de cet arbre à parfum peut constituer les prémisses d'une nouvelle ère d'industrialisation pour un intérêt futur, aussi bien alimentaire que thérapeutique.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abe, S., Sato, Y., Inoue, S., Ishibashi, H., Maruyama, N., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2002). Anti-*Candida albicans* activity of essential oils including Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil and its component, citral. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 44(4), 285-291.
- Abyaneh, M. R., & Rai, M. (2013). *Antifungal Metabolites from Plants*. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Allured Publishing Corporation, 4^{ème} édition, Pennsylvanie, USA.
- AFNOR. (2000). *Recueil des Normes Françaises : Huiles Essentielles*. Editions AFNOR, Paris, France.
- Ait Youssef, M. (2006). *Plantes médicinales de Kabylie*, édition Ibispress, Paris, France.
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., Cherrat, L., Hassani, M., Laglaoui, A., Conchello, P., & Pagán, R. (2012). Synergistic combination of essential oils from Morocco and physical treatments for microbial inactivation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 283-298.
- Bachir Raho, G., & Benali, M. (2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African journal of Pharmacy and pharmacology*, 2(10), 211-215.
- Bachir Raho, 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.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475.
- 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.
- Baudoux, D. (2001). *L'aromathérapie - Se soigner par les huiles essentielles*. Edition Atlantica, France.
- Gardulf, A., Wohlfart, I., & Gustafson, R. (2004). A prospective cross-over field trial shows protection of lemon eucalyptus extract against tick bites. *Journal of Medical Entomology*, 41(6), 1064-1067.
- Behrbohm, H., Kaschke, O., & Sydow, K. (1995). Effect of the phytogenic secretolytic drug Gelomyrtol forte on mucociliary clearance of the maxillary sinus. *Laryngo-rhino-otologie*, 74(12), 733-737.
- Botineau, M. (2010). *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France.
- Bouaoun, D., Hilan, C., Garabeth, F., & Sfeir, R. (2007). Étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'une plante sauvage *Prangos asperula* Boiss. *Phytothérapie*, 5(3), 129-134.
- Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F. & Mekarnia, M. (2014). Liquid and vapour phase antibacterial activity of *Eucalyptus globulus* essential oil = susceptibility of selected respiratory tract pathogens *American Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 105.
- Boullard, B. (2001). *Plantes médicinales du monde : Croyances et réalités*. édition De Boeck Secundair, Paris, France.
- Brooker, M. I. H., & Kleinig, D. A. (2004). *Field guide to Eucalypts*, Northern Australia (2nd ed.), Bloomings Books, Melbourne, Australie.
- Bruneton, J. (1999). *Huiles essentielles. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Edition Tec & Doc, 3^{ème} édition, Lavoisier, Paris, France.
- Buckle, J. (2003). *Clinical aromatherapy : Essential oils in practice*. Second Edition. Churchill Livingstone, Elsevier Science, Philadelphie, USA.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

- Carson, C. F., & Hammer, K. A. (2011). Chemistry and bioactivity of essential oils. Lipids and essential oils as antimicrobial agents, John Wiley & Sons, Chichester, Royaume-Uni.
- Cermelli, C., Fabio, A., Fabio, G., & Quaglio, P. (2008). Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Current Microbiology*, 56(1), 89-92.
- Chalchat, J. C., Muhayimana, A., Habimana, J. B., & Chabard, J. L. (1997). Aromatic plants of Rwanda: Chemical composition of essential oils of ten *Eucalyptus* species growing in Ruhande arboretum, Butare, Rwanda. *Journal of Essential Oil Research*, 9(2), 159-165.
- Chami, F. (2005). Evaluation *in vitro* de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composés majoritaires *in vivo*: Application dans la prophylaxie et le traitement de la candidose vaginale sur des modèles de rat et de souris immunodéprimés. Thèse de Doctorat d'Etat Es-Sciences en Biologie (option : Pharmacologie expérimentale), Faculté des Sciences Dhar El Mehrez, Université Sidi Mohamed Ben Abdallah, Fès, Maroc.
- Charles, C. H., Sharma, N. C., Galustians, H. J., Qaqish, J., Mcguire, J. A., & Vincent, J. W. (2001). Comparative efficacy of an antiseptic mouthrinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice: a six-month clinical trial. *The Journal of the American Dental Association*, 132(5), 670-675.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Bruyne, T., Hermans, N., & 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(2), 213-220.
- Coppen, J. J. W. (2002). *Eucalyptus*: The genus *Eucalyptus*. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles. Volume 22. Edition Taylor & Francis, Londres, Grande-Bretagne.
- Đakov, T. (2011). Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(3), 277-284.
- Daroui-Mokaddem, H. (2012). Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololus* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asteraceae). Thèse de Doctorat en Science, option : Biochimie appliquée, Département de Biochimie, Université Badji-Mokhtar de Annaba, Algérie.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., Doyle, M. P., & Beuchat, L. R. (2007). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, ASM Press, Washington, USA.
- Day, L. M., Ozanne-Smith, J., Parsons, B. J., Dobbin, M., & Tibballs, J. (1997). *Eucalyptus* oil poisoning among young children: mechanisms of access and the potential for prevention. *Australian and New Zealand Journal of Public Health*, 21(3), 297-302.
- Deans, S. G., & Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5(2), 165-180.
- Djenane, D., Lefsih, K., Yangüela, J., & Roncalés, P. (2011). Composition chimique et activité anti-Salmonella enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, de *Lavandula angustifolia* et de *Satureja hortensis*. Tests *in vitro* et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7±1° C. *Phytothérapie*, 9(6), 343-353.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Dudonné, S. (2009). Développement d'extraits végétaux antioxydants à usage nutraceutique. Thèse de doctorat en Sciences, Technologie, Santé et Nutrition. École Doctorale Sciences de la vie et de la santé, Bordeaux, France.
- Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, 21(4), 308-323.

- Elaissi, A., Rouis, Z., Salem, N. A. B., Mabrouk, S., ben Salem, Y., & Khouja, M. L. (2012). Chemical composition of 8 eucalyptus species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 81.
- ESCOP, European Scientific Cooperative on Phytotherapy. (2003). *ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products*. Edition Thiem Verlag, Stuttgart, Allemagne.
- Federspil, P., Wulkow, R., & Zimmermann, T. (1997). Effects of standardized Myrtol in therapy of acute sinusitis--results of a double-blind, randomized multicenter study compared with placebo. *Laryngo-rhinotologie*, 76(1), 23-27.
- Festy, D., Pacchioni, I. (2014). *Guide de poche d'aromathérapie: 41 huiles essentielles pour se soigner en toute simplicité*. Editions Quotidien Malin, France.
- Fine, D. H., Furgang, D., Barnett, M. L., Drew, C., Steinberg, L., Charles, C. H., & Vincent, J. W. (2000). Effect of an essential oilcontaining antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(3), 157-161.
- Gilly, G. (1997). *Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché*. Editions L'Harmattan, Paris, France.
- Goetz, P., & Ghedira, K. (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Springer-Verlag, Paris, France.
- Goldbeck, J. C., do Nascimento, J. E., Jacob, R. G., Fiorentini, Â. M., & da Silva, W. P. (2014). Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Industrial Crops and Products*, 60, 304-309.
- Goni, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R., & Nerín, C. (2009). Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. *Food Chemistry*, 116(4), 982-989.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Dornisch, K., & Elstner, E. F. (2000). Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. *Arzneimittel-Forschung*, 50(2), 135-139.
- Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3.
- Inouye, S., Takizawa, T., & Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(5), 565-573.
- Juergens, U. R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Repges, R., & Vetter, H. (2003). Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine*, 97(3), 250-256.
- Kaloustian, J., & Hadji-Minaglou, F. (2012). *La connaissance des huiles essentielles: Qualitologie et aromathérapie: entre science et tradition pour une application médicale raisonnée*. Collection Phytothérapie pratique, Springer-Verlag, Paris, France.
- Kehrl, W., Sonnemann, U., & Dethlefsen, U. (2004). Therapy for acute nonpurulent rhinosinusitis with cineole: results of a double-blind, randomized, Placebo-Controlled Trial. *The Laryngoscope*, 114(4), 738-742.
- Kim, M. J., Nam, E. S., & Paik, S. I. (2005). The effects of aromatherapy on pain, depression, and life satisfaction of arthritis patients. *Taehan Kanho Hakhoe Chi*, 35(1), 186-194.
- Kirton, L. G. (2005). Laboratory and field tests of the effectiveness of the lemon-eucalyptus extract, Citridiol, as a repellent against land leeches of the genus *Haemadipsa* (Haemadipsidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99(7), 695-714.
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2012). Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta tropica*, 122(2), 212-218.

- Laird, K., & Phillips, C. (2012). Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
- Lazouni, H., Benmansour, A., Taleb-Bendiab, S. A., & Sari, D. C. (2007). Composition des constituants des huiles essentielles et valeurs nutritives du *Foeniculum vulgare* Mill. *Sciences & Technologie C*, 25, 7-12.
- Leicach, S. R., Guarnaschelli, A. B., Garau, A. M., Chludil, H. D., Grass, M. Y., & Fernandez, P. C. (2012). Chemical Defenses in Eucalyptus Species: A Sustainable Strategy Based on Antique Knowledge to Diminish Agrochemical Dependency. INTECH Open Access Publisher.
- Lis-Balchin, M. (2006). Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals. Pharmaceutical Press, Londres, Grande-Bretagne.
- Louppe, D. (Ed.). (2008). PROTA : Ressources végétales de l'Afrique tropicale. Backhuys Publishers, Wageningen, Pays-Bas.
- Manika, N., Chanotiya, C. S., Negi, M. P. S., & Bagchi, G. D. (2013). Copious shoots as a potential source for the production of essential oil in *Eucalyptus globulus*. *Industrial Crops and Products*, 46, 80-84.
- Martinetti P. (2013). Mon guide des huiles essentielles. Edition Fernand Lanore, France.
- Matthys, H., de Mey, C., Carls, C., Ryś, A., Geib, A., & Wittig, T. (2000). Efficacy and tolerability of myrtol standardized in acute bronchitis. A multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled parallel group clinical trial vs. cefuroxime and ambroxol. *Arzneimittel-Forschung*, 50(8), 700-711.
- Medeiros, K. C., Monteiro, J. C., Medeiros, I. A., Silva, B. A., & Piuvezam, M. R. (2007). Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodon radicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 23-28.
- Meister, R., Wittig, T., de Mey, C., & Study Group Investigators. (1999). Efficacy and tolerability of Myrtol standardized in long-term treatment of chronic bronchitis. *Arzneim-Forsch*, 49, 351-358.
- Mulyaningsih, S., Sporer, F., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2010). Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1, 8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, 17(13), 1061-1066.
- Osawa, K., Yasuda, H., Morita, H., Takeya, K., & Itokawa, H. (1996). Macrocarpals H, I, and J from the leaves of *Eucalyptus globulus*. *Journal of Natural Products*, 59(9), 823-827.
- Ouédraogo, N., Lompo, M., Sawadogo, R. W., Tibiri, A., Hay, A. E., Koudou, J., & Guissou, I. P. (2012). Étude des activités anti-inflammatoire, analgésique et antipyrétique des décoctés aqueux des feuilles et des racines de *Pterocarpus erinaceus* Poir. (Fabaceae). *Phytothérapie*, 10(5), 286-292.
- Pattnaik, S., Subramanyam, V. R., Bapaji, M., & Kole, C. R. (1997). Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios*, 89(358), 39-46.
- Pereira, V., Dias, C., Rosa, E., & Saavedra, M. J. (2014). Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Industrial Crops and Products*, 52, 1-7.
- Pharmacopée Européenne. (2007). Direction de la Qualité du Médicament & Soins de Santé du Conseil de l'Europe (DEQM), Strasbourg, France.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A., & Harvala, C. (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3294-3301.
- Pombal, S., Rodilla, J., Gomes, A., Silva, L., & Rocha, P. (2014). Evaluation of the antibacterial activity of the essential oil and antioxidant activity of aqueous extracts of the *Eucalyptus globulus* Labill. leaves. *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*, 3(11), 356-366.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39.

Proenza, Y. G., Álvarez, R. Q., Tamayo, Y. V., Garcia, Y. S., & Espinosa, R. H. (2013). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Eucalyptus pellita*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(27), 1979-1983.

Sallé, J. L. (1991). Le totum en phytothérapie, approche de la phyto-biothérapie. Edition Frison-Roche, Paris, France.

Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2000). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, 14(4), 240-244.

Sartorelli, P., Marquioreto, A. D., & Moreno, P. R. H. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. *Phytotherapy Research*, 21(3), 231-233.

Shieh, J. C. (1996). Yields and chemical components of essential oils in *Eucalyptus camaldulensis* leaves. *Taiwan Journal of Forest and Science*, 11, 149-157.

Silva, J., Abebe, W., Sousa, S. M., Duarte, V. G., Machado, M. I. L., & Matos, F. J. A. (2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2), 277-283.

Silvant C. (2015). L'Aromathérapie: La nature au service de l'humanité. Editions Publibook, Paris, France.

Singh, A. K., Brophy, J. J., & Gupta, K. C. (1988). The essential oil of *Eucalyptus urophylla*: a rich source of p-cymene. *Indian Perfumer*, 32, 201-204.

Sonboli, A., Babakhani, B., & Mehrabian, A. R. (2006). Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(3-4), 160-164.

Su, Y. C., Ho, C. L., Wang, I. C., & Chang, T. (2006). Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts. *Taiwan Journal of Forest and Science*, 21, 49-61.

Tassin, J., Missamba-Lola, A. P., & Marien, J. N. (2011). Biodiversité des plantations d'eucalyptus. *Bois et forêts des tropiques*, 309(3), 27-35.

Tesche, S., Metternich, F., Sonnemann, U., Engelke, J. C., & Dethlefsen, U. (2008). The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 265(11), 1355-1359.

Tisserand, R., & Young, R. (2014). Essential oil safety: a guide for health care professionals (Vol. 12). Churchill Livingstone, Elsevier Health Sciences, Londres, Royaume-Uni.

Tsai, M. L., Lin, C. C., Lin, W. C., & Yang, C. H. (2011). Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(10), 1977-1983.

Tsiri, D., Kretsi, O., Chinou, I. B., & Spyropoulos, C. G. (2003). Composition of fruit volatiles and annual changes in the volatiles of leaves of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. growing in Greece. *Flavour and fragrance journal*, 18(3), 244-247.

Tyagi, A. K., & Malik, A. (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126(1), 228-235.

Tyagi, A. K., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. (2013). Anti-yeast activity of mentha oil and vapours through *in vitro* and *in vivo* (real fruit juices) assays. *Food chemistry*, 134(15), 1-4.

Tyagi, A., Bukvicki, D., Gottardi, D., Malik, A., & Guerzoni, M. E. (2014). *Eucalyptus* essential oil as a natural food preservative: *in vivo* and *in vitro* antiyeast potential. *BioMed research international*, 2014.

Vigo, E., Cepeda, A., Perez-Fernandez, R., & Gualillo, O. (2004). *In-vitro* anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A. 1 murine macrophages. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(2), 257-263.

Vilela, G. R., de Almeida, G. S., Brito, J. O., & da Gloria, E. M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 108-111.

- Wei, R. P., & Xu, D. (2003). *Eucalyptus Plantations*. World Scientific, China.
- Wilkinson, J. M., Hipwell, M., Ryan, T., & Cavanagh, H. M. (2003). Bioactivity of *Backhousia citriodora*: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1), 76-81.
- Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544-547.
- Worth, H., Schacher, C., & Dethlefsen, U. (2009). Concomitant therapy with Cineole (Eucalyptole) reduces exacerbations in COPD: a placebo-controlled double-blind trial. *Respiratory Research*, 10(1), 69.
- Yu, D., Yuan, Y., Jiang, L., Tai, Y., Yang, X., Hu, F., & Xie, Z. (2013). Anti-inflammatory effects of essential oil in *Echinacea purpurea* L. *Pakistanese Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(2), 403-408.
- Zaika, L. L. (1988). Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.
-

ANNEXE (1)

Appareillage, Verrerie et Milieux de culture

Appareillage	Verrerie	Milieu de culture et réactifs
- Agitateur	- Anse de platine	- Gélose Sabouraud + Chloramphénicol
- Bain marie	- Bec bunsen	- Gélose Muller-Hinton
- Etuves bactériologiques (25°C, 35°C)	- Flacons stériles	- Eau physiologique (0.9%)
- Incubateur	- Disques vierges (9 mm)	- Hydroxyde de potassium
- Portoir de tubes à essai	- Boîtes Pétri stériles	- Disques d'Antibiotiques (Chloramphénicol, Erythromycine, Amoxicilline-Acide clavulanique)
- Réfractomètre	- Pipettes Pasteurs	- Solution Héxomédine (0.01%)
- Réfrigérateur	- Ecouvillons stériles	- Carraghénine
- Balance de précision	- Tubes à essai stériles	- Acide acétique
- Pince		

ANNEXE (2)

Etude Statistique

Activité anti-inflammatoire de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Test ANOVA à sens unique suivi par un test de comparaison par paire de Tukey au risque de 5%

Tukey HSD test; variable PPG (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = ,00029, df = 25,000						
	TRT	{1} - ,14517	{2} - ,11300	{3} - ,14350	{4} - ,13167	{5} - ,12733
1	T		0,022420	0,999811	0,643310	0,380844
2	R	0,022420		0,033021	0,336643	0,590977
3	DOSE 250	0,999811	0,033021		0,744147	0,477146
4	DOSE 25	0,643310	0,336643	0,744147		0,991482
5	DOSE 2.5	0,380844	0,590977	0,477146	0,991482	

En rouge : différence significative ($P < 0.05$)

En noir : différence non significative ($P > 0.05$)

Activité analgésique périphérique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Test ANOVA à sens unique suivi par un test de comparaison par paire de Tukey au risque de 5%

Tukey HSD test; variable SPASMES (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 7,5333, df = 25,000						
	TRT	{1} - 11,167	{2} - 1,0000	{3} - 1,6667	{4} - 1,8333	{5} - 2,3333
1	T		0,000143	0,000156	0,000163	0,000201
2	R	0,000143		0,993088	0,983903	0,915062
3	DOSE 250	0,000156	0,993088		0,999973	0,993088
4	DOSE 25	0,000163	0,983903	0,999973		0,997754
5	DOSE 2.5	0,000201	0,915062	0,993088	0,997754	

En rouge : différence très hautement significative ($P < 0.001$)

En noir : différence non significative ($P > 0.05$)