

**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 des Populations et Organismes**

**Mémoire de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du Diplôme**  
**D'Ingénieur d'Etat en Biologie**  
**Option : Biotechnologies Végétales**

### **Thème**

**Pouvoirs anti-inflammatoire et  
antimicrobien de la Fraction  
Aromatique  
De *Eucalyptus globulus* (Labill.)**

**Présenté par**  
**RAGUI Fatima**

**Date de Soutenance**  
**Mardi 27/10/2015**

**Devant le jury :**

<b>M<sup>me</sup> FAIDI H.</b>	<b>MAA</b>	<b>Université Blida 1</b>	<b>Présidente</b>
<b>M<sup>me</sup> AMEDJKOUH H.</b>	<b>MAA</b>	<b>Université Blida 1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>M<sup>me</sup> AMARA N.</b>	<b>MAA</b>	<b>Université Blida 1</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M. BOUKHATEM M.N.</b>	<b>MC-B</b>	<b>Université Blida 1</b>	<b>Co-promoteur</b>

**œ Promotion: 2014-2015**

## *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 ma promotrice, **Mme Amara**, qui m'a aidé et soutenue dans la réalisation de ce modeste travail.

Je remercie mon Co-promoteur **M. Boukhatem** 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 Faidi**, 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 Amedjkouh** , 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 Directeur du Laboratoire d'Hygiène de Blida et tous le personnel technique et administratif**, de m'avoir accordé se stage.

Je remercie très sincèrement **Monsieur le Directeur de l'Unité-Antibiotical de Sidal (Médéa)**, pour son aide précieuse, ainsi que tous le personnel de la société.

Je remercie toute l'équipe de la **société Extral-Bio de Chiffa (Blida)**, pour tout le temps qui m'ont consacré.

# Dédicaces

Simple sont les mots que je vais utiliser. Mais mes sentiments sont pleins de gratitude à votre égard :  
A la lumière de ma vie et à celle qui a suivi pas à pas mes études et m'a toujours soutenue dans les moments les plus difficiles et qui je ne peux rien faire sans elle,  
ma très chère

**MAMAN**

A mon très cher **PAPA** qui a fait tout ce qu'il pouvait pour me rendre heureuse. J'estime beaucoup son affection, sa souffrance et ses sacrifices et que ce travail soit pour eux le témoignage de mes plus profondes reconnaissances.

A mes très chères sœurs : **Aicha** et son mari **Djamel, kheira** et son mari **MOHAMED ,Loubna.**

A mes très chères frères : **Aek , mohamed , Bilal .**

A mes très chères nièces : **Khadidja , Amira , Aicha , Hassiba .**

A tous mes collègues de l'**E P H** d'el Affroune.

A toute la famille **Lamri et Zatier.**

Enfin, a toutes les personnes que je n'ai pas citées et

que j'aime



**Fatima**

# Glossaire

- ❖ **Anti microbien** :le terme antimicrobien désigne les différents agents et substances qui tuent ( microbicide ) , ou arrêtent ( microbiostatique ) la croissance des micro organismes , telles les bactéries ( activité antibactérienne ) , les mycètes ou les champignons ( activité antimycosique ou antifongique ) , les virus ( activité antivirale) et les parasites ( activité antiparasitaire ) . ( **frabisher et fuerst .1976 ; prescott et al ., 2003** )
- ❖ **Anti inflammatoire** : qui fait dégonfler et diminuer l'irritation . la plupart des anti inflammatoires sont aussi des anti douleurs .
- ❖ **Anti septique** : détruit les micro organismes responsables des infections .

---

<b>Introduction.....</b>	
<b>Chapitre I : Synthèse Bibliographiques</b>	
1.1. Condensé historique sur l' <i>Eucalyptus</i> .....	1
1.2. <i>Eucalyptus globulus</i> : données botaniques.....	1
1.3. Etymologie et noms vernaculaires.....	2
1.4. Classification botanique.....	2
1.5. Origine et répartition géographique.....	5
1.6. Ecologie.....	5
1.7. Production et commerce international.....	5
1.8. Usages.....	5
1.9. Huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i> .....	6
1.9.1. Composition chimique.....	6
1.9.2. Indications thérapeutiques de l'huile essentielle.....	7
1.9.3. Contre-indications et effets indésirables.....	8
1.9.4. Recherches cliniques sur l'eucalyptus.....	8
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
2.1. Matériel végétal et huile essentielle.....	11
2.2. Matériel animal.....	11
2.3. Milieux de cultures et agents chimiques.....	11
2.4. Souches microbiennes.....	12
2.5. Analyses chromatographiques de l'huile essentielle.....	12
2.6. Evaluation de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> .....	13
2.6.1. Méthode de l'aromatogramme (Technique en milieu solide).....	13
2.6.2. Méthode en phase vapeur (Microatmosphère).....	14
2.7. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue.....	15
<b>Chapitre III : Résultats et Discussion</b>	
3.1. Etude analytique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> .....	17
3.1.1. Propriétés organoleptiques.....	17

3.1.2. Composition chimique.....	17
3.2. Screening antimicrobien de l'huile essentielle.....	21
3.2.1. Résultats de l'aromatogramme.....	21
3.2.2. Résultats de microatmosphère.....	26
3.3. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue <i>in vivo</i> .....	27
<b>Conclusion.....</b>	<b>30</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>	
<b>Annexes.....</b>	

# Résumé

L'objectif assigné à ce travail consiste à apporter une contribution à la mise en évidence du pouvoir antimicrobien et anti-inflammatoire de l'huile essentielle (HE) d'*Eucalyptus globulus* (Labill.), afin de mieux cerner ses potentielles applications comme ingrédient actif 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 (5 bactéries et 4 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 14 et 50 mm. Cette activité antimicrobienne est aussi « dose-dépendante ». En phase vapeur, des résultats décevants ont été obtenus pour toutes les souches, excepté *Trichosporon* sp où les DZI s'échelonnent entre 32 et 55 mm pour les différentes doses utilisées.

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'inflammation a révélé que le lot traité avec l'HE, à la plus faible dose (0.01%), est celui qui a présenté le taux le plus élevé (9.65%), statistiquement comparable ( $P > 0.05$ ) à celui du contrôle positif.

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

**Mots-clés:** Antimicrobien naturel; Anti-inflammatoire; *Eucalyptus globulus*; Fenchone; Huile essentielle.

# Abstract

The aim of this study was to assess the antimicrobial effect of *Eucalyptus globulus* (Labill.) essential oil (EGEO), to better understand its potential applications as a bioactive agent in aromatherapy.

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 (5 bacteria and 4 fungi). In the liquid phase, EGEO exhibited a potent antimicrobial effect against Gram + strains, with Diameters of Inhibitory Zones (DIZ) varied from 14 to 50 mm. Moreover, this inhibitory effect was "dose-dependent". In the vapor phase, our results revealed that EGEO don't exhibit an inhibitory effect against all microbial strains, with the exception of *Trichosporon* sp.

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 (0.01%) presented a good percentage (9.65%) of edema reduction, statistically similar ( $P>0.05$ ) to the positive control (diclofenac).

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

**Keywords:** Natural Antimicrobial; Anti-inflammatory effect; *Eucalyptus globulus*; Fenchone; Essential oil.



# ملخص

الهدف من دراستنا هو اظهار التأثير المضاد الحيوي و المضاد للالتهاب للزيت الأساسي للاوكاليتوس , و ذلك لفهم مدى قدرته لإدراجه كمكون علاجي في المستقبل. التكوين الكيميائي لهذه الزيت يظهر أنها تحتوي على 36 مكون , و المكون الأساسي هو الفانثون ثم يليه الكامفر ثم السينيبول.

التأثير المضاد الحيوي و الفطري لهذا المكون عرفت بطريقتين على خمسة أنواع من البكتيريا و أربعة فطريات. والتي أظهرت أن هذه الزيت أعطت نتائج ملحوظة جدا على البكتيريا ذات أَل + gram و هذا التأثير لم نلاحظه في الهواء جيدا حيث أن النتائج كانت سلبية و لم نجد لها أي تأثير فقط في حالة أَل trichosparon sp التي أظهرت نتائج ايجابية.

من جهة أخرى أي في حالة تجربة هذا الزيت الأساسي ضد الالتهاب , تبين لنا أن له تأثير فعال في خفض درجة الالتهاب عند العينات التي تم علاجها بالزيت الأساسي للاوكاليتوس.

الزيت الأساسي للاوكاليتوس اظهر انه منبع جيد لمكونات طبيعية نشطة يمكنها أن تساهم في الوقاية أو المعالجة لأعراض التهابية.

## الكلمات المفتاحية :

مضاد حيوي طبيعي,مضاد للالتهاب,اوكاليتوس قلوبيليس,فانثون, زيت اساسي.

## Liste des tableaux

Titre	Page
<b>Tableau I.</b> : Souches bactérienne et fongique utilisées dans le screening antimicrobien.	12
<b>Tableau II.</b> Paramètres organoleptiques de l'essence d' <i>Eucalyptus</i> .	17
<b>Tableau III.</b> Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i> distillée à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau.	18
<b>Tableau IV.</b> Composition chimique de l'essence d' <i>Eucalyptus</i> provenant de plusieurs pays.	20
<b>Tableau .V.</b> Activité antibactérienne <i>in vitro</i> de l'essence d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	21
<b>Tableau VI.</b> Activité antifongique de l'essence aromatique d' <i>Eucalyptus globulus in vitro</i> .	23
<b>Tableau VII.</b> Activité antibactérienne de l'essence aromatique des espèces du genre <i>Eucalyptus</i> déterminée <i>in vitro</i> par diffusion en milieu gélosé (aromatogramme).	25
<b>Tableau VIII</b> . Réduction de l'inflammation dans les pattes postérieures gauches des souris.	27

## Liste des figures

---

Titre	Page
<b>Figure 1.</b> Illustration des feuilles et fruits d' <i>Eucalyptus globulus</i> .	3
<b>Figure 2.</b> Aspect morphologique de l' <i>Eucalyptus globulus</i> .	4
<b>Figure 3.</b> Illustration de la méthode de l'aromatogramme	15
<b>Figure 4.</b> Illustration de la méthode de Microatmosphère	15
<b>Figure 5.</b> Structure chimique de quelques composés dans l'essence d' <i>Eucalyptus</i> .	19
<b>Figure 6.</b> Aromatogramme de quelques souches microbiennes	22
<b>Figure 7.</b> Activité anti-inflammatoire aigue de l'essence d'eucalyptus révélée par la différence de poids des pattes des animaux	28
<b>Figure 8 :</b> Lot des souris utilisées	Annexe1
<b>Figure 9 :</b> Ablation des pattes	Annexe1
<b>Figure 10 :</b> Balance	Annexe1
<b>Figure 11 :</b> Aromatogramme de <i>Aspergillus fumigatus</i>	Annexe1

## Liste des abréviations

---

- **AFNOR** : Association Française de Normalisation
- **ATB** : Antibiotique
- **AINS** : Anti-inflammatoire Non Stéroïdien
- **ANOVA** : Analyse des Variances
- **ATCC** : American Type Culture Collection
- **CG-SM** : Chromatographie Gazeuse-Spectromètre de Masse
- **CPG** : Chromatographie en Phase Gazeuse
- **CRAPC** : centre de recherche en analyse physico-chimiques
- **DL** : Dose Létale
- **DZI** : Diamètre de Zone d’Inhibition
- **FID** : Flamme Ionisation Detector
- **HE** : Huile Essentielle
- **HEX** : Hexomédine
- **ISO** : Organisation Internationale de Normalisation
- **i.p.** : Intra-péritonéale
- **IPA** : Institut Pasteur d’Alger
- **MHA** : Muller-Hinton Agar
- **NMRI** : Naval Medical Research Institute
- **NF** : Norme Française
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **ONAB** : Office National du Bétail
- **PPG** : Pattes Postérieures Gauches
- **PAM** : Plantes Aromatique et Médicinale
- **SAB** : Sabouraud additionné de Chloramphénicol
- **®** : Marque enregistrée
- **T-** : Témoin négatif
- **T+** : Témoin positif

L'industrie pharmaceutique, des substances permettant de traiter les infections microbiennes et les pathologies inflammatoires. Il demeure intéressant de disposer de nouveaux produits à visée thérapeutique, notamment pour des affections modérées de ce type. Cependant et face au problème soulevé depuis plusieurs années par la résistance des microbes aux antifongiques ou encore les effets indésirables des anti-inflammatoires conventionnelles, la seule alternative fiable à l'usage de ces médicaments synthétiques semble être celle des molécules naturelles bioactives, à l'exemple des huiles essentielles (HE). Connue de façon empirique depuis des siècles, leur efficacité anti-infectieuse et thérapeutique a été scientifiquement démontrée *in vitro* et *in vivo* (**Inouye et Abe, 2007 ; Goetz et Ghedira, 2012 ; Souza et al., 2014**).

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 présent 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 ; Batish et al., 2008 ; Cermelli et al., 2008 ; Djenane et al., 2011**). 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 médicaments 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, vu sa grande exploitation dans l'industrie pharmaceutique malgré ses immenses potentialités thérapeutique et antiseptique. Aussi, plusieurs méthodes microbiologiques et approches techniques ont été examinées lors de cette étude. L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HE, *in vitro*, en phases liquide (aromatogramme) et vapeur (microatmosphère), a été effectuée.

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.

## 1.1. Condensé historique sur l'*Eucalyptus*

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. 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 (Loupe, 2008 ; Martinetti, 2013).

Dès la fin du XIX<sup>e</sup> 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).

Au XIX<sup>e</sup> 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®) et de dentifrices, des préparations pharmaceutiques destinées aux affections des voies respiratoires (Vicks Vaporub®) (Lis-Blchin, 2006 ; Leicach *et al.*, 2012 ; Goetz et Ghedira, 2012) .

## 1.2. *Eucalyptus globulus* : données botaniques

L'*Eucalyptus* est un arbre qui peut pousser plus haut que 20 m et possède un tronc lisse et cendré (Figure 1.2 c).

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 1.2a). 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 1.2d), sont solitaires à l'aisselle des feuilles.

Les fruits (**Figure 1.2e**) 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**).

### 1.3. 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 (**Ait 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**).

### 1.4. Classification botanique

*Eucalyptus globulus* (**Figure 1.1**) appartient à la famille des Myrtacées. Le genre *Eucalyptus* compte plus de 500 espèces (**Brooker et Kleinig, 2004 ; Leicach et al., 2012**).

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

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



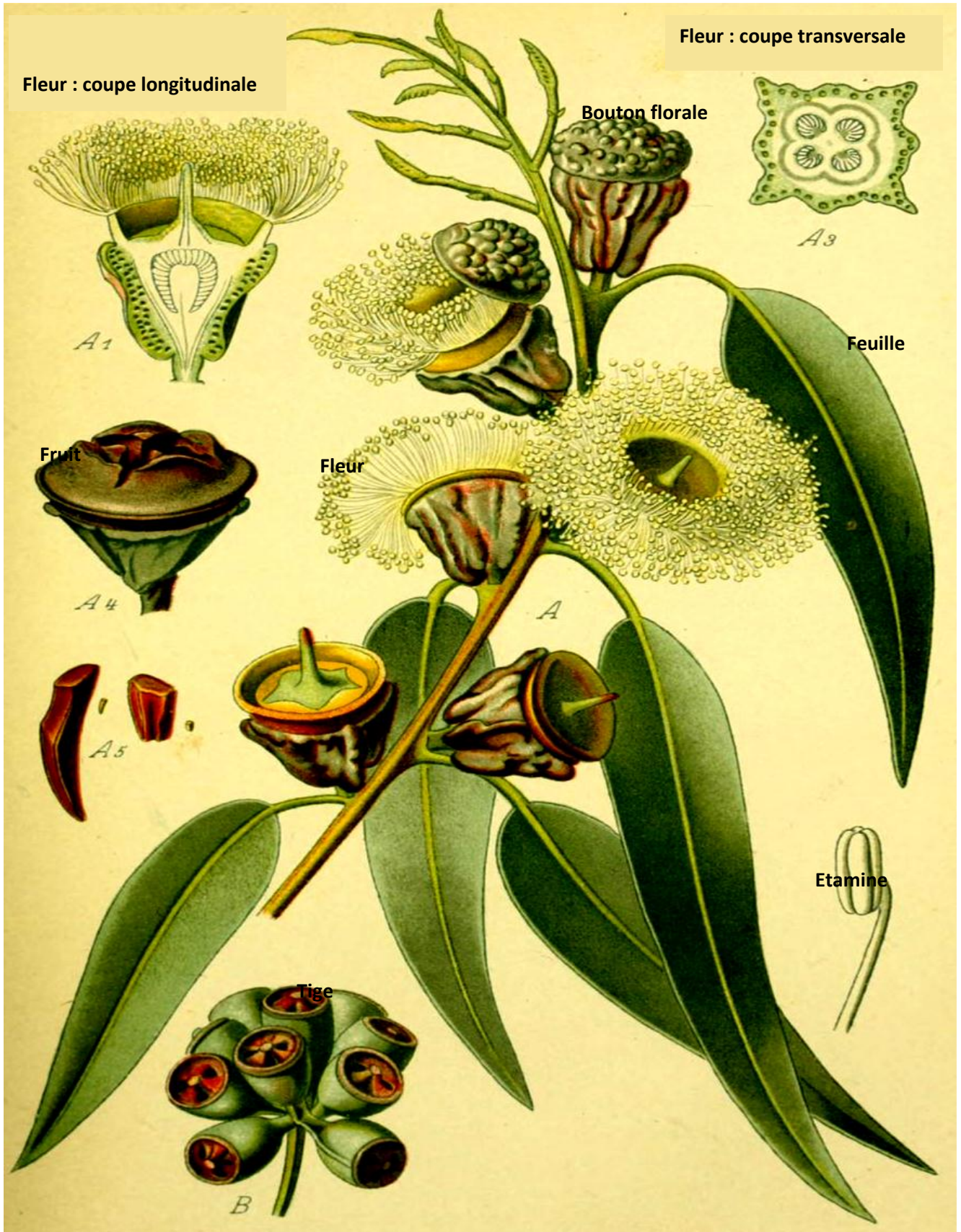
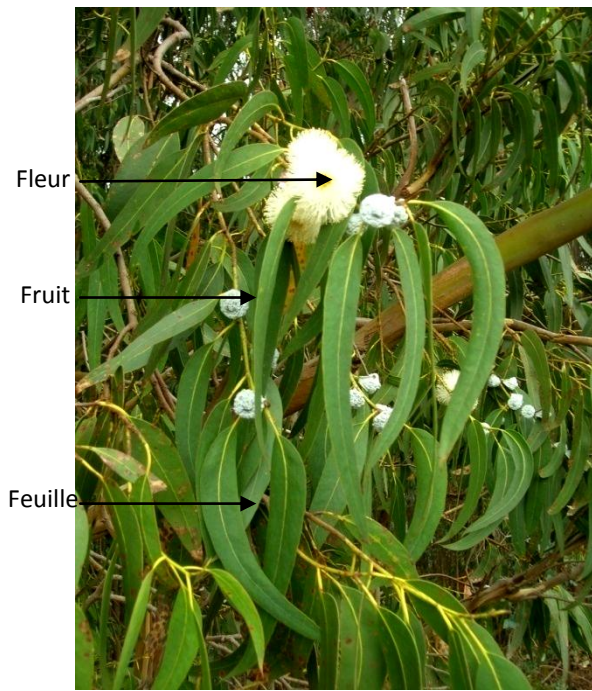


Figure 1. Illustration de la partie aérienne d'*Eucalyptus globulus*.  
([www.images.google.fr](http://www.images.google.fr)).





a. Feuille, fruit et fleur



b. Port d'un arbre isolé



c. Tronc



d. Fleur



e. Jeunes fruits



g. Pousse de jeune plante

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

### 1.5. Origine et répartition géographique

*Eucalyptus globulus* est spontané 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 (**Ait Youssef, 2006 ; Louppe, 2008**).

### 1.6. 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 1.2 fg**), 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**).

### 1.7. 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. 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**).

### 1.8. 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* 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**).

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**).

## 1.9. Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*

### 1.9.1. 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**).

### 1.9.2. 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**).

### 1.9.3. 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**).

### 1.9.4. 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 (Coppén, 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 anti-oxydantes 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**).

# Matériel et Méthodes

Notre étude s'est étalée sur une période de 3 mois (Avril-Juin 2015). Les différentes expérimentations ont été effectuées au niveau des structures suivantes :

- Service de Microbiologie Alimentaire du Laboratoire d'Hygiène de Blida pour l'étude de l'activité antifongique et antibactérienne de l'huile essentielle (HE) de l'eucalyptus *in vitro*.
- Service de Pharmaco-toxicologie de l'Unité Antibiotical-Saidal de Médéa, dans le but d'asseoir le pouvoir anti-inflammatoire de l'huile aromatique *in vivo*.
- Centre de Recherche en Analyses Physico-chimiques (CRAPC) d'Alger afin de déterminer la composition chimique de l'HE et son profil chromatographique.

## 2.1. Matériel végétal

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.

## 2.2. Matériel animal

Les différentes analyses pharmacologiques ont été effectuées sur des souris de souche NMRI provenant de l'animalerie de l'unité Antibiotical de Saidal (Médéa). Au total, une vingtaine de souris, de sexe mâle et femelle et dont le poids moyen 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.

## 2.3. Milieux de cultures et agents chimiques

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).

Et afin de mener une étude comparative du pouvoir antimicrobien de la fraction aromatique d'eucalyptus avec des produits de références, nous avons une solution antiseptique (Hexomedine à 0.1% (Biopharma, Alger) comme contrôle positif.

La carraghénine a été utilisée pour l'induction de l'œdème dans les pattes postérieures des souris.

### 2.4. Souches microbiennes

L'activité antibactérienne a été évaluée sur 5 souches bactériennes isolées cliniquement à partir des denrées alimentaires ou de prélèvements purulents des malades. Toutes les souches ont été isolées et identifiées au niveau du laboratoire d'hygiène de Blida à l'aide de galeries biochimiques miniaturisées.

Concernant les souches fongiques, nous avons utilisé 2 champignons filamenteux (moisissures) et 2 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
<b>Bactéries à Gram -</b>		<b>Levures</b>	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Alimentaire	<i>Candida albicans</i>	ATCC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Eau de puits	<i>Trichosporon</i> sp.	Infection cutanée
<i>Escherichia coli</i>	Eau de surface		
<b>Bactéries à Gram +</b>		<b>Moisissures</b>	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pus	<i>Aspergillus niger</i>	Infection cutanée
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pus	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Infection cutanée

ATCC: American Type Culture Collection.

## 2.5. Analyses chromatographiques de l'huile essentielle

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  $\mu\text{m}$ , 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<sup>-1</sup>. La température de la colonne est programmée de 45 à 240 °C à raison d'une montée de 2 °C.min<sup>-1</sup>. 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'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<sub>c</sub>** : Temps de rétention du composé ;

**TR<sub>n</sub>** : Temps de rétention de l'alcane à n atomes de carbone élué avant le composé ;

**TR<sub>(n+1)</sub>** : Temps de rétention de l'alcane à n+1 atomes de carbone élué après le composé.

## 2.6. 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.

### 2.6.1. 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 2.1**), 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 mg 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.

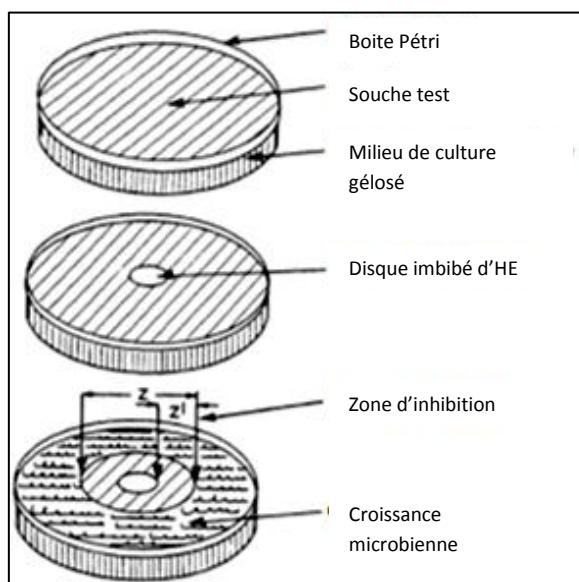
Aussi et pour chaque souche microbienne, des témoins positifs ont été réalisés en appliquant, dans les mêmes conditions citées précédemment, des disques d'ATB qui vont servir comme référence afin de comparer leur pouvoir antibactérien avec notre échantillon d'HE.

### 2.6.2. Méthode en phase vapeur (Microatmosphère)

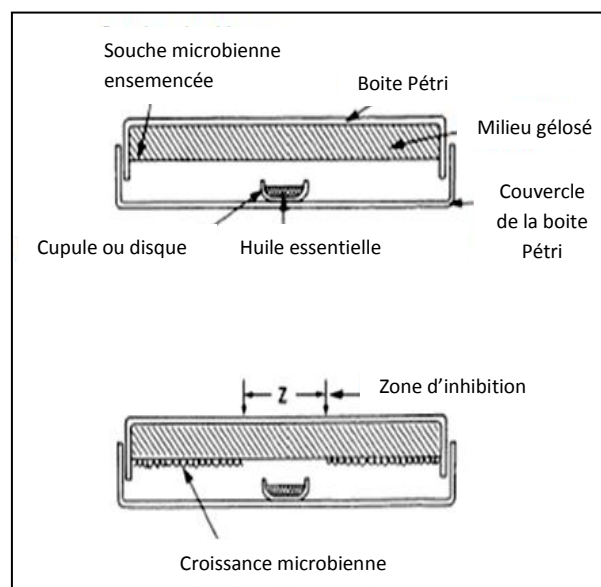
Nous avons utilisé cette méthode dans le but d'apprécier les propriétés de la phase volatile de l'HE. Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase gazeuse (**Figure 2.2**) sont encore peu nombreux (**Tyagi et Malik, 2011**).

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 mg d'HE est déposée sur un disque de papier filtre de 20 mm de diamètre. Dans le 2<sup>ème</sup> essai, un disque de 40 mm a été imprégné par 40 mg d'HE alors que pour le dernier, un disque de 60 mm a été chargé par 60 mg 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.

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.



**Figure 3.** Illustration de la méthode de l'aromatogramme (Zaika, 1988).



**Figure 4.** Illustration de la méthode de Microatmosphère (Zaika, 1988).

## 2.7. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire aigue

### 2.7.1. 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).

### 2.7.2. Mode opératoire :

Plusieurs doses en HE ont été testées (1%, 0.1% et 0.01%) 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 4 souris. Le 1<sup>er</sup> 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<sup>®</sup> (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 aiguë est faite par injection de 0.1 mL d'une solution de carraghénine (0.05%) 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) ;

$\Delta E$  : Différence entre la moyenne des poids des pattes (droite - gauche) pour le lot essai (HE ou Témoin +).

### 2.7.3. Etude statistique :

Les résultats sont exprimés en moyenne du poids des PPG  $\pm$  écart-type. La signification statistique a été déterminée au moyen du test d'analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie par le test *post-hoc* de Fisher pour comparaison par paire.  $P < 0.05$  a été considérée comme différence significative. L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica (version 8, StatSoft, USA).

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

#### 3.1.1. Propriétés organoleptiques

Les résultats du contrôle des paramètres organoleptiques l'HE d'*Eucalyptus globulus* sont colligés dans le **Tableau II**. Ces paramètres sont en conformité avec les normes en vigueur.

**Tableau II.** Paramètres organoleptiques de l'essence d'*Eucalyptus globulus*.

	Paramètres	Résultats	Normes AFNOR (2000)
<b>Propriétés organoleptiques</b>	Aspect	Liquide et limpide	Liquide et limpide
	Couleur	Jaune clair	Jaune
	Odeur	Camphrée	Camphrée voir balsamique

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

#### 3.1.2. Composition chimique

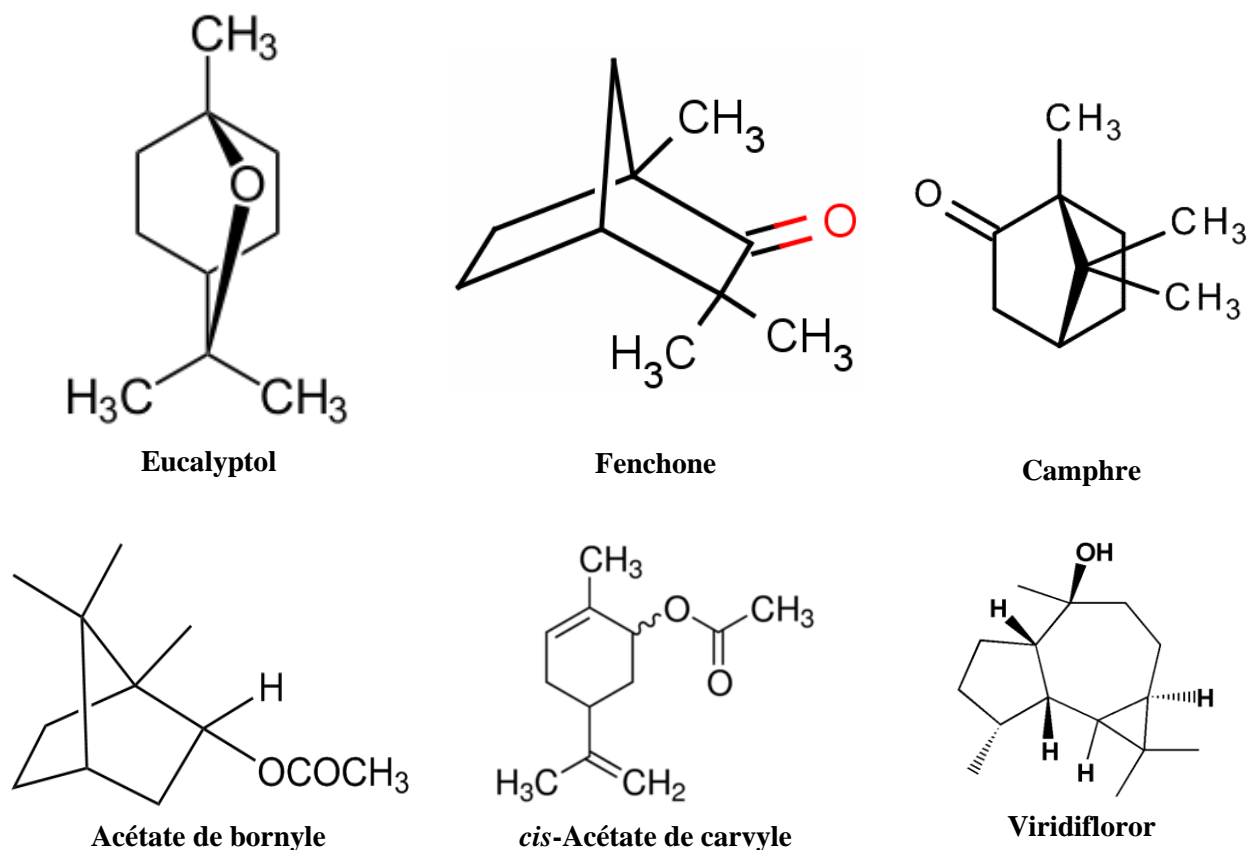
Les résultats de la composition chimique de l'HE d'*E. globulus*, accomplie par CG-SM, sont rapportés dans le **Tableau III**. Les différents composés ont été listés selon leur Indices de Rétention (IR).

Au total, 36 composés ont été identifiés dans cette essence aromatique. A la lecture du profil chromatographique obtenu, il apparaît 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 3.1**). Deux autres 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%.

**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	%
<b>Monoterpènes hydrocarbonés</b>			<b>5,48</b>
1	Tricycléne	926	0,1
2	$\alpha$ -Pinène	926	0,94
3	Camphène	942	2,39
4	$\beta$ -Pinène	994	0,16
5	$\delta$ -Carène	1101	1,08
6	Terpinolène	1120	0,81
<b>Monoterpènes Oxygénés</b>			<b>69,69</b>
7	1,8-Cinéole	1027	15,71
8	$\alpha$ -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	Cyclosativéne	1368	0,4
<b>Sesquiterpènes hydrocarbonés</b>			<b>4,31</b>
18	$\alpha$ -Cubebène	1354	0,06
19	$\alpha$ -Copaène	1376	0,44
20	<i>E</i> -Caryophyllène	1425	0,12
21	Aromadendrène	1439	0,18
22	$\beta$ -Selinène	1485	0,27
23	$\alpha$ -Selinène	1494	0,13
24	$\alpha$ -Muuroène	1499	0,16
25	$\gamma$ -Cadinène	1513	0,38
26	$\delta$ -Cadinène	1524	1,65
27	$\alpha$ -Calacorène	1542	0,24
28	Selina-3,7(11) dien	1542	0,41
29	Cadalène	1674	0,27
<b>Sesquiterpènes Oxygénés</b>			<b>4,36</b>
30	Oxyde de Caryophyllène	1570	0,46
31	Ledol	1565	0,52
32	Veridiflorol	1590	2,88
33	$\alpha$ -Muuroolol	1645	0,5
<b>Autres Composés Oxygénés</b>			<b>7,92</b>
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).



**Figure 5.** 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 élevée, 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -pinène (14.5%),  $\alpha$ -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.

Pays	Abondance relative (%)						
	Mulyaningsih <i>et al., 2010</i>	Goldbeck <i>et al., 2014</i>	Vilela <i>et al.</i> , 2009	Elaissi <i>et al., 2012</i>	Manika <i>et al., 2013</i>	Kumar <i>et al., 2012</i>	Tyagi et Malik, 2011
	Allemagne	Brésil	Brésil	Tunisie	Inde	Inde	Inde
Composés							
$\alpha$ -Pinène	1.53	8.30	-	12.0	1.2	-	4.2
$\beta$ -myrcène	-	-	0.49	-	0.1	1.88	1.5
$\alpha$ -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
<b>1,8-Cinéole</b>	<b>14.55</b>	<b>71.05</b>	<b>89.95</b>	<b>53.7</b>	<b>63.7</b>	<b>33.62</b>	<b>45.4</b>
$\gamma$ -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
$\alpha$ -Terpinéol	0.85	0.79	0.62	3.3	0.9	4.72	3.6
Géranol	Trace	-	-	-	0.3	0.24	0.1
<b>Aromadendrène</b>	<b>31.17</b>	-	-	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

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).

### 3.2. 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, 3 bactéries à Gram – et 2 à Gram + ainsi que 2 souches de levure et 2 champignons filamenteux ont été utilisées dans ce test. Les résultats de ce screening antimicrobien sont consignés dans les **Tableaux Vet 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.

#### 3.2.1. 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 17 et 20 mm pour le moyen dosage. De plus, *Staphylococcus epidermidis* a manifesté une grande sensibilité (DZI = 50 mm) à la dose de 60mg/disque d'HE. A noter aussi que cette activité antibactérienne est « Dose-dépendante » pour la majorité des souches testées (**Figure 3.2**). En comparaison avec le contrôle positif (Hexomedine), l'HE a présenté une efficacité inférieure dans l'inhibition des germes bactériens, excepté pour *E. coli*. En revanche, aucune conclusion ne peut être dégagée de nos résultats par manque de répétition et un spectre étroit de germes testés.

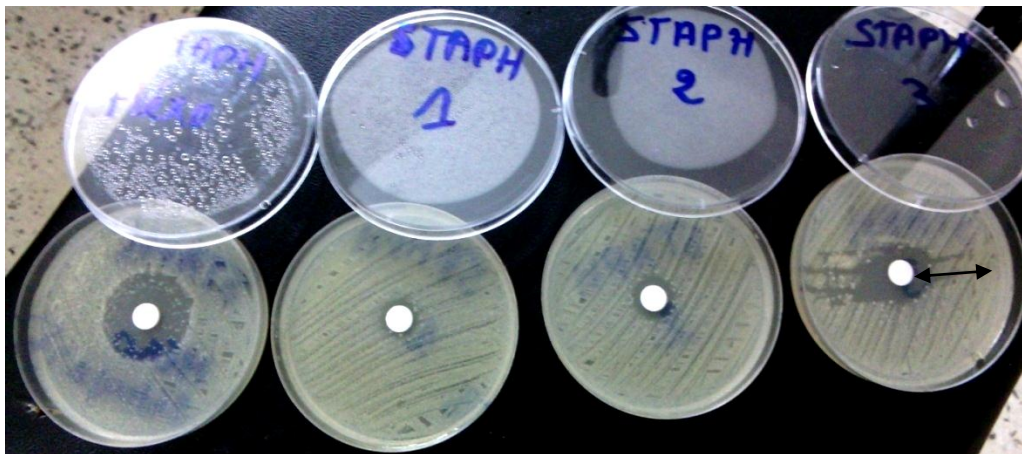
**Tableau V.** Activité antibactérienne *in vitro* de l'essence aromatique d'*Eucalyptus globulus*.

Souches microbienne	DZI (mm)						Antiseptique HEX
	Aromatogramme			Microatmosphère			
	Quantité HE (mg/disque)						
<b>Bactéries à Gram -</b>	20	40	60	20	40	60	
<i>Salmonella typhimurium</i>	10	15	30	-	-	-	35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	13	15	-	-	-	20
<i>Escherichia coli</i>	12	12	29	-	-	-	20
<b>Bactéries à Gram +</b>							
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15	20	50	-	-	-	55
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	17	23	-	-	-	34

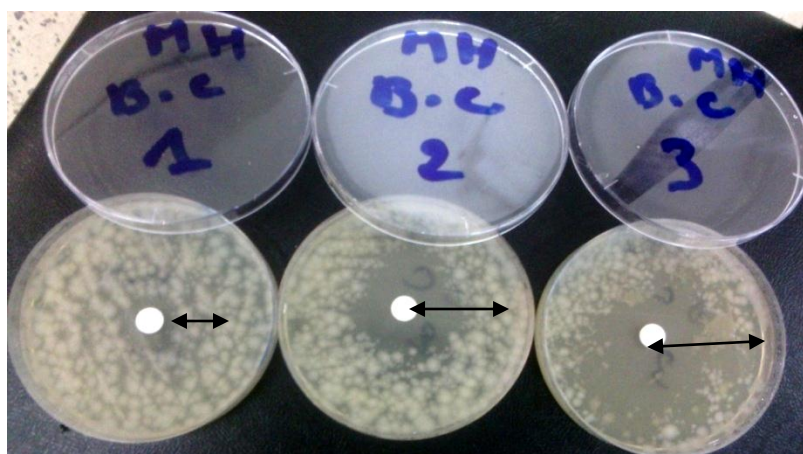
(-) Aucune zone d'inhibition ; DZI : Diamètre de la Zone d'Inhibition (diamètre du disque 9 mm a été inclus dans le calcul de la DZI) ; HE : Huile Essentielle ; HEX : solution antiseptique d'Hexomedine (0.1%).

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 ; Elaïssi *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 (Zaïka, 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 24 et 31 mm pour la dose la plus élevée, ce qui est largement supérieur aux valeurs obtenues avec l'Hexomedine, une solution antiseptique prise comme contrôle positif, qui n'a présenté aucun pouvoir inhibiteur *in vitro*. En revanche,



a) *Staphylococcus aureus*



b) *Staphylococcus epidermidis*

**Figure 6.** Aromatogramme de quelques souches bactériennes.

En ce qui concerne les champignons filamenteux, encore appelé moisissures, des résultats moins reluisants ont été obtenus pour les deux souches étudiées où aucune zone d'inhibition n'a

été enregistrée et ce pour les différentes doses d'HE testées. La même constatation a été faite pour le contrôle positif.

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

Souches fongiques	DZI (mm)						Antiseptique HEX (40 µl)
	Aromatogramme			Microatmosphère			
	Quantité HE (mg/disque)						
Levures	20	40	60	20	40	60	
<i>Candida albicans</i> (ATCC)	-	14	24	-	-	-	-
<i>Trichosporon</i> sp.	13	25	31	-	32	55	-
Moisissures							
<i>Aspergillus niger</i> (An1)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-	-

(-) 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 ; HEX : solution antiseptique d'Hexomédine (0.1%) (Biopharm, Alger, Algérie).

Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité anti-candidosique des métabolites terpéniques des espèces du genre *Eucalyptus*. Nos résultats sont en concordance avec ceux de plusieurs travaux antérieurs (**Daroui-Mokaddem, 2012 ; Elaïssi 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 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. Une revue de littérature fait apparaître que les essences aromatiques riches en composés oxygénés sont dotées d'un fort pouvoir antimicrobien. Les alcools sont d'ailleurs reconnus pour exercer un effet plutôt bactéricide que bactériostatique (Dorman et Deans, 2000).

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 tiennent 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 *E. coli* (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).

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 (Hyldgaard *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.

**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 (Année)	Deans et Ritchie (1987)	Pattnaik <i>et al.</i> (1997)	Cimanga <i>et al.</i> (2002)	Prabuseenivasan <i>et al.</i> (2006)	Đakov <i>et al.</i> (2011)	Elaissi <i>et al.</i> (2012)	Proenza <i>et al.</i> (2013)
Pays	Grande- Bretagne	Inde	Congo	Inde	Serbie	Tunisie	Cuba
<b>Gram +</b>							
<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	-	-
<b>Gram -</b>							
<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.

### 3.2.2. 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 Vet VI**.

Eu égard des résultats obtenus, il apparaît clairement que l'essence d'eucalyptus officinal n'a aucun pouvoir inhibiteur en phase vapeur, excepté la souche levuriforme de *Trichosporon* sp. où les DZI obtenus étaient de l'ordre de 32 et 55 mm pour les doses de 40 mg et 60 mg/disque d'HE, respectivement. De plus, le contrôle positif a exhibé un pouvoir antibactérien intéressant comparativement à notre échantillon d'HE. Afin de dégager d'amples informations sur l'efficacité du pouvoir antimicrobien de la phase vapeur de l'essence, il serait intéressant de faire des répétitions et compléter cette étude par une large de germes à tester.

Des résultats contradictoires aux nôtres (**Bachir Raho et Benali, 2012**) ont été rapportés par plusieurs travaux. **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 possède une grande action inhibitrice sur la majorité des germes testés.

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.

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 terpénoïdes 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.

### 3.3. 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** et la **Figure 3.3**.

**Tableau VIII.** Taux de réduction de l'inflammation dans les pattes postérieures gauches des souris.

Traitement	Dose	Poids PPG (m ± ET)	Poids PPD (m ± ET)	% Réduction œdème
T-	-	208.25 ± 17.72 <sup>B</sup>	124.00 ± 12.19	-
HE	1%	194.50 ± 20.20 <sup>AB</sup>	116.75 ± 21.26	1.98
HE	0.1%	215.25 ± 25.85 <sup>B</sup>	131.75 ± 14.37	6.72
HE	0.01%	203.75 ± 06.84 <sup>AB</sup>	126.25 ± 05.61	9.65
T+	75 mg/kg	178.75 ± 27.30 <sup>A</sup>	120.00 ± 13.19	27.94

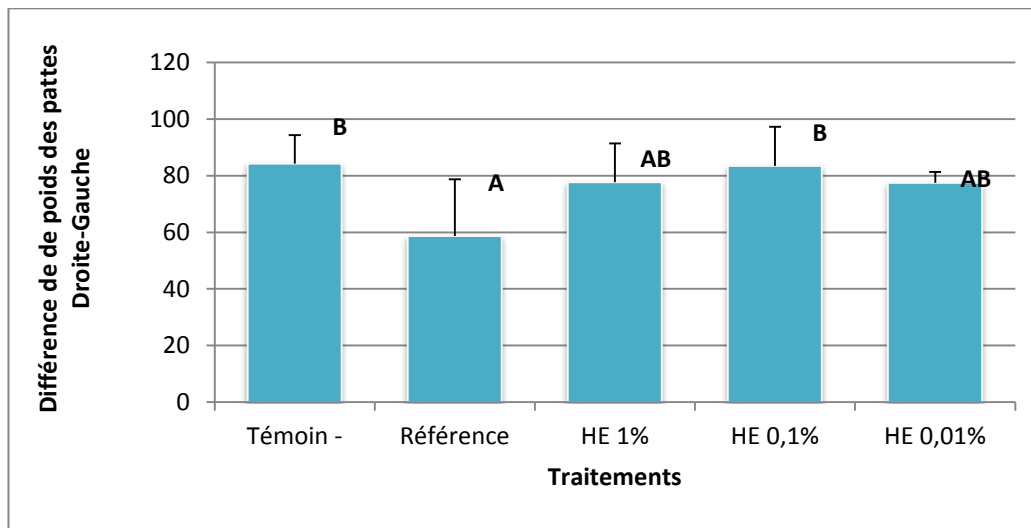
T<sup>-</sup> : Témoin négatif (eau physiologique) ; T<sup>+</sup> : Témoin positif (Clofenal<sup>®</sup>, 75 mg/Kg) ; PPG : Poids (mg) des Pattes Postérieures Gauches ; PPD : Poids (mg) des Pattes Postérieures Droites ; HE : Huile Essentielle ; m ± ET : Moyenne ± Ecart-Type.

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 le test de Fisher LSD de comparaison par paires.

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire sont rapportés dans le **Tableau VIII** qui présente les variations du pourcentage de réduction de l'œdème (pattes postérieures gauches 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 (208 mg).

Par ailleurs, le calcul du pourcentage de réduction de l'œdème a révélé que le lot traité avec le médicament anti-inflammatoire (contrôle positif) est celui qui a présenté le taux le plus élevé (27.94%). Le lot traité avec l'HE, a à 0.01%, présenté un taux de réduction d'œdème (9.65%) statistiquement comparable ( $P > 0.05$ ) à celui du lot Témoin +. En revanche et avec les autres lots traités avec l'HE, la réduction de l'inflammation était faible avec une différence significative à celui du contrôle positif.





**Figure 3.3.** Activité anti-inflammatoire aiguë de l'essence d'eucalyptus révélée par la différence de poids des pattes des animaux.

T<sup>-</sup> : Témoin négatif (eau physiologique, 0.9% NaCl) ; T<sup>+</sup> : Témoin positif (Clofenal<sup>®</sup>, 75 mg/Kg) ; HE : Huile Essentielle.

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 le test de Fisher LSD de comparaison par paires.

Eu égard des résultats obtenus, il apparaît clairement que la dose la plus efficace de l'HE dans la réduction de l'inflammation aiguë est la plus faible. Il est d'ailleurs reconnu que les molécules terpéniques des huiles aromatiques présentent un certain pouvoir irritant vis-à-vis des muqueuses et des tissus cutanés, d'où la nécessité de les administrer à faibles doses.

D'autres renseignements supplémentaires sont rapportés dans la **Figure 3.3** qui rapporte la différence de poids des pattes gauche-droite chez les souris des différents lots.

Une fois encore, le contrôle positif est le lot qui a présenté une différence de poids la plus faible (58.75 mg) alors que le contrôle négatif est le lot qui a exhibé une différence la plus élevée (84.25 mg). Concernant les lots traités avec notre échantillon d'huile aromatique, c'est toujours la dose la plus faible en HE qui a été la plus efficace dans la réduction de l'œdème, *in vivo*, avec une différence de poids de l'ordre de 77.5 mg, statistiquement identique (**Annexe 2**) à celui du contrôle positif (test ANOVA suivi par un test de comparaison par paire de Fisher au risque de 5%).

De nombreux végétaux sont connus pour leur activité anti-inflammatoire, c'est le cas en particulier de l'eucalyptus officinal (**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. Si la mélisse et la verveine sont peu utilisées dans ce cadre à cause de leur prix, genévrier et eucalyptus font partie des classiques de l'aromathérapie antalgique et anti-inflammatoire (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 sub-aigüe pourra être estimée via le test de granulome au pellet de coton (Yu *et al.*, 2013).

1. **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.
2. **Abyaneh, M. R., & Rai, M. (2013).** *Antifungal Metabolites from Plants*. Springer-Verlag, Berlin, Allemagne.
3. **AFNOR. (2000).** Recueil des Normes Françaises : Huiles Essentielles. Editions AFNOR, Paris, France.
4. **Ait Youssef, M. (2006).** *Plantes médicinales de Kabylie*, édition Ibispress, Paris, France.
5. **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.
6. **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.
7. **Baudoux, D. (2000).** *L'aromathérapie - Se soigner par les huiles essentielles*. Edition Atlantica, France.
8. **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.
9. **Behrbohm, H., Kaschke, O., & Sydow, K. (1995).** Effect of the phytogetic secretolytic drug Gelomyrtol forte on mucociliary clearance of the maxillary sinus. *Laryngo-rhino-otologie*, 74(12), 733-737.
10. **Botineau, M. (2010).** *Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs*. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France.
11. **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.
12. **Boullard, B. (2001).** *Plantes médicinales du monde : Croyances et réalités*. édition De Boeck Secundair, Paris, France.
13. **Brooker, M. I. H., & Kleinig, D. A. (2004).** *Field guide to Eucalypts*, Northern Australia (2<sup>nd</sup> ed.), Bloomings Books, Melbourne, Australie.
14. **Bruneton, J. (1999).** *Huiles essentielles. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Edition Tec & Doc, 3<sup>ème</sup> édition, Lavoisier, Paris, France.
15. **Burt, S. (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253.

16. **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.
17. **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.
18. **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 condidose 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.
19. **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.
20. **Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De & 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.
21. **Coppen, J. J. W. (2002).** *Eucalyptus*: The genus *Eucalyptus*. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles. Volume 22. Edition Taylor & Francis, Londres, Grande-Bretagne.
22. **Đakov, T. (2011).** Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(3), 277-284.
23. **Daroui-Mokaddem, H. (2012).** Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniium olusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asterarceae). Thèse de Doctorat en Science, option : Biochimie appliquée, Département de Biochimie, Université Badji-Mokhtar de Annaba, Algérie.
24. **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.
25. **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.
26. **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.

27. **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.
28. **ESCOP, European Scientific Cooperative on Phytotherapy. (2003).** ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. Edition Thiem Verlag, Stuttgart, Allemagne.
29. **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-rhino-otologie*, 76(1), 23-27.
30. **Festy, D., Pacchioni, I. (2014).** Guide de poche d'aromathérapie: 41 huiles essentielles pour se soigner en toute simplicité. Editions Quotidien Malin, France.
31. **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.
32. **Gilly, G. (1997).** Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse: botanique, culture, chimie, production et marché. Editions L'Harmattan, Paris, France.
33. **Goetz, P., & Ghedira, K. (2012).** Phytothérapie anti-infectieuse. Springer-Verlag, Paris, France.
34. **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.
35. **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.
36. **Inouye, S., & Abe, S. (2007).** Nouvelle approche de l'aromathérapie anti-infectieuse. *Phytothérapie*, 5(1), 2-4.
37. **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.
38. **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.

39. **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.
40. **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.
41. **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.
42. **Laird, K., & Phillips, C. (2012).** Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?. *Letters in Applied Microbiology*, 54(3), 169-174.
43. **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.
44. **Lis-Balchin, M. (2006).** Aromatherapy science: A guide for healthcare professionals. Pharmaceutical Press, Londres, Grande-Bretagne.
45. **Louppe, D. (2008).** PROTA : Ressources végétales de l'Afrique tropicale. Backhuys Publishers, Wageningen, Pays-Bas.
46. **Martinetti P. (2013).** Mon guide des huiles essentielles. Edition Fernand Lanore, France.
47. **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.
48. **Medeiros, K. C., Monteiro, J. C., Medeiros, I. A., Silva, B. A., & Piuevam, 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.
49. **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.
50. **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.



51. **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.
52. **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.
53. **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.
54. **Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., & Ignacimuthu, S. (2006).** *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 39.
55. **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.
56. **Sallé, J. L. (1991).** *Le totum en phytothérapie, approche de la phyto-biothérapie*. Edition Frison-Roche, Paris, France.
57. **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.
58. **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.
59. **Shieh, J. C. (1996).** Yields and chemical components of essential oils in *Eucalyptus camaldulensis* leaves. *Taiwan Journal of Forest and Science*, 11, 149–157.
60. **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.
61. **Silvant C. (2015).** *L'Aromathérapie: La nature au service de l'humanité*. Editions Publibook, Paris, France.
62. **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.
63. **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.
64. **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.



## Références bibliographiques

---

65. **Tassin, J., Missamba-Lola, A. P., & Marien, J. N. (2011).** Biodiversité des plantations d'eucalyptus. *Bois et forêts des tropiques*, 309(3), 27-35.
66. **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.
67. **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.
68. **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.
69. **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.
70. **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.
71. **Wei, R. P., & Xu, D. (2003).** *Eucalyptus Plantations*. World Scientific, Chine.
72. **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.
73. **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.
74. **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.
75. **Zaika, L. L. (1988).** Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *Journal of Food Safety*, 9(2), 97-118.

En égard de l'importance des huiles aromatiques en phytothérapie, il nous a semblé nécessaire, voire primordial, de consacrer une étude complète pour asseoir les activités antimicrobienne et anti-inflammatoire de l'essence aromatique d'un arbre à parfum (*Eucalyptus globulus*), en vue de la valoriser comme ingrédient actif à visée thérapeutique.

A cet effet, l'essence aromatique de l'eucalyptus officinal, extraite à échelle industrielle par entraînement à la vapeur d'eau, a été analysée par techniques chromatographique. Trois composés majoritaires dominent 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 des souches bactérienne et fongique. En phase liquide, l'essence s'est avérée efficace dans l'inhibition de la croissance des bactéries à Gram +. Cette activité antimicrobienne est « dose-dépendante » mais paraît moins supérieure à l'Hexomedine (antiseptique). En phase vapeur, des résultats moins reluisants ont été obtenus car aucune zone d'inhibition n'a été constatée, excepté la souche de *Trichosporon* sp.

L'autre volet abordé, lors de cette étude, était la détermination du pouvoir anti-inflammatoire aigue de la fraction aromatique de l'eucalyptus officinal. *In vivo*, cette étude a établi une efficacité de l'huile essentielle comparable au contrôle positif (médicament anti-inflammatoire), uniquement à la dose la plus faible.

Comme perspectives, il serait intéressant d'apprécier l'action antimicrobienne 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.

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 d'ingrédient thérapeutique. 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.

## Appareillage, Verrerie et Milieux de culture

---

### Appareillage

- Agitateur
- Bain marie
- Etuves bactériologiques
- Incubateur
- Portoir de tubes à essai
- Réfrigérateur
- Balance de précision
- Microscope optique
- Autoclave
- Lecture de zones d'inhibitions

### Verrerie

- Anse de platine
- Bec bunsen
- Flacons stériles
- Disques vierges (9 mm)
- Boîtes Pétri stériles
- Pipettes Pasteurs
- Ecouillons stériles
- Tubes à essai stériles
- Pincettes de laboratoire
- Disques en papier
- Papier aluminium
- Etiquettes

### Milieu de Culture et Réactifs

- Carraghénine
- Eau physiologique (0.9%)
- Gélose Sabouraud + Chloramphénicol
- Gélose Muller-Hinton
- Solution Hexomédine (0.01%)



**Figure 8** : lot des souris utilisées



**Figure 9** : ablation des pattes





Figure 10 : Balance

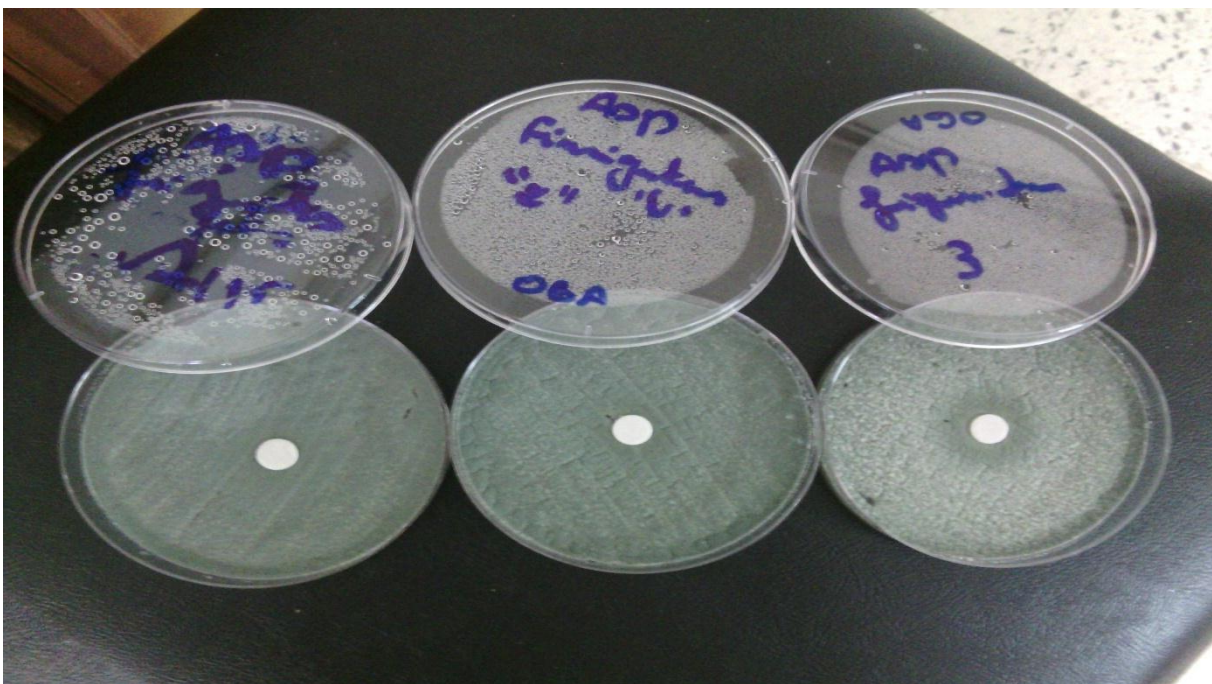


Figure 11 :Aromatogramme de *Aspergillus fumigatus*

## Etude Statistique

### Activité anti-inflammatoire topique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* in vivo

Analyse de Variance (ANOVA) à sens unique suivie par un test de comparaison par paire de Fisher (5%)  
(Statistica, version 8.0, Stat Soft Inc. USA)

- **Résultats sont exprimés en P value**

(en rouge : différence Significative,  $P < 0.05$  ; en noir : différence non significative,  $P > 0.05$ )

LSD test; variable DPP (Spreadsheet122.sta) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 178,55, df = 15,000

	TRT	{1} - 84,250	{2} - 58,750	{3} - 77,750	{4} - 83,500	{5} - 77,500
1	T		0,016498	0,501993	0,937782	0,485952
2	R	0,016498		0,062667	0,019335	0,065813
3	HE 1%	0,501993	0,062667		0,551922	0,979240
4	HE 0,1%	0,937782	0,019335	0,551922		0,534984
5	HE 0,01%	0,485952	0,065813	0,979240	0,534984	

- **Résultats exprimés en groupes homogènes**

Les lots homogènes (aucune différence significative) ont été regroupés et lui ont été attribués des lettres alphabétiques identiques.

LSD test; variable DPP (Spreadsheet122.sta) Homogenous Groups, alpha = ,05000 Error: Between MS = 178,55, df = 15,000

	TRT	DPP - Mean	1	2
2	R	58,75000		A
5	HE 0,01%	77,50000	A	B
3	HE 1%	77,75000	A	B
4	HE 0,1%	83,50000	B	
1	T	84,25000	B	