

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de
Magister
En Biologie**

Option : Alimentation et Technologie Alimentaire

Thème

*Activités biologiques des huiles essentielles des feuilles et du
fruit d'une
plante médicinale Eucalyptus globulus*

Préparé par : M^{me} BEY –OULD SI SAID ZAKIA

Membres du jury :

Président: M^r MADANI KHOUDIR.

Professeur à l'UAMB.

Examineur: M^r BEKDOUCHE FARID.

Maître de conférences A à l'UAMB.

Examineur :M^{me} AIT BRAHAM LEILA

Maître de conférences A à l'UAMB

Directrice: M^{me} BOULEKBACHE-MAKHLOUF LILA. Maître de conférences A à l'UAMB.

2013-2014

Remerciements

*En premier lieu et avant tout je tiens à remercier **DIEU** le tout puissant qui m'a donné le courage, la patience et la force de terminer ce travail.*

*Je voudrais commencer par remercier très chaleureusement ma directrice de thèse, **Mme Boulekbache-Makhlouf L.** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de technologie alimentaire, pour son aide, et sa disponibilité. Ses conseils avisés ont toujours été très constructifs et m'ont permis de toujours bien avancer dans la thèse, je tiens à la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée ce qui m'a permis de pleinement m'épanouir au sein du laboratoire et de développer mes recherches sereinement de façon encadrée mais autonome.*

*Je remercie très sincèrement **Mr Madani K**, Professeur à l'UAMB, d'avoir accepté de présider le jury, **Mr Bekdouche F.** et **Mme Brahmi L**, maitres de conférence « A » à l'UAMB d'avoir l'amabilité d'accepter d'examiner mon travail.*

*J'exprime ma reconnaissance envers **Mr Rezgui F**, professeur a l'UAMB et Melle **Hassiba**, de m'avoir aidé dans l'extraction des huiles essentielles.*

*Je tiens à remercier **Sadia, Salima** et **saida** ingénieurs de laboratoire de technologie alimentaire pour leur assistance, ainsi que **M^{me} kadji, M^r Boukhalfa, M^r Nabet** pour leur conseils. Mes remerciements vont a **Hayet**, et son ami **Hocine, Naima** et **Kenza**.*

En terminant, je souhaite démontrer ma plus sincère gratitude à toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Merci à tous !

Dédicaces

*Je voudrais dédier et remercier mon mari **Said**, mon fils, **Adam**, et à ma fille **Nada** qui ont survécu aux aléas d'une femme et d'une mère préoccupée et souvent de mauvais caractère surtout en phase finale. L'achèvement de cette étude n'aurait pas été possible sans leur amour inconditionnel, leur soutien et leur patience.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude envers mes **parent** qui m'ont toujours encouragé et soutenus, ainsi qu'à mon frère **Hakim** et mes sœurs ; Zahra, Samia, Lila, Nacera, et malika.*

Que Dieu vous garde pour moi !

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique.

BHA: Butyl Hydroxy Anisol.

BHT: Butyl Hydroxy Toluène.

CI₅₀: Concentration à 50 % d'inhibition.

CMB: Concentration Minimale Bactéricide.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

DPPH: 2,2-DiPhényl-1-Picryl Hydrazyle.

F D A : Food and Drug Administration

FL: feuilles

FT: Fruit.

GRAS: Generally recognized as safe

HEs: Huile essentielle

PR: Pouvoir réducteur

UFC: Unité Formant Colonie.

ZI: Zone d'Inhibition.

Liste des figures

Figure 1: Photographie des feuilles et du fruit de <i>Eucalyptus globulus</i>	5
Figure 2: Structure chimique de l'eucalyptol.....	6
Figure 3: Effets des huiles essentielles de <i>E. globulus</i> sur la croissance de <i>Candida albicans</i> ..	9
Figure 4: Photographie des différents types de glandes sécrétrices des huiles essentielles	12
Figure 5: Schéma du dispositif d'hydrodistillation	12
Figure 6: Schéma de l'appareil d'entraînement à la vapeur d'eau	13
Figure 7: Schéma du procédé d'hydrodiffusion.....	13
Figure 8: Extraction des huiles essentielles par micro-ondes	15
Figure 9: Répartition de la production mondiale des HEs durant l'année 2008	16
Figure 10 : Exemples de monoterpènes	20
Figure 11: Exemples de sesquiterpènes	20
Figure 12 : Exemples de composés aromatiques	21
Figure 13: Images au microscope électronique à balayage de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , avant (A) et après traitement (B) avec de l'huile essentielle d'origan à 0,2 % (100 x).....	24
Figure 14 : Aspect des cellules de <i>Costridium perfringens</i>) traitées (B) ou non (A) par des huiles essentielles	24
Figure15 : Mécanisme d'oxydation des lipides	28
Figure 16 : Schéma général du travail expérimental	36
Figure 17: Photographie du dispositif utilisé pour l'extraction des H.E par hydrodistillation ...	37
Figure 18: Photographie montrant la séparation des huiles essentielles par décantation.....	37
Figure 19: Structure du DPPHet le mécanisme de sa réduction par un antioxydant	39
Figure 20: Photographie montrant la réduction de la solution DPPH.....	40
Figure 21: Photographie montrant la réduction du fer ferrique en fer ferreux en présence des HE de <i>E. globulus</i>	42

Figure 22: Méthode diffusion sur disque (Bekka, 2009)	44
Figure 23 : Coupe transversale des feuilles d' <i>E. globulus</i>	46
Figure 24: Activité antiradicalaire du BHA (A) et des huiles essentielles des (feuilles et fruits) (B).....	50
Figure 25 : Cinétique du blanchissement du β - carotène.	53
Figure 26 : Inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique et du β -carotène par le BHA, et les HEs des feuilles et des fruits d' <i>E.globulus</i>	53
Figure 27: Pouvoir réducteur du BHA (A) et des huiles essentielles de <i>E.globulus</i> (B)	54
Figure 28: Photo graphie montrant l'action des HEs du fruit sur les bactéries testées	56
Figure 29: Photo graphie montrant l'action d'HE des feuilles sur les bactéries testées	57
Figure 30: Les zones d'inhibition des bactéries provoquées par les HEs du fruit et des feuilles d' <i>E. globulus</i>	58
Figure 31 : Comparaison des effets antibactériens des HEs avec ceux des antibiotiques	59
Figure32 : CMI et CMB des HEs des feuilles et du fruit.....	60

Liste des tableaux

Tableau I : Classification d'Eucalyptus globulus(Ghidira et <i>al.</i> , 2008).....	3
Tableau II : Produits préparés à base des huiles essentielles de <i>E. globulus</i>	6
Tableau III: Principaux composés des HEs de <i>E. globulus</i>	7
Tableau IV: Propriétés physiques de quelques huiles essentielles	17
Tableau V: Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles	22
Tableau VI: Les principales catégories d'additifs utilisés dans l'Union européenne	32
Tableau VII : Rendement des extractions des huiles essentielles	46
Tableau VIII: Composition des HE des feuilles et du fruit de <i>E. globulus</i>	47
Tableau IX: Valeurs des indices de réfraction et de la densité des HEs étudiées	49
Tableau X : Valeurs des IC 50 des échantillons	50
Tableau XI: Les concentrations requises pour inhiber 50% de la peroxydation.	53
Tableau XII: Les concentrations requises pour réduire 50% de fer	54

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Chapitre I. Eucalyptus globulus

I.1. Présentation botanique et géographique de la famille des Myrtaceae 3
I.2. Dénominations internationales..... 3
I.3. Situation botanique 3
I.4. Description botanique de la plante..... 4
I.5. Utilisations traditionnelles 5
I. 6. Les pays producteurs des huiles essentielles..... 5
I.7. Composition des huiles essentielles..... 6
I. 8. Propriétés pharmacologiques 8
I.9. Activités biologiques des huiles essentielles de *E. globulus* 7
I.9. 1. Activité antibactérienne et antifongique. 8
I.9.2. Activité antioxydante 9
I.9. 3. Activité antiparasitaire 10
I.9.4. Activité insecticide..... 10

Chapitre II. Les Huiles Essentielles

II. 1. Définition 11
II.2. Huiles Essentielles -Chémotypées (*H.E.C.T*)..... 11
II.3. Répartition et localisation..... 11
II. 4. Techniques d'extraction des huiles essentielles 12
II.4. 1. Les techniques conventionnelles 12
II.4. 1.1. L'hydrodistillation 12
II.4. 1.2. L'entraînement par la vapeur d'eau 13
II.4.1.3. L'hydrodiffusion (percolation) 13
II.4.1.4. L'expression à froid..... 14
II.4.1.5. Extraction par solvant..... 14
II.4.1.6. Enfleurage ou digestion 14
II.4.2. Les techniques nouvelles ou innovantes..... 14
II.4. 2.1. L'extraction assistée par microondes 14
II.4.2.2. L'extraction accélérée par solvants 15
II.4.2.3. Extraction par des solvants supercritiques..... 15
II. 5. Le marché mondial des huiles essentielles 16
II.6. Propriétés physiques 16
II.7. Critères de qualité des huiles essentielles chémotypées 17
II.8. Facteurs de variabilité des huiles essentielles..... 18

II.9. Les utilisations des huiles essentielles.....	19
II. 10. Composition chimique des huiles essentielles.....	19
II.11. Les monoterpènes.....	19
II.12. Les sesquiterpènes.....	20
II.13. Les composés aromatiques.....	20
II.14. Importance industrielle des terpénoïdes.....	21
II. 15. Rôles des huiles essentielles dans la plante.....	21
II.16. Activités biologiques des huiles essentielles.....	22
II.17. Les propriétés antioxydantes.....	22
II .18. Action antibactérienne.....	23
II.19. Action antifongique.....	23
II.20. Facteurs déterminant le degré de l'activité antimicrobienne des HEs.....	24
II.20.1. Méthodes d'évaluation d'activité antimicrobienne.....	25
II.20.2. L'effet de la matrice biologique.....	25
II.20. 3. Le type et la structure moléculaire des terpénoïdes.....	25
II.20.4. Le type des microorganismes ciblés.....	25
II.21. Effet Bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles.....	25
II.22. Toxicité des huiles essentielles.....	26

Chapitre III. Les Altérations Alimentaires et les Additifs

III.1. Les différentes origines des altérations alimentaires.....	27
III.2. Les altérations causées par l'oxydation lipidique.....	27
III. 2.1. Mécanisme d'oxydation des lipides.....	27
III. 3. Les altérations d'origine microbienne.....	29
III.3.1. Action des micro-organismes dans les aliments.....	29
III. 3.2. Moyens de prévention de ces altérations.....	29
III. 4. Les additifs alimentaires.....	30
III.4.1. Les antioxydants.....	31
III.4.2. Les conservateurs.....	32
III.5. Les effets négatifs des additifs alimentaires.....	33
III.6. Utilisation des huiles essentielles dans la conservation des denrées alimentaires.....	34

Chapitre IV. Matériels et Méthodes

IV. 1. Préparation de l'échantillon.....	36
IV. 2. Extraction de l'huile essentielle.....	36
IV. 3. Détermination de la composition chimique.....	38
IV. 4. Etude des propriétés physiques.....	38
IV.4. 1. Densité relative à 20°C.....	38
IV.4. 2. Indice de réfraction.....	39
IV. 5. Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles.....	39
IV. 5. 1. Effet antiradicalaire du radical DPPH•.....	39
IV. 5. 2. Test du blanchissement du β -carotène.....	41

IV. 5. 3. Test de la réduction du fer ferrique en fer ferreux	42
IV. 6. Activité antimicrobienne.....	43
IV. 6. 1. Origine et choix des souches microbiennes	43
IV. 6. 2. Préparation de l'inoculum.....	44
IV. 6. 3. Méthode de diffusion sur gélose	44
IV. 6. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	45
IV. 6. 5. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB).....	45
IV. 7. Analyse statistique	46

Chapitre V. Résultats et Discussion

V.1. Rendement en huile essentielle	46
V.2. Composition chimique des huiles essentielles des feuilles et du fruit	47
V.3. La densité et l'indice de réfraction	48
V.4. Activité antioxydante	49
V.4. 1. Piégeage du radical libre DPPH	49
V.4. 2. Test de blanchissement du β carotène	51
V.4. 3. Pouvoir réducteur	54
V. 5. Activités antibactérienne des huiles essentielles des feuilles et du fruit	55
V.5. 1. Test de diffusion sur gélose.....	55
V.5. 1.1. Activité antibactérienne du fruit.....	56
V.5. 1.2. Activité antibactérienne des feuilles.....	56
V.5. 1.3. Activité antibactérienne des HEs des feuilles et fruits	57
V.5. 1.4. Comparaison de l'activité antibactérienne des deux HEs avec celle des antibiotiques	58
V.5. 2. Détermination des CMI et CMB par la méthode des microdilutions	60

Conclusion générale	63
---------------------------	----

Références bibliographiques

Glossaire

Annexes

Introduction

Les propriétés médicinales des plantes ont été recherchées par de nombreuses études à travers le monde, grâce à leur faible toxicité et leur caractère économique (Auddy et al., 2003). Ces études sont concentrées sur les bienfaits des composés phytochimiques des fruits, des légumes, et des plantes en général et sur leur impact sur la santé humaine. Les substances végétales sont riches en antioxydants qui sont utilisés pour lutter contre les radicaux libres responsables de plusieurs pathologies, telles que le cancer et les maladies neurodégénératives. Ces derniers sont aussi impliqués dans la détérioration de la qualité organoleptique et hygiénique des aliments (Hale et al., 2008). Quelque soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces radicaux libres dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules biologiques (ADN, protéines, lipides, et glucides...).

Un autre problème qui touche la santé publique est l'émergence de la résistance aux antibiotiques, suite à l'utilisation massive et parfois abusive de ces derniers (De Billerbeck, 2007). Ceci a conduit à une forte demande du consommateur pour de nouveaux antibiotiques contre les germes pathogènes (Fisher, 2008), et a incité les scientifiques à recourir à la phytothérapie, dans le but d'avoir des molécules aux propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

En effet, il est bien connu que les huiles essentielles présentent une activité antiseptique non négligeable (Kaloustian, 2008). Elles exhibent une activité antibactérienne (Bendjilali et al., 1986), antivirale, antimycotique, antioxydante, antiparasitaire, et aussi un effet insecticide (Burt, 2004). Par conséquent, elles peuvent constituer un puissant outil de réduction de développement et de dissémination de la résistance bactérienne (Stefanakis et al., 2013). Actuellement, les huiles essentielles sont reconnues comme des substances GRAS par la FDA (Food and Drug Administration 2005; Stefanakis et al., 2013). Beaucoup d'études ont rapporté leur efficacité contre les germes pathogènes et les contaminants dans les aliments (Gutierrez et al., 2008; Djenane et al., 2012), ce qui laisse entrevoir des perspectives d'application dans le domaine alimentaire (Benjilali et al., 1986), et réduire ainsi le problème des intoxications alimentaires en hausse depuis quelques années; et ceci malgré l'amélioration des conditions d'hygiène et le développement des techniques de production (Burt et al., 2004).

Néanmoins, l'utilisation des huiles essentielles comme additif alimentaire demeure souvent limitée pour des considérations organoleptiques (Delaquis et al., 2001; Lambert et al., 2001; Gutierrez et al., 2008). Parmi les huiles essentielles utilisées en médecine, en parfumerie et

aussi en industrie alimentaire, on retrouve celle des feuilles de *E. globulus* (Tyagi et al., 2011). Elles ont des propriétés antiseptique, anti-inflammatoire (Hasegawa et al., 2008), antipyrétique, antalgique des céphalées, antispasmodique, et béchique (Tyagi et al., 2011).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydants et des antibiotiques naturels en évaluant les propriétés antioxydante et antibactérienne des huiles essentielles d'une plante médicinale largement distribuée en Algérie: *E. globulus*.

Dans la partie recherche bibliographique de ce manuscrit, nous avons commencé par une étude bibliographique des huiles essentielles, leur extraction, leur composition, ainsi que leur propriétés pharmacologiques. Ensuite, nous avons procédé à la description de la plante et de ses propriétés biologiques tout en rappelant les travaux antérieurs réalisés sur le *E. globulus*. En dernier lieu, nous avons évoqué quelques généralités sur les altérations alimentaires et les différents additifs utilisés dans le domaine des industries agro-alimentaires.

La partie expérimentale est subdivisée en deux chapitres distincts:

Le premier illustre le matériel et les méthodes mis en œuvre pour l'extraction, la détermination de la composition chimique et l'évaluation des activités biologiques (antioxydante, antibactérienne) de l'huile essentielle extraite de *E. globulus*. Dans cette partie, nous avons jugé nécessaire d'estimer certains paramètres tels que: la densité et l'indice de réfraction de l'huile essentielle extraite ainsi que la concentration efficace à 50% (CE50); la concentration minimale inhibitrice (CMI), et la concentration minimale bactéricide (CMB). L'estimation de ces paramètres est justifiée par le fait que l'utilisation d'une molécule comme conservateur dans n'importe quelle matrice est conditionnée par son innocuité et par son acceptabilité de point de vue organoleptique.

Le deuxième chapitre expose les résultats obtenus suivis de leur interprétation. La signification statistique de ces derniers a été aussi examinée. Enfin, nous avons terminé par une conclusion générale avec quelques perspectives.

Chapitre I.

Eucalyptus globulus

I. 1. Présentation botanique et géographique de la famille des Myrtaceae

Les Eucalyptus appartiennent à la famille des Myrtacées grande famille de 72 genres et 300 espèces (genres Eucalyptus, Eugenia, Melaleuca, Myrta). Ils comptent environ 600 à 700 espèces et variétés (Warot, 2006). Ce sont des angiospermes, dicotylédones.

Les Myrtaceae est une famille de plantes dicotylédones, deux cotylédons sur l'embryon, deux feuilles constitutives de la graine. Ils sont répartis en 3000 espèces réparties en 134 genres environ. Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques des zones tempérées, subtropicales à tropicales, poussant principalement en Australie, en Amérique tropicale, région méditerranéenne, l'Afrique subsaharienne, Madagascar, tropicales et tempérées d'Asie, et les îles du Pacifique. Les principaux genres de cette famille sont : *Eucalyptus*, *Psidium* dont fait partie le goyavier, *Myrtus* dont fait partie le myrte (arbuste du maquis méditerranéen), *Eugenia* dont le giroflier (*Eugenia caryophyllata*) qui donne le clou de girofle. On rencontre aussi des espèces dont les fruits sont comestibles (genres *Feijoa*, *Eugenia*, *Campomanesia*), et une espèce de figuier étrangleur en Nouvelle-Zélande (*Metrosideros robusta*). Beaucoup d'espèces appartenant à cette famille sont une source d'huiles essentielles, elles sont utilisées dans la parfumerie ou en thérapeutique.

Les espèces à fruits charnus sont disséminées par les oiseaux et les mammifères; les espèces à fruits capsulaires ont de petites graines parfois ailées qui sont disséminées par le vent ou par l'eau (Daroui-Mokaddem, 2012).

I.2. Dénominations internationales

Français: eucalyptus, arbre de la fièvre, gommier bleu.

Anglais: blue gum tree;

Allemand: Eukalyptus blatter;

Arabe: Kalitus, Kalatus (Ghidira et al., 2008).

I.3. Situation botanique

Tableau I : Classification d'*Eucalyptus globulus*(Ghidira et al., 2008).

Règne : Plantae;	Classe :Magnoliopsida	Famille : Myrtaceae
Sous-règne : Tracheobionta;	Sous-classe : Rosidae	Genre : Eucalyptus
Division : Magnoliophyta;	Ordre : Myrtales	

I.4. Description botanique de la plante

Les Eucalyptus sont de grands arbres dont certains peuvent dépasser 100 m de hauteur, mais la moyenne des espèces les plus courantes est de 40 à 50 m, d'autres ont des dimensions plus faibles (Traore et *al.*, 2013). Le tronc comprend une écorce à la base foncée et rugueuse et, en hauteur, lisse, gris cendre laissant s'exfolier son épiderme en longs lambeaux souples et odorants.

Les eucalyptus portent des feuilles persistantes, coriaces, glabres mais différentes en fonction de l'âge des rameaux: les jeunes rameaux possèdent des feuilles larges, courtes, opposées, sessiles, ovales, bleu-blanc et cireuses, avec un vrai limbe nervuré. Les rameaux plus âgés possèdent des feuilles aromatiques, falciformes, longues de 12 à 30 cm, étroites, pointues, épaisses, vert foncé, courtement pétiolées, alternes et pendantes verticalement (Goetz et Ghedira, 2012).

Les fleurs naissent à l'aisselle des feuilles et sont de couleur blanc crème (en bouton de couleur (blanc-bleu), en toupie surmontée d'une pseudo-corolle en forme de coiffe qui tombe lors de l'épanouissement, laissant apparaître un panache d'étamines (Baba Aissa, 1999).

Le fruit ligneux est une grosse capsule glauque prenant une teinte marron à maturité, dure, anguleuse, verruqueuse, et s'ouvrant légèrement par trois, quatre ou cinq fentes (qui dessinent une étoile à son sommet) pour libérer de nombreuses graines sombres et minuscules (Goetz et Ghedira, 2012). Les eucalyptus sont connus pour leur capacité à coloniser des terrains nus ou dévastés à cause de leurs graines très nombreuses (et à faibles réserves); grâce à un organe souterrain, le lignotuber, même après une coupe ou un incendie; ils poussent sans marquer de dormance, tant que les conditions météorologiques ne sont pas défavorables. Ces dernières propriétés, ajoutées à sa grande valeur papetière, ont assuré à l'eucalyptus une dispersion et un succès mondiaux (Fraval, 2005).



Figure 1: Photographie des feuilles et du fruit de *Eucalyptus globulus*

I.5. Utilisations traditionnelles

L'arbre fut découvert en 1792 par Labillardière en Tasmanie. Le baron Ferdinand von Muller, directeur du Botanical Gardens de Melbourne, fit connaître ses qualités médicinales. Grimbert signala que l'eucalyptus était propre à assainir les régions marécageuses là où il était planté et qu'il désinfectait l'atmosphère par son essence volatile. En effet, les plantations d'eucalyptus ont été utilisées pour désinfecter la région d'Alger. Son action antimalarique est vérifiée par la disparition de moustiques en Campanie (Italie), en Sicile, en Sardaigne et au lac Fezara en Algérie. Au XIX^e siècle, l'eucalyptus est considéré comme, antipyrétique, antalgique des céphalées, antispasmodique et béchique. L'écorce était considérée antispasmodique et antipyrétique (Ghidira et *al.*, 2008; Pal Sing et *al.*, 2012). Les feuilles de *E. globulus* sont traditionnellement utilisées par voie orale et en usage local en cas de rhume et de nez bouché (Bruneton, 1993). Cette essence présente également des propriétés antirhumatisme, stimulante et tonifiante (Ernest, 1987). Elle est employée dans les affections des voies respiratoires telles que la tuberculose pulmonaire. C'est un excellent cicatrisant naturel utilisé dans le pansement des plaies, brûlures et leucorrhées (Boulekbache-Makhlouf et *al.*, 2011).

I. 6. Les pays producteurs des huiles essentielles

Les pays producteurs sont : l'Espagne, le Portugal, le sud de la France, l'Italie, l'Algérie, la Californie, le Mexique, le Brésil... En 1984, la production mondiale était de 1400 tonnes (Garnero, 2002). L'Australie produit en environ deux tiers (Batish et *al.*, 2008). En industrie pharmaceutique la substance la plus utilisée est l'eucalyptol, qui entre dans la préparation des baumes, des sirops, des pommades et des pastilles (Baba Aissa, 1999).

L'huile essentielle de *E. globulus* est également utilisée en médecine, en soins dentaires, pour les produits désinfectants (Garnero, 2002). L'utilisation pharmaceutiques des huiles

essentielles de cette plante exige une teneur approximative de 70% en 1,8 cineole (Pereira et al., 2004).

I.7. Composition de l'huile essentielle

Quelques études ont été réalisées sur les huiles essentielles des feuilles et des fruits de *E. globulus*, et plus de 30 composés ont été identifiés. Les composés majoritaires sont le 1,8 cineole, camphène, α -pinene, globulol, b-pinene, p-cymene, myrcene, g-terpinene, α -terpineol et le limonène (Pereira et al., 2004; Songa et al., 2009). Une étude portugaise a révélé la présence de 33 composés dans les huiles essentielles du fruit; dont les monoterpènes (50,4%), les sesquiterpènes (49,6%). Le composé majoritaire identifié est l'aromadendrene (25,1%), suivi de phellandrene (17,2%), 1,8-cineole (11,7%), ledene (5,83%) et du globulol (5,23%) (Pereira et al., 2004). 47 composés ont été identifiés dans les huiles essentielles des feuilles: le 1, 8-eucalyptol (72,71 %), α -pinene (9,22 %), α -terpineol (2,54%), (-)-globulol (2,77%), α -terpineol acétate (3,11%), et d'alloaromadendrene (2,47 %) (Songa A et al., 2009). Le composé majoritaire: L'eucalyptol ou le 1,8 cineole avec une concentration de 70 à 85% (Opdyke, 2002; Zhiri et Baudoux, 2005).

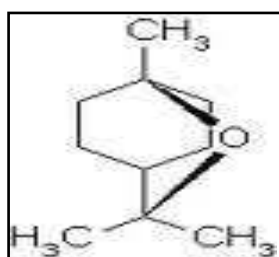


Figure 2: Structure chimique de l'eucalyptol (Bharti et al., 2012).

-Partie distillée: la feuille, utilisée aux états unis dans la préparation de certains produits présentés dans le tableau II:

Tableau II : Produits préparés à base des huiles essentielles de *E. globulus*

Concentration (%)	Savon	Détergents	Lotions/Crème	Parfum
Usuelles	0,3	0,005	0,002	0,1
Maximales	30,03	0,04	0,1	1,0

- L'huile essentielle de l'eucalyptus a obtenu le statut de Produit GRAS par la FEMA (1965), et approuvé par la FDA pour son utilisation alimentaire (Opdyke, 2002). Son aspect est liquide, limpide, presque incolore à jaune claire son odeur est caractéristique rappelant celle

de l'eucalyptol (Buronso, 2008). Elle est utilisée comme agent de flaveur dans l'industrie alimentaire à une dose $\leq 5\text{mg/Kg}$ (Batish et al., 2008).

Les principaux composés identifiés dans les huiles essentielles de la plante *E. globulus* sont montrés dans le tableau II.

Tableau III: Principaux composés des HES de *E. globulus*

Auteurs	Composition
(Jubril Olayinka et al., 2012)	Feuilles: monoterpènes oxygénés: 46,5 %, avec le terpinen-4-ol : 23,46% le constituant le plus abondant. Les autres composés sont γ -terpinène : 7,01 %, spathulenol: 8,94 %, p- cymène : 8,10 % et p-cymen-7-ol : 6,39 %. Globulol : 2,52 % et α -phellandrene : 2.20 %.
(Damjanović-Vratnica, 2011)	Feuilles: 1,8 cineole : 85,8%, α -pinène : 7,2%, et β -myrcène : 1,5%, β -pinène, limonène, α -phellandrene, γ -terpinène, linalool, pinocarveol, terpinen-4-ol, et α -terpineol.
(Song et al, 2009)	Feuilles: 1,8-eucalyptol: 72,71 %, α -pinène: 9,22 %, α -terpineol: 2,54 %, globulol: 2,77 %, α -terpineol acetate: 3,11 %, et alloaromadendrene: 2,47 %.
(Tyagi et al,2011)	Feuilles : 20 composés ont été identifiés: 44,5% monoterpènes hydrocarbonés et 52% monoterpènes oxygénés, donc environ 96,5% des composés détectés. Les constituants majoritaires sont le 1,8-cineole : 45,4%, limonène : 17,8%, p-cymène : 9,5%, c-terpinène : 8,8%, a-pinène : 4,2% et a-terpineol : 3,6%.
(Mulyaningsiha et al,2010)	Fruit: aromadendrene : 31,17% est le composé le plus abondant, suivi du 1,8-cineole : 14,55%, globulol : 10,69%, et du ledène : 7.13%.
(Nishimura et Calcin, 1979) (Brian et al., 1979)	Fruit: β pinène, β terpinène, γ -terpinène, 1,8cineole, α terpinène, linalool oxide, terpinen-4-ol, piperitone, α -gurjunène, aromadendrene, alloaromadendrene, eremophilène, γ -cadinène, and globulol.

I. 8. Propriétés pharmacologiques

- Action hypoglycémiant à forte dose;
- Expectorant: stimule les cellules sécrétrices de la muqueuse bronchique, cet effet se vérifie dans son action antitussive ;

-Antiseptique: Après absorption par la peau ou après résorption intestinale, le cineole est éliminé en partie par les poumons (d'où son activité) et par les reins (Fabre et al., 1992; Baba Aissa, 1999; Batish, 2008; Buronso, 2008; Arma, 2012). L'effet antiseptique bactéricide est surtout lié à la présence du 1,8 cineole. Cet effet est supérieur à celui du 1,8 cineole utilisé seul. Une partie de cette huile est éliminée par la voie urinaire. Elle agit sur les *Escherichiae*, *Proteus*, *Saphtylococcus aureus*, etc.

-Huile essentielle de l'eucalyptus est un sédatif léger du système nerveux central, mais favorise en revanche la respiration (eupnéique) ;

-L'effet anti-inflammatoire a été comparé à celui de l'indométacine. Il est lié en partie à son huile essentielle, à ses acides-phénols et flavonoïdes.

Les feuilles de *E. globulus* sont utilisées traditionnellement dans le traitement du diabète. Cet effet a été contrôlé chez l'animal, ou l'hyperglycémie est abaissée chez des souris traitées à la streptozotocine recevant 62,5 g d'eucalyptus /kg dans le régime alimentaire dilué dans 2,5 g/l d'eau physiologique. Au Maroc, la décoction des feuilles et des fleurs est utilisée contre le diabète (Arma, 2012).

I.9. Activités biologiques des huiles essentielles de *E. globulus*

I.9. 1. Activité antibactérienne et antifongique

Djenane et al. (2011) ont démontré l'efficacité des huiles essentielles de *E. globulus* comme agent naturel de la conservation des aliments grâce à son effet antibactérien sur de nombreux micro-organismes, telles que les salmonelles avec des essais réussis de conservation des œufs entiers liquides. L'huile essentielle de *E. globulus* (100%) est également efficace contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Raho et Benali, 2012), ainsi que sur *Candida albicans*, comme le montre la figure suivante:

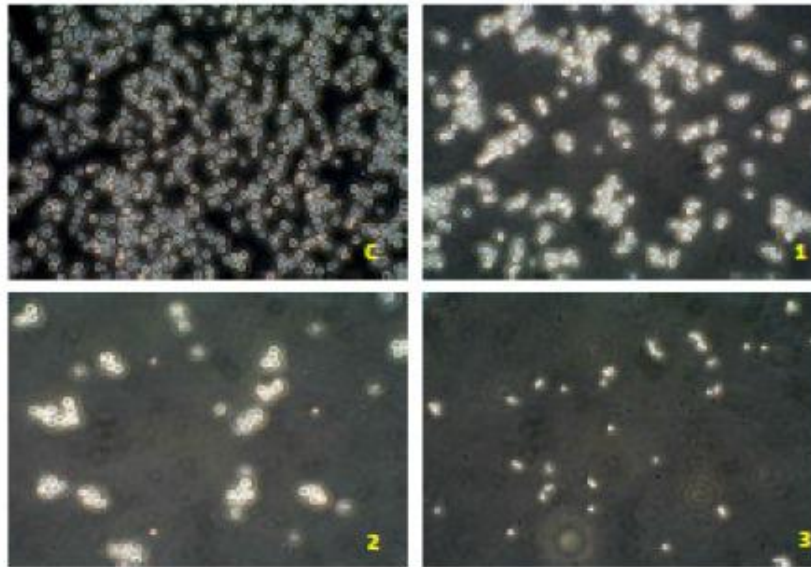


Figure 3: Effets des HEs de *E. globulus* sur la croissance de *Candida albicans* (Noumi et al., 2011).

En outre, une très forte sensibilité des levures aux HEs des feuilles de *E. globulus* a été notée avec une concentration minimale inhibitrice de 1,13 à 2,25 mg/mL sur la flore bactérienne (Tyagi et Malik, 2011). Par contre, son efficacité est partielle *vis à vis* de *Aspergillus flavus* Link et *Aspergillus parasiticus* ainsi que sur l'aflatoxine B1 à une dose de 200 µL (Vilela et al., 2009).

Une très forte activité antibactérienne a été notée sur les germes suivants: *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae*. Les concentrations minimales d'inhibition montrent une faible activité contre *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella infantis* (3,13 mg/mL), par contre la plus forte activité a été notée pour *S. aureus*, *E. coli*, et *pyogenes* (0,09 mg/mL). (Damjanović-Vratnica, 2011).

I.9.2. Activité antioxydante

Selon l'étude menée par Mishra et al. (2010), l'huile essentielle de *E. globulus* montre une activité antioxydante avec un pourcentage de piégeage du radical DPPH de $79 \pm 0,82\%$ à une concentration de 80% (V/V). Selon Noumi et al. (2011), cette huile a une forte activité antioxydante de par sa composition riche en cineole (95,61%).

I.9. 3. Activité antiparasitaire

De nombreuses études sur l'activité antiparasitaire des huiles essentielles de *E. globulus* ont été réalisées, exemple celle de Khodadad Pirali-Kheirabadi, (2009) contre *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus* où une concentration de 5% de cette huile a pu inhiber 25% de la reproduction chez ces parasites.

I.9.4. Activité insecticide

L'huiles essentielles d'Eucalyptus a prouvé son effet insecticide contre *L. longipalpis*, à 100% au stade larvaire à une concentration de 40 mg/mL (Marciel et al., 2010). En outre une DL50 (dose létale qui éliminer 50% d'insectes) de 2000 ppm de l'HE de *E. globulus* est trouvée contre *Aphis gossypii*. Mareggiani et al, (2008) ont attribué cette activité insecticide à un métabolite secondaire de l'HE qui est le 1,8 cineole. Un taux de mortalité de 55 à 100 % a été observé au bout de la première heure d'application, ce taux a augmenté au bout de 24 h jusqu'à 84 à 100%.

Mareggiani et al, (2008) ont cité l'effet insecticide du cineole contre *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) (Yang et al., 2004), *Ceratitis capitata* (Clemente et al., 2006) et contre *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) (Hamroui et Regnault-Roger, 1997). Zunino et al. (2012) ont rapporté une DL50 de 0,4 à 0,84 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ pour *Sternechus pinguis* (Fabricius) et *Rhyssomatus subtilis* Fiedler (Coleoptera: Curculionidae). Un effet toxique par contact contre les larves de *Musca domestica* a été noté pour une DL50 comprise entre 2,73 et 0,60 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ pour un temps létal de 1,7 à 6 jours. Le traitement par fumigation a aboutit à un résultat de 66.1 and 50.1 $\mu\text{L}/\text{L}$ pour 24 h et 48 h, respectivement (Kumar et al., 2012).

Chapitre II.

Généralités sur les Huiles Essentielles

II. 1. Définition

La norme AFNOR NF T 75-006, définit l'huile essentielle comme « un produit obtenu à partir d'une matière première végétale, soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation ». L'HE est séparée de la phase aqueuse par des procédés physiques, par exemple la décantation, ou par l'utilisation d'un solvant plus volatil que l'eau (éthér diéthylique, pentane, etc) (Ngakegni-Limbili, 2012).

II.2. Huiles Essentielles -Chémotypées (H.E.C.T)

Les Huiles Essentielles Chémotypées sont une forme de classification chimique, botanique et biologique de la molécule présente en majorité dans une HE. Par exemple, l'H.E.C.T. de *Thymus vulgaris* à carvacrol est connue pour son activité antiseptique, alors que l'H.E.C.T. de *Thymus vulgaris* à thymol a des propriétés anti-infectieuses majeures. Il est donc préférable de choisir une H.E.C.T. lorsqu'on utilise les HEs en thérapeutique (Mayer, 2012).

II.3. Répartition et localisation

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les HEs sont repartis dans un nombre limité de familles: Myrtacées, rutacées, lamiacées, astéracées, opiacées, cupressacées, zingibéracées, et pipéracées... etc (Chouitah, 2012).

Les huiles essentielles se retrouvent dans des glandes minuscules situées dans différentes parties de la plante aromatique: les feuilles, les fleurs, les fruits, les graines, l'écorce et pour certaines plantes dans les racines (Makhloufi, 2013).

Les glandes sécrétrices sont réparties sur l'ensemble de la plante, rares sur les faces supérieures des feuilles et des tiges, elles sont un peu plus nombreuses sur le dessous des feuilles, mais elles abondent surtout sur le calice des fleurs. La formation des HEs dans les végétaux est le fait d'une multitude de réactions biochimiques dont certaines ne sont pas encore élucidées. Elles prennent naissance dans des appareils sécréteurs qui ont une forme variée (Djarri,2011), il s'agit par exemple de:

- Trichomes Glandulaires (Lamiaceae);
- Cavités sécrétrices (Myrtaceae et Rutaceae);

- Canaux sécréteurs (Apiaceae et Asteraceae).

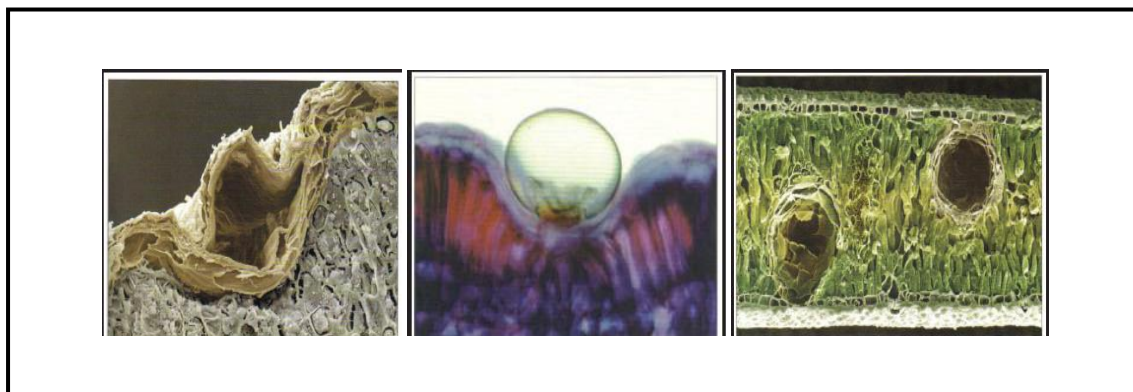


Figure 4: Photographie des différents types de glandes sécrétrices des HEs. (Djarri, 2011).
A) Canal sécréteur dans la graine de Carvi (x406); B) Glande sécrétrice sur la feuille de *Origanum heracleoticum* et C) Cavité sécrétrice de *Eucalyptus citriodora*.

II. 4. Techniques d'extraction des huiles essentielles

Il existe plusieurs techniques d'extraction des produits de haute valeur ajoutée présents dans les plantes. Ces techniques sont dites *conventionnelles* (utilisées depuis longtemps) et *nouvelles* ou *innovantes* (développées plus récemment).

II.4. 1. Les techniques conventionnelles

II.4. 1.1. L'hydrodistillation

Au cours de l'hydrodistillation, le matériel végétal est immergé dans l'eau, le mélange hétérogène est bouilli, et l'huile essentielle est volatilisée puis condensée. Étant donné l'insolubilisation dans l'eau de ses principaux composés volatils, l'HE peut être séparée par décantation après refroidissement dans un séparateur de phases (Penchev, 2010).

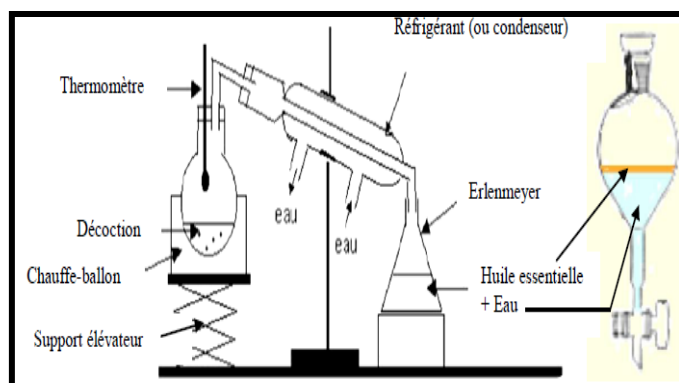


Figure 5: Schéma du dispositif d'hydrodistillation (Penchev, 2010).

II.4.1.2. L'entraînement par la vapeur d'eau

C'est la seule distillation préconisée par la Pharmacopée française, car elle minimise les altérations hydrolytiques (notamment des esters). Les plantes entières, ou broyées (lorsqu'il s'agit d'organes durs: racine, écorce), sont disposées dans un alambic traversé par un courant de vapeur d'eau produit par la chaudière. La vapeur d'eau injectée à travers la masse végétale, disposée sur des plaques perforées, entraîne l'HE. Elle se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant. A la sortie de l'alambic, le vase florentin (essencier) permet de séparer l'eau de l'HE grâce à la différence de densité des deux liquides (Da Silva, 2010).

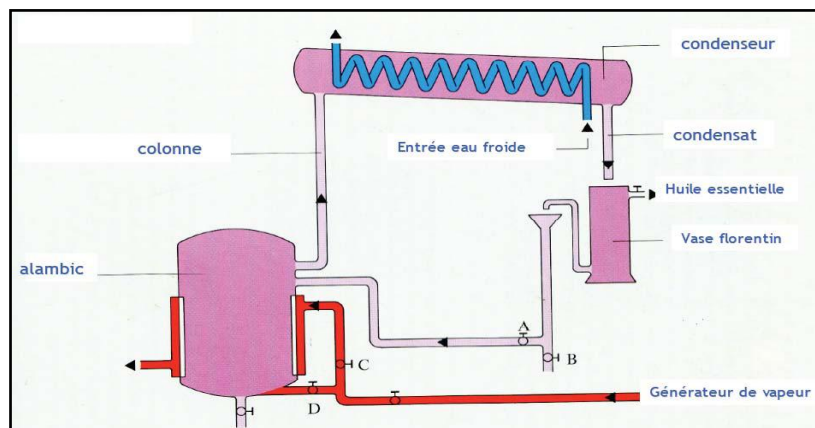


Figure 6: Schéma de l'appareil d'entraînement à la vapeur d'eau (Bousbia, 2011).

II.4.1.3. L'hydrodiffusion (percolation)

C'est une modification du processus de l'entraînement par la vapeur d'eau au cours duquel la vapeur d'eau arrive par le haut d'un conteneur d'herbe, permettant ainsi à la vapeur de percoler à travers la matière végétale par gravité. Les vapeurs d'huile et vapeurs d'eau sont ensuite condensées et séparées (Benabdelkader, 2012).

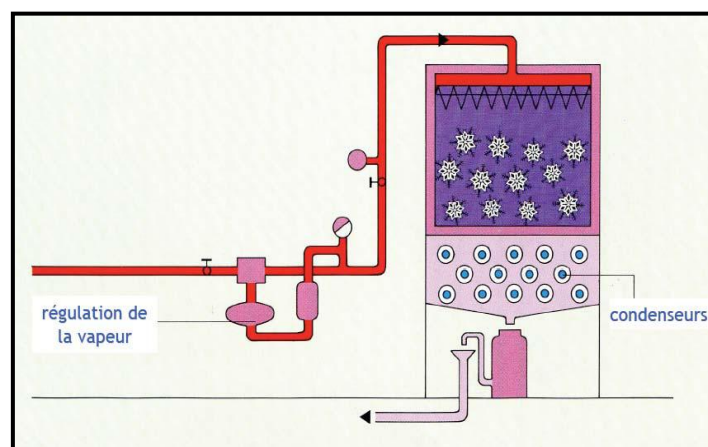


Figure 7: Schéma du procédé d'hydrodiffusion (Bousbia, 2011).

II.4.1.4. L'expression à froid

C'est une technique "physique" simple où les écorces des agrumes (citron, orange,...) sont pressées à froid pour extraire leurs HEs en utilisant des rouleaux ou des éponges. Aucune source de chaleur n'est utilisée, laissant ainsi à l'huile une odeur très proche de l'original. Le principe de cette méthode consiste à faire éclater par différents procédés mécaniques (compression, perforation) les poches qui sont situées à la superficie de l'écorce de ces fruits renfermant l'HE. L'huile libérée est ensuite recueillie par un courant d'eau (Herzi, 2013).

II.4.1.5.Extraction par solvant

C'est un procédé qui conduit à l'obtention des concrètes, des résinoïdes et des absolues; le matériel végétal frais est par la suite épuisé par des solvants organiques volatils (Da Silva, 2010). Ces extraits sont très utilisés en parfumerie (Benabdelkader, 2012).

II.4.1.6. Enfleurage ou digestion

Ce procédé est développé à froid ou à chaud, utilise les organes végétaux fragiles comme les fleurs aromatiques qui permettent d'obtenir des huiles ou des graisses.

Lors de ce processus, les tissus végétaux sont mis en contact avec un corps gras (axonge) pour le saturer en essences végétales. Le corps gras est ensuite épuisé par l'alcool absolu et ce solvant évaporé sous vide pour ne laisser que les substances végétales (Benabdelkader, 2012).

II.4.2. Les techniques nouvelles ou innovantes

II.4. 2.1.L'extraction assistée par microondes

Dans ce procédé, la matrice végétale est chauffée par microondes dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques de condensation, refroidissement et décantation. Ce procédé permet un gain de temps (temps d'extraction divisé par 5 à 10) et d'énergie (température plus basse) considérable (Piochon, 2008).

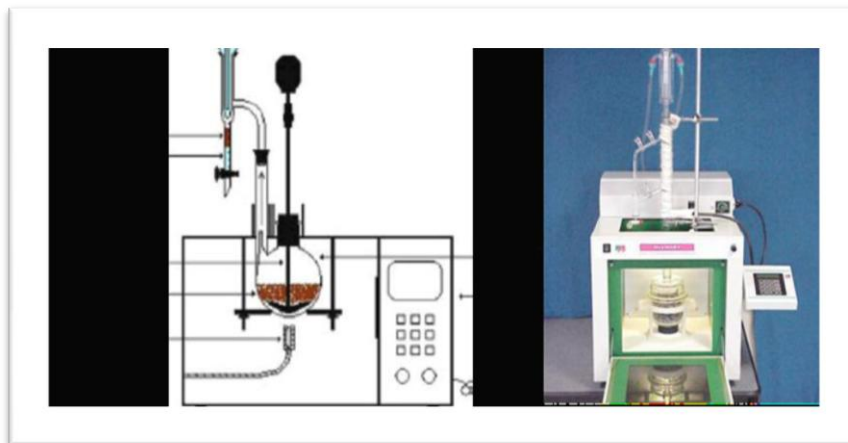


Figure 8: Extraction des HEs par microondes.

III.4.2.2.L'extraction accélérée par solvants (Accelerated Solvent Extraction-ASE)

C'est une technique brevetée de la société DIONEX qui utilise les solvants conventionnels à des températures (50 – 200 °C) et des pressions (100 – 150 bar) élevées. La pression est maintenue assez élevée pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Pendant l'ASE®, le solvant reste toujours en dessous de ses conditions critiques. Les avantages de cette technique devant les techniques conventionnelles sont les suivants : l'absence des échauffements locaux, et la consommation de plus petites quantités de solvants. Ses inconvénients sont liés à sa non sélectivité, ce qui impose des procédures supplémentaires de nettoyage des extraits. Les températures opératoires élevées peuvent mener à une dégradation des solutés thermolabiles (Penchev, 2010).

III.4.2.3.Extraction par des solvants supercritiques

L'originalité de cette technique repose sur le comportement du solvant utilisé sous des conditions particulières puisque au-delà d'un certain point, dit point critique, caractérisé par une température (T_c) et une pression (P_c), les corps purs se trouvent dans un état particulier dit supercritique. Dans leurs conditions d'utilisation, les fluides supercritiques ont une masse volumique voisine de celle des liquides, une viscosité proche de celle des gaz et une diffusivité intermédiaire; leur polarité est modifiée par rapport à l'état liquide. Leur pouvoir dissolvant dépend fortement de la température et de la pression. Le fluide supercritique le plus utilisé est le dioxyde de carbone (Bousbia, 2011).

II. 5. Le marché mondial des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont valorisées principalement sur les marchés de l'aromathérapie, de la parfumerie et de la cosmétique. Elles peuvent soit rentrer dans la composition de produits élaborés (savons, crèmes, parfums, bougies,...), soit être utilisées en l'état. Elles sont recherchées pour leurs propriétés odorantes ou thérapeutiques. Les principaux marchés de consommation sont les pays développés qui représentent 80% des débouchés mondiaux (Europe 30 %, Japon et Amérique du Nord 50 %). Les quantités d'HEs produites dans le monde varient considérablement. La production annuelle de quelques unes dépasse 35 000 tonnes, tandis que d'autres ne peuvent atteindre que quelques kilogrammes (Ngakegni-limbili, 2012). La figure 9 montre les principaux pays producteurs d'HEs à travers le monde en 2008.

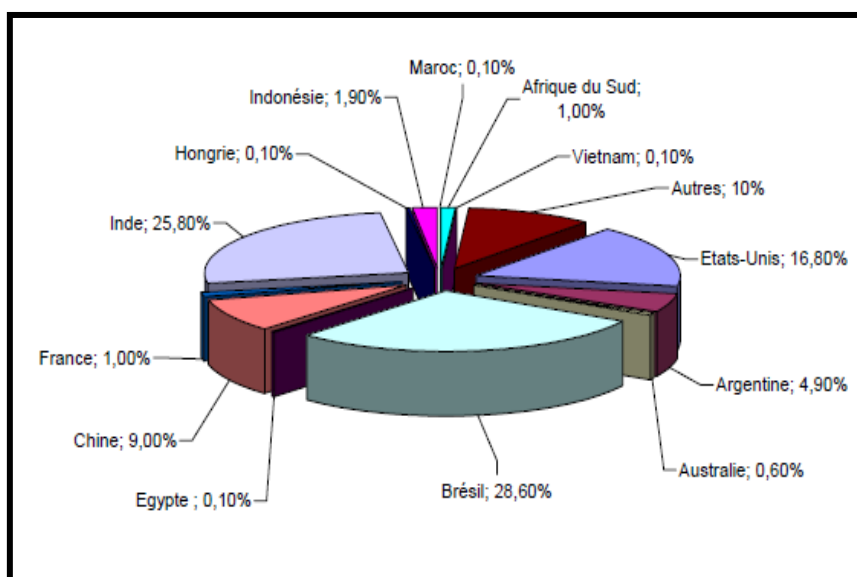


Figure 9 : Répartition de la production mondiale des HEs durant l'année 2008 (Bousbia, 2011).

II.6. Propriétés physiques

Dans le tableau IV sont données les propriétés physiques de certaines HEs. Les HEs sont liquides à température ambiante, elles sont volatiles ce qui les différencie des huiles dites « fixes ». Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est généralement inférieure à celle de l'eau. Elles sont liposolubles, en revanche solubles dans les solvants organiques usuels (Cohen, 2013). La liposolubilité des HEs est une propriété majeure qui leur confère une grande diffusibilité dans l'organisme quelque soit la voie d'administration utilisée.

Les HEs sont composées de molécules à squelette carboné, le nombre d'atomes de carbone étant compris entre 5 et 22 (le plus souvent 10 ou 15).

Ce sont des mélanges complexes de constituants variés en concentration variable. Ces constituants appartiennent principalement mais pas exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes: les terpenoides et les substances biosynthétisées à partir de l'acide shikimique (donnant naissance aux dérivés du phénylpropane) (Da Silva, 2010).

Tableau IV: Propriétés physiques de quelques HEs (Smadja, 2009)

Densité: en général inférieure à 1	Cannelle:1,052-1,070 Girofle:1,044-1.057 <i>E. cineria</i> : -fruit: 0,908 -feuilles: 0,909
Indice de réfraction	Coriandre: 1,4620-1,4700 Vetyver Bourbon: 1,5220-1,5300 <i>E. cineria</i> :-fruit: 1,463 -feuilles: 1,458
Pouvoir rotatoire	Cannelle: feuilles:+7 à +13° Vetyver Bourbon: +19° à +30°

II.7. Critères de qualité des huiles essentielles chémotypées

L'obtention d'une HE de qualité thérapeutique se révèle être un processus particulièrement délicat car cette H.E.C.T. doit impérativement répondre à de nombreux critères de qualité:

- **La certification botanique**

L'appellation de la plante doit préciser le genre, l'espèce, la sous-espèce, le cultivar afin d'empêcher toute erreur issue des noms vernaculaires.

Ex.: Aniba rosaeodora var. *amazonica* - *Helichrysum italicum* ssp. *Serotinum*.

- **L'origine géographique**

Le nom du pays ou d'une région apporte des précisions intéressantes sur le biotope (l'environnement) de la plante aromatique et caractérisera sa composition biochimique particulière.

- **Le mode de culture**

Cette précision permettra de savoir si la plante est sauvage ou cultivée et issue d'une culture biologique (label BIO) ou non.

- **Le stade de développement botanique**

Les caractéristiques des chémotypes dépendent parfois du stade de développement: cueillette avant, pendant ou après floraison...

- **L'organe distillé**

La composition biochimique des HEs chémotypées varie en fonction de la partie ou organe de la plante distillée.

- **Le mode d'extraction**

La composition des H.E.C.T. peut varier selon le mode d'extraction utilisé: distillation, hydrodistillation, percolation, expression.

- **Le chémotype ou chimiotype**

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée au spectromètre de masse indique les molécules fondamentales pour une bonne utilisation des H.E.C.T. (Zhiri et Baudoux, 2008; Girard, 2010).

II.8. Facteurs de variabilité des huiles essentielles

Ils sont très nombreux et problématiques. Ils résultent de la grande latitude laissée au fabricant en terme de source (organe producteur, variété et origine géographique) et mode d'obtention:

- **l'existence de chémotypes:** (c'est-à-dire une subdivision au sein d'une même espèce en fonction de sa composition chimique), très fréquents dans les plantes à HEs (le thym par exemple) (Coudderc, 2001).
- **l'influence du cycle végétatif :** qui peut faire varier de 50% la teneur d'un composé (Coudderc, 2001).
- **l'influence de facteurs extrinsèques:** comme l'environnement (température, humidité relative, durée totale d'insolation ou encore régime des vents) ou les pratiques culturales (apport d'engrais, régime hydrique), en effet des variations de composition chimique des HEs d'une même espèce d'eucalyptus provenant de différentes zones ont été observées selon une étude au Maroc (Zrira et *al.*, 1994).
- **l'influence du procédé d'obtention:** la labilité des constituants des HEs entraîne leur modification lors de l'hydrodistillation sous l'influence de l'eau, l'acidité et la température (réarrangements, isomérisation, racémisations, hydrodistillation) (Coudderc, 2001).

II.9. Les utilisations des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont aujourd'hui omniprésentes dans les savons, les crèmes, les détergents, lessives et dans l'industrie agro-alimentaire. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (Makhloufi, 2013).

Elles sont appréciées pour leurs propriétés odorantes et antiseptiques dans le domaine de la parfumerie, de la cosmétologie et de l'industrie alimentaire. Leur intérêt en médecine humaine et vétérinaire est aussi grandissant. Elles sont utilisées par voie orale (diluée dans du lait, yaourt, miel..etc), rectale, ou par inhalation directe (Degryse et al., 2008). A l'heure actuelle, en France, la phytothérapie est reconnue par le Ministère de la Santé Publique comme thérapie officielle depuis 1986. L'aromathérapie, se soigner par les HEs, fait partie de cette médecine est donc, en développement (Zhiri et al., 2010). Les HEs sont également utilisées comme biopesticides efficaces (Chiasson et Beloin, 2007).

II. 10. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes pouvant contenir plus de 300 composés différents (Selles, 2006). Ces composés sont des molécules volatiles appartenant pour la grande majorité à la famille des terpènes (Piochon, 2008).

Les huiles essentielles sont constituées principalement de deux groupes de composés odorants distincts selon la voie métabolique empruntée ou utilisée. Il s'agit de terpènes (mono et sesquiterpènes), prépondérants dans la plupart des essences, il s'agit essentiellement des terpènes les moins volatils, c'est-à-dire ceux de masse moléculaire peu élevée et des composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Cohen, 2013).

II.11. Les monoterpènes

Les monoterpènes sont les plus simples constituants des terpènes dont la majorité est rencontrée dans les HEs (90%). Ils comportent deux unités isoprène (C_5H_8), selon le mode de couplage «tête-queue». Ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques. A ces terpènes se rattachent un certain nombre de produits naturels à fonctions chimiques spéciales (El Haib, 2011).

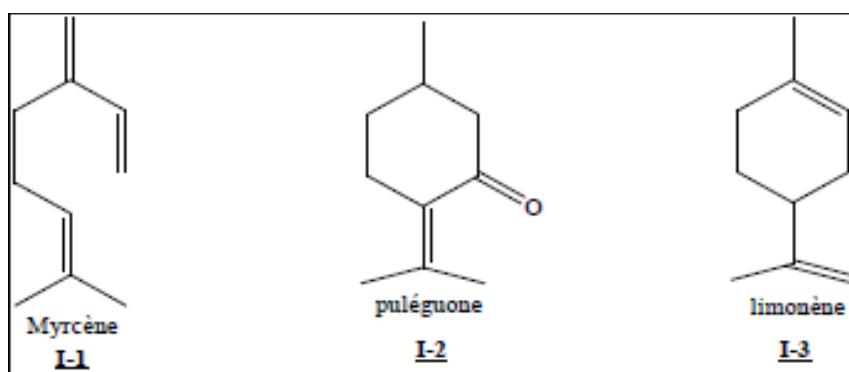


Figure 10 : Exemples de monoterpènes (El Haib, 2011).

II.12. Les sesquiterpènes

Ce sont des dérivés hydrocarbures en $C_{15}H_{22}$ (assemblage de trois unités isoprènes) (El Haib, 2011). Ils ont une variabilité structurale de même nature que les monoterpènes. L'allongement de la chaîne avant cyclisation lors de leur synthèse augmente le nombre de cyclisations possibles, d'où la très grande variété de structures connues (Cohen, 2013). Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures ou sous forme d'hydrocarbures oxygénés comme les alcools, les cétones, les aldéhydes, les acides et les lactones (El Haib, 2011).

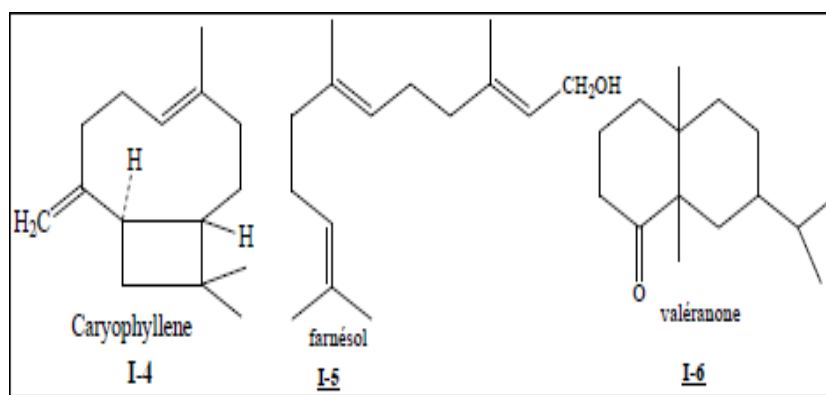


Figure 11: Exemples de sesquiterpènes (El Haib, 2011).

II.13. Les composés aromatiques

Une autre classe de composés volatils fréquemment rencontrés est celle des composés aromatiques dérivés du phénylpropane. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole (El haib, 2011).

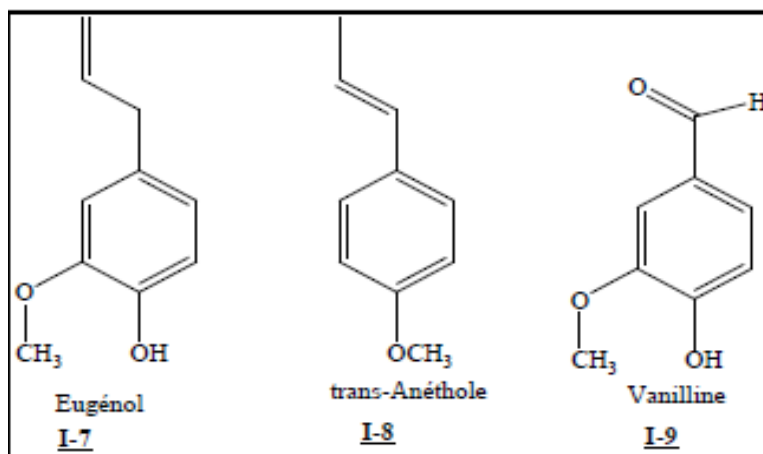


Figure 12 : Exemples de composés aromatiques (El Haib, 2011).

II.14. Importance industrielle des terpénoïdes

Les terpénoïdes sont disponibles en quantités relativement importantes sous forme HEs, de résines ou de cires qui constituent des ressources renouvelables importantes. Ils fournissent une gamme de produits commercialement utiles pour l'homme comme, par exemple, des arômes ou saveurs (menthol), matières industrielles (acides résiniques diterpéniques), compléments alimentaires sous forme de vitamines (linalol), ou édulcorants, pesticides, solvants, adhésifs et intermédiaires de synthèse (Benabdelkader, 2012).

II. 15. Rôles des huiles essentielles dans la plante

Les animaux sont mobiles pour chercher leur nourriture, pour échapper aux prédateurs et pour se reproduire. En revanche, les plantes sont immobiles ou presque, elles ont dû alors, développer des stratégies pour survivre et se reproduire. Les métabolites secondaires sont donc probablement impliqués étroitement dans ces stratégies:

- a) dissuader les prédateurs: les odeurs repoussent les herbivores;
- b) attirer les pollinisateurs: les couleurs et les odeurs attirent les insectes. Par exemple, certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles;
- c) décourager la compétition *vis-à-vis* d'autres espèces: c'est l'*allélopathie*.

Certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes; c'est le cas du noyer qui produit de la *juglone* qui inhibe la croissance des autres plantes dans un rayon de 8 m autour du tronc (Bouhadjera, 2005).

II.16. Activités biologiques des huiles essentielles

Dans la plupart des cas, l'HE d'une plante ne se limite pas à une seule propriété. Cette multiplicité des actions possibles peut provenir essentiellement de leur composition très complexe d'où la magie des HEs. Dans le tableau ci-dessous sont montrées les différentes propriétés des HEs.

Tableau V: Propriétés thérapeutiques des HEs (Mayer, 2012).

anti-infectieuse :	<p><i>Antibactériennes:</i> les phénols (clou de girofle) ;</p> <p>-<i>Antivirales:</i> phénol et à monoterpénol (Bois de Hô, Cannelle de Ceylan) ;</p> <p>-<i>Antifongiques:</i> Cannelle, de clou de girofle ou de Niaouli;</p> <p>-<i>Antiparasitaires:</i> Le thym à linalol (la sarriette des montagnes) ;</p> <p>- <i>Antiseptiques:</i> aldéhydes ou terpènes (<i>Eucalyptus radiata</i>);</p> <p>- <i>Insecticides:</i> aldéhydes (le citronnellal contenu dans l'Eucalyptus citronné ou la citronnelle.</p>
Anti-inflammatoires	géranium et gingembre.
Régulatrices du système nerveux	<p>-<i>Antispasmodiques :</i></p> <p>Les esters ou les éthers possèdent une action sur les spasmes des muscles lisses ou striés (Hélichryse);</p> <p>-<i>Calmantes, anxiolytiques :</i></p> <p>Les aldéhydes type citrals (la mélisse ou celle de Verveine citronnée).</p> <p>- <i>Analgésiques, antalgiques:</i></p> <p>Eucalyptus citronné, Gingembre, Lavande vraie.</p>
Drainantes respiratoires	<p>-<i>Expectorantes :</i></p> <p>1,8 cineole de <i>E. globulus</i> et du romarin agissent sur les glandes bronchiques et sur les cils de la muqueuse bronchique.</p> <p>- <i>Fluidifiante :</i> Les cétones (le romarin).</p>
Digestives	Le cumin, (cuminal), l'anis étoilé, l'estragon ont une action digestive et apéritive en stimulant la sécrétion des sucs digestifs.
Cicatrisantes	Ciste, Lavande, l'immortelle, le Myrthe.

II.17. Les propriétés antioxydantes

Les propriétés antioxydantes des HEs sont largement étudiées. Le stress oxydatif, qui survient lors du déséquilibre entre la production de radicaux libres et d'enzymes antioxydantes, est en relation avec l'apparition de maladies, telles que l'alzheimer, l'artériosclérose et le cancer. Une façon de prévenir ce stress oxydatif qui endommage et détruit les cellules est de rechercher, dans l'alimentation, un apport supplémentaire de composés antioxydants (vitamine C, α -tocophérol, BHT, etc.). Les HEs de cannelle, muscade, clou de girofle, basilic, persil, origan et thym possèdent de puissants composés antioxydants. L'activité antioxydante des HEs est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le tinalool, le 1,8-cineole, le géraniol/nérol, le citronellal, l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène et l'aterpinolène (Pionchon, 2008).

II .18. Action antibactérienne

Le spectre d'action des HEs est très large: moisissures, levures, bactéries. Elles sont généralement plus actives sur les moisissures et les levures que sur les bactéries. D'une manière générale, pour les antiseptiques, les bactéries Gram+ qui ne possèdent pas de membrane externe sont naturellement moins résistantes que les bactéries Gram- qui en possèdent une. Pour les HEs, certains travaux rapportent une activité bactériostatique d'une manière générale meilleure sur les Gram+, mais l'activité des HEs dépend aussi de l'espèce bactérienne, que la bactérie soit Gram+ ou Gram- (Zhiri et *al.*, 2010).

Leur activité antimicrobienne est principalement fonction de leur composition chimique et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Daroui-Mokaddem, 2012).

II.19. Action antifongique

Les modes d'actions antifongiques sont assez semblables à ceux décrits pour les bactéries. Cependant, il faut y ajouter 2 phénomènes supplémentaires inhibant l'action des levures: L'établissement d'un gradient de pH et le blocage de la production d'énergie des levures ("phénomène de respiration").

Les huiles essentielles possèdent plusieurs modes d'action sur les différentes souches bactériennes, mais d'une manière générale leurs actions se déroulent en trois phases:

- attaque de la paroi bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité puis la perte des constituants cellulaires;
- acidification de l'intérieur de la cellule, bloquant la production de l'énergie cellulaire et la synthèse des composants de structure;

- destruction du matériel génétique, conduisant à la mort de la bactérie (Djarri, 2010).

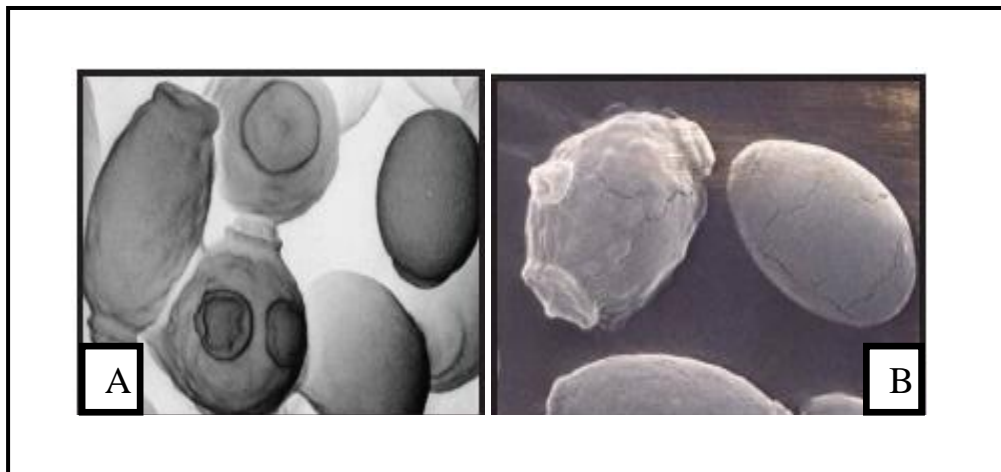


Figure 13: Images au microscope électronique à balayage de *Saccharomyces cerevisiae*, avant (A) et après traitement (B) à HE d'origan à 0,2 % (100 x) (Djarri., 2010). (A) *saccharomyces cerevisiae*, (B) la surface cellulaire montre des craquelures qui la parcourent dans tous les sens.

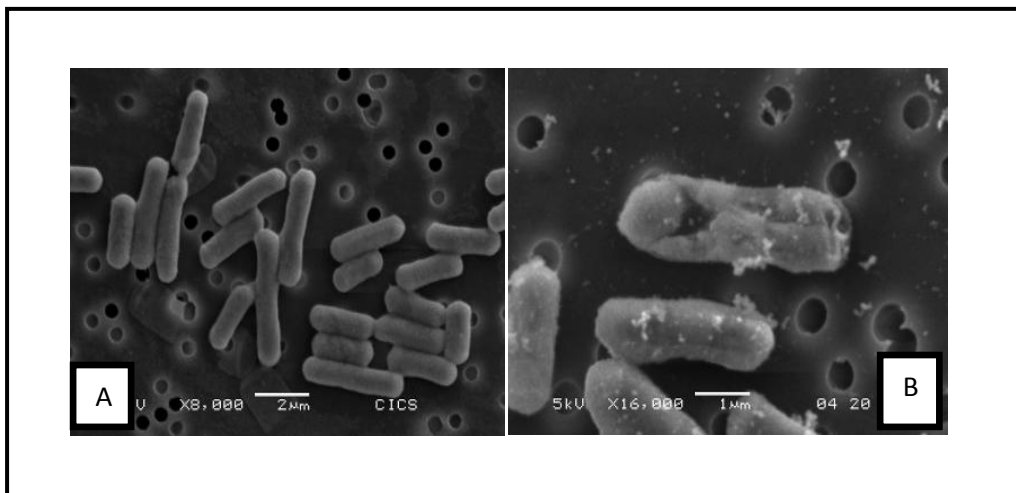


Figure 14 : Aspect des cellules de *Costridium perfringens*) traitées (B) ou non (A) par des HEs (Recoquilly, 2009).

II.20. Facteurs déterminant le degré de l'activité antimicrobienne des huilés essentielles

Plusieurs paramètres influencent la détermination de l'activité antimicrobienne des HES ou de leurs composants actifs, tels que la méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne, l'effet de la matrice biologique, le type et la structure moléculaire des composants actifs, la dose ajoutée, le type de microorganismes ciblés et leur éventuelle adaptation aux HES (Maleky, 2010).

II.20.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

Les méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne des HES les plus couramment utilisées sont la 'méthode de diffusion dans l'Agar et la 'méthode de dilution'. L'activité antimicrobienne des HES est différente selon la méthode suivie (Maleky, 2010).

II.20.2. L'effet de la matrice biologique

Les propriétés antimicrobiennes des HES sont différentes en fonction de la matrice à laquelle elles sont ajoutées, ou du fait du contact avec les macromolécules comme les lipides ou les protéines qui protègent les bactéries de l'action des HES. Ainsi les HES diluées dans la phase lipidique des aliments seront moins efficaces sur les bactéries de la phase aqueuse (Bouguerra, 2012).

II.20. 3. Le type et la structure moléculaire des terpénoïdes

Le principal facteur modifiant l'activité antimicrobienne des HES est le type ainsi que la structure moléculaire de ses composants actifs. Ainsi *in vitro*, une activité antimicrobienne plus élevée des terpènes oxygénés en comparaison des terpènes hydrocarbures a été observée. Les composants oxygénés purs ont aussi montré une activité supérieure par rapport aux HES dans lesquelles ils se trouvent (Maleky, 2010).

La structure moléculaire semble présenter un rôle aussi important que la présence d'oxygène dans la molécule de terpène: la caractéristique lipophile du squelette hydrocarboné ainsi que la propriété hydrophile des groupes fonctionnels sont déterminants *vis à vis* de l'activité antimicrobienne des terpénoïdes (Maleky, 2010).

II.20.4. Le type des microorganismes ciblés

Un autre paramètre important déterminant l'activité antimicrobienne des HES est le type des microorganismes ciblés. En général, les différents microorganismes n'ont pas une sensibilité similaire *vis à vis* des HES (Bouguerra, 2012).

II.21. Effet Bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles

A la manière des agents chimiques, on distingue deux sortes d'effets des HES sur les microorganismes, une activité létale (**bactéricidie**) et une inhibition de la croissance (**bactériostasie**). L'activité des HES est souvent assimilée à une activité bactériostatique.

Cependant certaines études ont montré que certains constituants chimiques des HEs ont des **propriétés bactéricides** (Carson et Riley, 1995; Lambert et *al.*, 2001; Kunle et *al.*, 2003; Walsh et *al.*, 2003) et fongicides (Hammer et *al.*, 2003 ; Pibiri, 2005).

II.22. Toxicité des huiles essentielles

Les huiles essentielles ne sont pas des produits qui peuvent être utilisés sans risque. Comme tous les produits naturels: "ce n'est pas parce que c'est naturel que c'est sans danger pour l'organisme". Certaines HEs sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau en raison de leur pouvoir irritant (huiles riches en thymol ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde ou phototoxique (huiles de *citrus* contenant des furocoumarines. D'autres HEs ont un effet neurotoxique (huiles riche en α -thujone) ou cancérigènes. C'est le cas par exemple de dérivés d'allylbenzènes ou de propénylbenzènes comme le saffrole (*Sassafras*), l'estragole (*Artemisia dracuncululus*), la β -asarone (*Acorus calamus*) et le méthyl-eugénol. Des chercheurs ont mis en évidence l'activité hepatocarcinogénique de ces composés chez les rongeurs. De plus, tout dépend de la dose administrée lors des expériences et bien souvent la dose absorbée par l'animal est loin de correspondre à celle qu'un homme est susceptible d'ingérer par jour (Pionchon, 2008).

Chapitre III.

*Les Altérations Alimentaires et les
Additifs*

III. 1. Les différentes origines des altérations alimentaires

La détérioration des aliments peut avoir diverses origines:

- Attaques d'insectes ou de rongeurs;
- Actions physiques (gel, écrasement au cours de la récolte ou du transport, flétrissement par déshydratation, etc.);
- Détériorations chimiques (brunissement, rancissement par oxydation, rassissement du pain et des pâtisseries);
- Altérations dues à l'évolution naturelle des aliments (ramollissement exagéré des fruits, etc.);
- Altérations d'origine microbienne (Becila, 2009).

III.2. Les altérations causées par l'oxydation lipidique

L'altération des huiles et des graisses est un phénomène complexe dépendant du type de corps gras, des traitements technologiques subis mais aussi des conditions de conservation (présence d'air, lumière, catalyseurs, antioxydants, etc.).

L'oxydation peut se produire durant le traitement des graisses à partir des matières premières jusqu'au stade final ainsi que pendant le stockage, la conservation et l'utilisation (Becquart, 2011). Elle constitue un des problèmes majeurs des procédés de transformation ou de conservation des aliments (huiles et graisses, seules ou constitutives des aliments). Cette altération des composants liposolubles tels que les vitamines ou les pigments conduit également à des détériorations de constituants non lipidiques comme les protéines. La peroxydation lipidique aboutit à la dégradation des propriétés biochimiques, organoleptiques et nutritionnelles des aliments.

Les facteurs qui influencent l'oxydation des lipides sont nombreux. Il s'agit d'une part de facteurs intrinsèques tels que la composition en résidus d'acides gras des lipides (nombre et position d'insaturations), la présence de prooxydants (ions métalliques, hèmes, enzymes) ou d'antioxydants naturels (tocophérols, caroténoïdes, etc). D'autre part, les principaux facteurs extrinsèques sont la température, la lumière, la pression partielle en oxygène, et l'activité de l'eau (Guzun, 2010).

III. 2.1. Mécanisme d'oxydation des lipides

Il s'agit d'une réaction en chaîne typique qui débute par la formation d'un radical (initiation) qui réagit ensuite avec l'oxygène atmosphérique sous forme triplet (situation énergétique normale de l'oxygène) pour former un radical peroxyde.

En l'absence de l'oxygène la formation de radicaux peroxyde sera moins prononcée. A leur tour, ces derniers extraient un radical hydrogène d'un acide gras insaturé intact initiant la réaction de propagation étant donné que, de cette manière, un nouveau radical d'acide gras est constitué à côté d'un hydroperoxyde. Le radical d'acide gras réagit de manière similaire à celle du radical d'acide gras précédent. La fin dans ce mécanisme de réaction en chaîne peut se faire de différentes manières et consiste en la réaction d'un des radicaux formés avec un autre radical de sorte qu'un produit final non radicalaire se forme (Eymard, 2003). Le mécanisme réactionnel est illustré dans la figure ci-après.

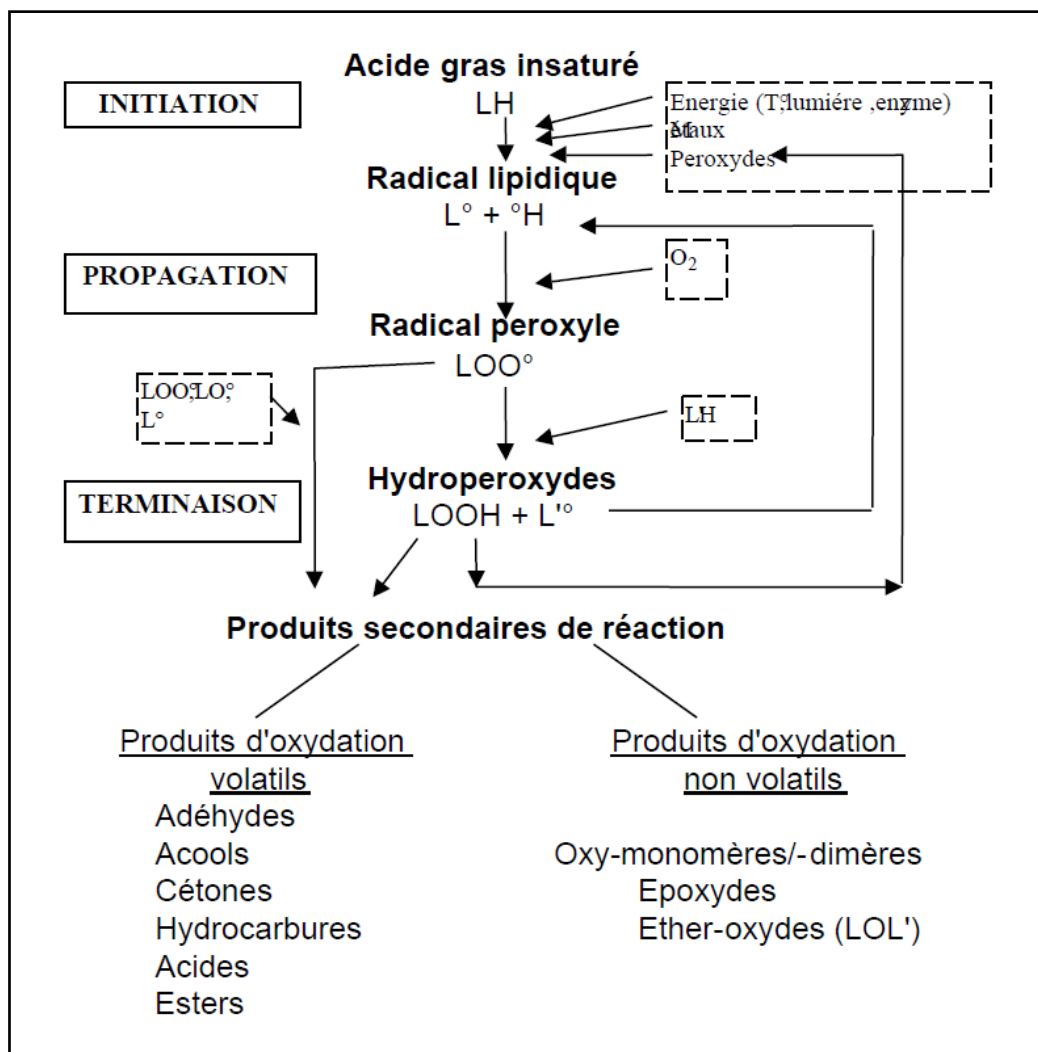


Figure15 : Mécanisme d'oxydation des lipides (Eymard, 2003).

III. 3. Les altérations d'origine microbienne

En dehors des apports minéraux indispensables, les aliments sont considérés tous comme des produits d'origine animale ou végétale ; ces produits issus "du vivant" sont fragiles et susceptibles d'évoluer dans le temps. Cette évolution peut être bénéfique, mais dans la plupart

du temps, la détérioration des aliments est observée. Cette dernière constitue un problème d'une ampleur considérable si l'on considère qu'elle touche, par exemple, près du quart des fruits, légumes et céréales récoltés chaque année. D'autre part, un nombre important denrées alimentaires doit être jeté avant sa consommation car il est rendu impropre à la consommation (avarié) du fait du développement de microorganismes (Becila, 2009).

III.3.1. Action des microorganismes dans les aliments

Le développement des microorganismes dans un aliment peut avoir deux actions néfastes et variées qui sont:

- L'affectation de la qualité intrinsèque de l'aliment et donc sa valeur commerciale par la modification de sa texture et de son aspect par dégradation des macromolécules ou des substances colorantes, par formation de colorations parasites, par libération de gazs ...etc;
- L'altération de la valeur calorique et alimentaire, altération des qualités organoleptiques, dégradation au cours du conditionnement etc....) (Guiraud et Galzy, 1980).

Ces actions sont dangereuses pour la santé en étant responsable d'intoxications dues à la formation de substances toxiques (amines), ou même d'infections ou toxi-infections intestinales bénignes (Guiraud et Galzy, 1980).

La capacité de ces organismes à se développer et à causer des dommages dépend des propriétés intrinsèques de la nourriture et des facteurs extrinsèques qui y sont appliqués. Les dégradations visibles d'origine microbienne peuvent prendre différentes formes parmi lesquelles la décoloration, la pigmentation, et l'épaississement de la surface (Becila, 2009).

III. 3.2.Moyens de prévention de ces altérations

- Les traitements thermiques: la chaleur tue la totalité (stérilisation), ou une partie (cuisson, pasteurisation) des microorganismes;
- Le froid (réfrigération, congélation, surgélation) inhibe leur développement;
- La déshydratation (concentration, dessiccation, lyophilisation) rend impossible l'activité bactérienne;
- L'élévation de la pression osmotique qui revient à la diminution de la disponibilité de l'eau dans l'aliment: sucrage et salage (le sel ayant aussi un rôle bactériostatique important);

- L'élévation de l'acidité: les acides peuvent être ajoutés ou obtenus dans l'aliment par fermentation (acide lactique, produit de la fermentation lactique, acide acétique). Certaines bactéries ne peuvent se développer en milieu acide;
- Les radiations ionisantes (seuls certains traitements sont autorisés);
- Le contrôle des fermentations industrielles, qui limite le développement de micro-organismes indésirables, par compétition;
- Le nettoyage et la désinfection du matériel utilisé dans le stockage et la fabrication des aliments (Gounelle de Pontane, 1980);
- Utilisation des additifs alimentaires.

III. 3.3.Les additifs alimentaires

L'expression additif alimentaire s'entend de toute substance qui n'est pas normalement consommée en tant que denrée alimentaire, et n'est pas normalement utilisée comme ingrédient caractéristique d'une denrée alimentaire, qu'elle ait ou non une valeur nutritive et dont l'addition intentionnelle à la denrée alimentaire, dans un but technologique ou organoleptique, à une quelconque étape de la fabrication, de la transformation, de la préparation et du traitement, du conditionnement, de l'emballage, du transport ou du stockage de la denrée, entraîne ou peut entraîner son incorporation ou celle de ses dérivés dans la denrée. Les additifs alimentaires sont classés en fonction de leur rôle fonctionnel en une dizaine de classes incluant entre autres les conservateurs, et les antioxydants (Tableau V) (Soubra, 2008).

III. 3.3.1.Les antioxydants

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes:

1. Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers;
2. Ils détruisent les hydro-peroxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison (O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (Penchev, 2010).

Il est habituel de dire qu'un bon antioxydant est un bon « capteur » de radicaux libres. Toutefois, cette condition n'est pas suffisante; il faut en outre que l'antioxydant soit régénéré (recyclé) *in vivo* de manière à jouer plusieurs fois son rôle (Gardes-Albert et *al.*, 2003).

Lorsque des espèces réactives de l'oxygène sont générées *in vivo*, de nombreux antioxydants interviennent. Il s'agit principalement d'enzymes telles que la superoxydase dismutase, la

glutathion peroxydase, la catalase et aussi des molécules de faible masse moléculaire comme le tripeptide glutathion ou l'acide urique. En plus de ces substances propres à l'organisme, les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures. Ce sont pour la plupart des composés polyphénoliques. Un composé polyphénolique est tout composé possédant un noyau aromatique contenant un ou plusieurs substituant (s) hydroxyle, incluant différents groupes fonctionnels dérivés (esters, glycosides, etc.). Ils sont répandus parmi les plantes alimentaires. Parmi ces composés, les flavonoïdes représentent la classe de substances la plus étudiée, Il faut également mentionner d'autres classes de substances antioxydantes telles que les tanins, les xanthones, les coumarines, les carotènes, les lignanes (Amadou, 2004).

III. 3.3.2. Les conservateurs

Ils sont utilisés pour éviter le développement des bactéries, levures, moisissures ou champignons qui peuvent altérer le goût ou l'aspect au point de rendre inconsommable un produit alimentaire, mais aussi certains microorganismes peuvent être responsables d'intoxications, soit par eux-mêmes (bactéries pathogènes), soit par les toxines qu'ils sécrètent (toxine du *Clostridium botulinum*, mycotoxines, . . .), parmi les conservateurs utilisés:

- Le sel est utilisé depuis l'Antiquité pour la conservation des viandes, charcuteries, poissons, fromages, etc... Il a un rôle bactériostatique et a également une action sur les propriétés physico-chimiques des aliments;
- L'anhydride sulfureux (E 220) et les sulfites sont employés pour conserver les vins rouges et blancs, bière, cidre, hydromel, jus de fruits, ainsi que les moutardes, les confitures et les fruits secs;
- Le nitrite de sodium (E 250) et les nitrates sont couramment ajoutés aux produits de charcuterie. Les nitrites ont un rôle inhibiteur de *Clostridium botulinum*, bactérie produisant la toxine botulinique mortelle pour l'homme;
- Les acides aliphatiques ou dérivés sont utilisés comme conservateurs: l'acide acétique (E 260); l'acide propionique (E 280), et l'acide sorbique (E 200);
- Quelques antibiotiques sont autorisés: la pimaricine qui est un inhibiteur des moisissures de la croûte des fromages. La nisine est utilisée dans la fabrication des fromages fondus.

Il arrive souvent que plusieurs conservateurs soient utilisés simultanément, par exemple en combinant deux ou trois des produits suivants: anhydride sulfureux, acide benzoïque, acide sorbique dans les boissons (Gounelle de Pontane, 1980).

Tableau VI: Les principales catégories d'additifs utilisés dans l'Union européenne (André, 2013)

Codes	Catégorie	Fonction dans l'aliment
E100 à E180	Colorants	Intensifier ou donner une couleur.
E200 à E285	Conservateurs	Allonger la durée de conservation en inhibant le développement des bactéries ou des moisissures.
E300 à E321	Antioxydants (antioxygène)	Limiter les phénomènes d'oxydation (rancissement des graisses ou brunissement des fruits et légumes coupés, par exemple).
E325 à E380	Acidifiants/ Correcteurs d'acidité	Agir sur le degré d'acidité.
E400 à E495	Agents de texture (épaississants, stabilisants, émulsifiants, gélifiants, texturants)	Donner une consistance particulière.
E500 à E585	Catégorie « fourre-tout » comprenant des poudres à lever, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, des phosphates, des correcteurs d'acidité	Remplir des rôles variés.

III.4. Les effets négatifs des additifs alimentaires

Beaucoup d'additifs ont des effets douteux sur la santé et sont parfois remis en cause, mais non interdits ce qui est une source d'une grande controverse autour des additifs alimentaires. De plus, le consommateur les considère comme des produits chimiques, donc mauvais. Parmi les effets néfastes prouvés:

- **L'hyperactivité:** L'hyperactivité est un déficit de l'activité motrice et de l'attention qui perturbe l'efficacité scolaire de l'enfant qui s'accompagne de réactions agressives. Des chercheurs de l'université de Southampton ont confirmé cette hyperactivité en faisant des tests sur des colorants et des conservateurs.
- **Problèmes intestinaux:** Les additifs alimentaires, dont les colorants, et les émulsifiants peuvent provoquer une diminution de l'absorption intestinale et un

bouleversement de la flore intestinale. Ils irritent le tube digestif et perturbent la digestion. Ils seraient aussi responsables d'un ralentissement de l'absorption des nutriments au niveau de l'intestin grêle.

- **Allergies:** Toute une variété de substances sont mises en causes dans les allergies, qui touchent surtout les personnes sensibles. Ces substances engendrent une réaction immunitaire exagérée et des substances chimiques sont libérées, provoquant divers troubles comme des démangeaisons, de l'urticaire, des problèmes respiratoires, des œdèmes, et des troubles digestifs.
- **Effet carcinogène:** Le but des études de cancérogénèse est de démontrer qu'une substance est capable ou non d'induire une prolifération anormale des cellules aboutissant à la formation de tumeurs. Les nitrites provoquent la formation de nitrosamines et de nitrosamides cancérigènes.
- **Accoutumance:** Les exhausteurs de goût agiraient sur les neurones, empêchant le bon fonctionnement des mécanismes inhibiteurs de l'appétit. Les édulcorants sont parfois déconseillés par les nutritionnistes parce qu'ils entretiendraient l'attrait pour le sucre. Ainsi, les consommateurs réguliers de produits sucrés avec des édulcorants intenses auront tendance à choisir des produits plus sucrés, ce qui pourrait favoriser notamment l'obésité en augmentant l'apport calorique (Tehrany et *al.*, 2009).

Pour palier à ces problèmes qui présentent un grand risque pour la santé publique, de nombreuses recherches se sont penchées sur les plantes et la possibilité de les utiliser comme alternative à la conservation des aliments par ces additifs, mais aussi à la lutte contre les parasites, les insectes, les microorganismes et aussi contre les radicaux libres, puisque la qualité d'une denrée alimentaire commence de la matière première jusqu'au produit fini.

En effet, l'antioxydant alimentaire idéal, est facilement incorporable et efficace à faible dose, non toxique, n'entraîne ni coloration, ni odeur, ni saveur indésirable. Il est résistant aux processus technologiques et stable dans le produit fini (Kahouli, 2010).

III. 5. Utilisation des huiles essentielles dans la conservation des denrées alimentaires

La préservation des produits alimentaires à caractère périssable constitue un des domaines d'utilisation des plantes aromatiques et médicinales. Les plantes et les tissus animaux contiennent des acides gras insaturés, la fraction phospholipidique des membranes cellulaires contient des lipides qui sont spécialement susceptibles à l'oxydation à cause de la présence des doubles liaisons. Les produits de cette oxydation peuvent induire une perte de nutriments dans les aliments et une détérioration de leur qualité organoleptique (Brewer, 2011).

En outre, les industriels et les consommateurs ont exprimé leur désir de réduire l'utilisation des composés synthétiques dans la conservation des aliments. Alors, les herbes et les épices ainsi que les plantes aromatiques douées d'une activité antimicrobienne pourront constituer une source d'additifs naturels (Delaquis, 2002). Les HEs des plantes sont une réserve de molécules très actives ayant relativement toutes les propriétés citées ce qui favorise leur utilisation de la matière première jusqu'au produit fini, d'autant plus qu'elles sont reconnues comme produit GRAS (Generally recognized as safe).

Beaucoup d'études ont rapporté l'efficacité des HEs contre les germes pathogènes, et les contaminants dans les aliments, exemple de *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Smith-palmier, 1998; Lambert, 2001; Delaquis, 2002; Gutierrez, 2008; Djenane, 2012) et contre les espèces fongiques, telles que *Aspergillus flavus*, *Penicillium roqueforti*, *Mucor plumbeus* and *Eurotium sp.*), ainsi que les levures (*Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranaefaciens*, *Zygosaccharomyces rouxii* et *Candida lipolytica*) (Matan et al., 2006). Néanmoins, une concentration élevée en HEs est nécessaire pour avoir les mêmes effets sur les aliments que *in vitro*, donc l'impact sur la qualité organoleptique de l'aliment doit être pris en considération (Delaquis, 2000; Gutierrez, 2008). Un des pays qui ont franchi le pas vers les additifs naturels est le Japon avec l'extrait d'eucalyptus (Amakura et al., 2002).

Certaines drogues naturelles sont utilisées sous forme d'épices et d'aromates, d'autres sous forme d'HEs. Si la réfrigération et d'autres moyens de conservation se sont substitués aux épices pour assurer la conservation des aliments, le développement de nouvelles pratiques culinaires (plats préparés, surgelés), le goût pour l'exotisme et les qualités gustatives, conduisent à une rapide augmentation de la consommation de ce type de produits. On note leur intégration dans les boissons non alcooliques, les confiseries, les produits laitiers ou carnés, les soupes, les sauces, les snacks, les boulangeries, ainsi que la nutrition animale (Couderc, 2001).

Des études antérieures, ont montré que les HEs peuvent être ajoutées presque à tous les aliments. Ainsi, les HEs d'origan, de thym, de cannelle ou de coriandre sont efficaces pour les viandes, les volailles, les charcuteries et les légumes. L'HE de la menthe pour les produits frais (salades, yaourts...); celles à base de carvacrol ou de citral pour les poissons. Les HEs de thym, de noix de muscade ou de gingembre pour les céréales (plus particulièrement celles riches en carvacrol pour le riz); et les HEs à base de carvacrol ou de cinnamaldéhyde pour les

fruits (Rhayour, 2002; Caillet et Lacroix, 2007). L'eugénol et le cinnamaldéhyde, extraits à partir d'HE du *Cinnamum*, comptent parmi les principaux agents de conservation alimentaire, d'origine végétale. Ils sont employés comme additifs pour la préservation des olives de table contre la flore cryptogamique (Daroui-mokaddem, 2012).

Toutefois, quelques limites s'imposent dans l'utilisation des HEs comme agents de conservation dans les aliments, notamment le pouvoir aromatisant de certaines d'entre elles. Cependant des techniques de désaromatisation existent et sont de plus en plus efficaces. D'autre part, les effets organoleptiques indésirables peuvent être limités en sélectionnant soigneusement l'HE selon le type d'aliment considéré, mais il est important de noter, que dans la plupart des cas, les concentrations d'huiles utilisées sont si faibles, qu'elles ne modifient pas les qualités organoleptiques de l'aliment. Un autre aspect à prendre en compte, c'est de vérifier que l'HE sélectionnée n'a pas d'effet antimicrobien contre les bactéries utiles, notamment les ferments d'acidification, d'aromatisation et d'affinage, indispensables à la fabrication des produits. Moyennant ces précautions d'usage, l'emploi des HEs lors de la transformation des aliments peut présenter un triple intérêt: aromatisant, antioxydant et antimicrobien (Caillet et Lacroix, 2007).

Chapitre IV.

Matériels et Méthodes

Dans le but d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés, nous avons suivi le plan de travail suivant :

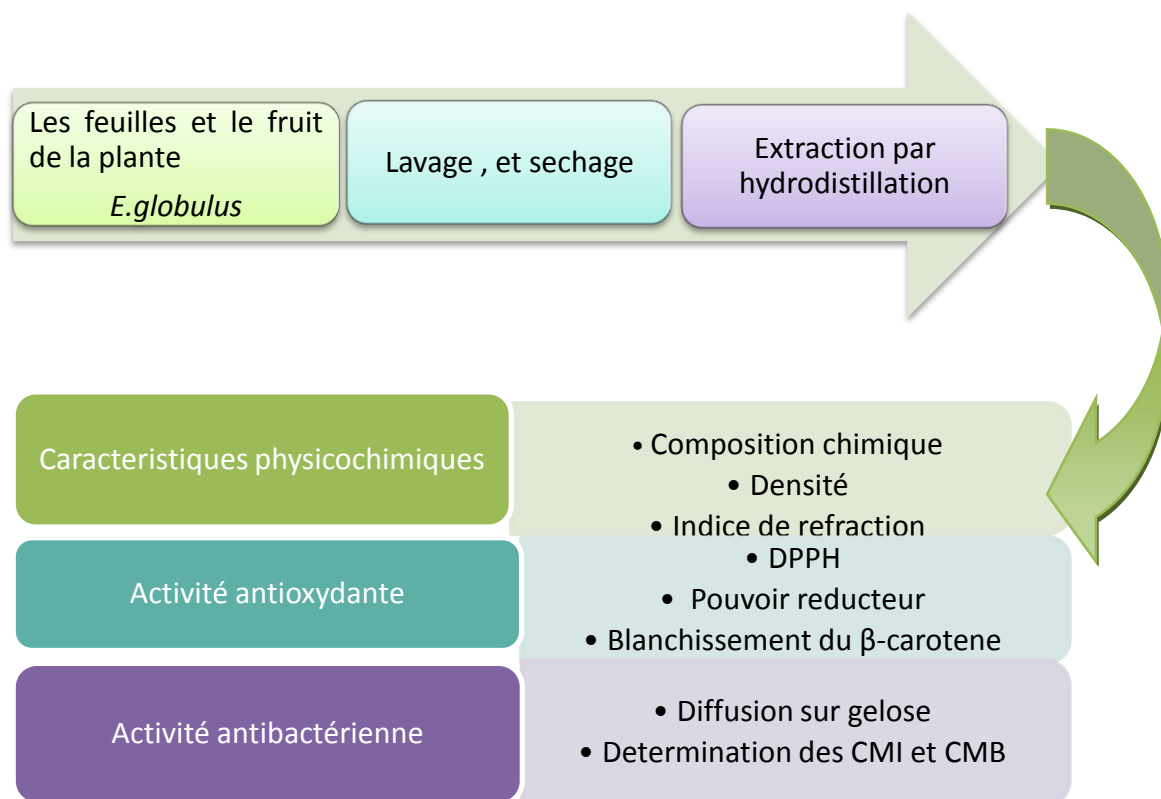


Figure 16 : Schéma général du travail expérimental

IV. 1. Préparation de l'échantillon

Le fruit et les feuilles de la plante *E. globulus* ont été récoltés au mois de Février de l'année 2014 dans l'arboretum de la commune de Derguinah, willaya de Bejaïa (36°31'13.56''N, 5°17'18.43 E). Les échantillons sont lavés et séchés à l'ombre et à température ambiante pendant une dizaine de jours.

IV. 2. Extraction de l'huile essentielle

L'extraction des HEs de *E. globulus* est réalisée par hydro-distillation pendant 2 h et 30 min. L'hydrodistillation des deux parties a été accomplie à l'aide d'un dispositif de type Clevenger (Figure 17).



Figure 17: Photographie du dispositif utilisé pour l'extraction des HEs par hydrodistillation. Dans un ballon de 2 L, une quantité du matériel végétal (150 g) est mise en contact direct avec 1000 mL d'eau distillée. La vapeur condensée obtenue correspond à une phase organique (huile essentielle) qui est séparée de l'eau aromatique par décantation comme le montre la figure suivante:



Figure 18: Photographie montrant la séparation des HEs par décantation.

Afin d'éliminer l'eau susceptible d'avoir été retenue dans la phase organique, un déshydratant (sulfate de sodium anhydre) est additionné, c'est l'opération de séchage. L'HE ainsi obtenue est mise dans des flacons en verre sombre et conservés à 4°C jusqu'à son analyse. Les rendements en HEs ont été calculés par rapport au matériel végétal sec.

C'est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la plante utilisée. Il est exprimé en pourcentage et calculé par la formule suivante :

$$R(\%) = \frac{\text{Poids de l'huile essentielle} * 100}{\text{poids sec de la plante}}$$

IV. 3. Détermination de la composition chimique

Les HEs ont été analysées par chromatographie phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (ThermoScientific). La colonne utilisée est une colonne DBWAX capillaire (30 m, 0,25 mm de diamètre, l'épaisseur de film de 0,25 µm).

L'analyse a été effectuée en utilisant de l'hélium comme gaz porteur à 1,2 mL/min avec le programme de température suivant: 40 °C pendant 2 min, porté à 250 °C à 5 °C / min et à 300 °C à 30 °/ min et maintenu à cette température pendant 10 min. 1 µL d'échantillon a été injectée à une température constante de 250 °C avec un rapport de 1:20 pendant 1 min. Les masses scannées sont comprises entre 40 et 650 uma.

IV. 4. Etude des propriétés physiques (Normes AFNOR, 1992)

IV.4. 1. Densité relative à 20°C (NFT 75 111, 1982)

La densité relative de l'HE est le rapport de la masse d'un certain volume de l'huile à 20°C et la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20°C.

La densité est ainsi donnée par la formule ci-dessous:

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - M_0}$$

Où :

m_0 : est la masse, en grammes, du pycnomètre vide ;

m_1 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d'eau ;

m_2 : est la masse, en grammes, du pycnomètre rempli d' HE.

IV.4. 2. Indice de réfraction (NFT 75 112, 1977)

Les indices de réfraction sont mesurés à l'aide d'un réfractomètre à la température de chambre puis ramenés à 20°C par la formule:

$$I_{20} = I_t + 0,00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

Où: I_{20} : indice à 20°C ;

I_t : indice à la température de chambre (ambiante);

T : température de mesure. L'étalon pour la réflectométrie servant à ajuster le réfractomètre est l'eau distillée avec un indice de réfraction de (1,333) à 20°C.

L'indice de réfraction n_t (IR) à la température de référence t , est donné par l'équation suivante:

$$n_t(\text{IR}) = n_{t'} + 0,0004 (t - t')$$

Où: n est la valeur de lecture obtenue à la température (t') à laquelle a été effectuée la détermination.

IV. 5. Etude de l'activité antioxydante des huiles essentielles

Le pouvoir antioxydant des deux HEs a été évalué *in vitro* en utilisant trois tests, le test de piégeage du radical DPPH \cdot , le test du blanchissement du β -carotène et le test du pouvoir réducteur du fer.

IV. 5. 1. Effet antiradicalaire du radical DPPH \cdot

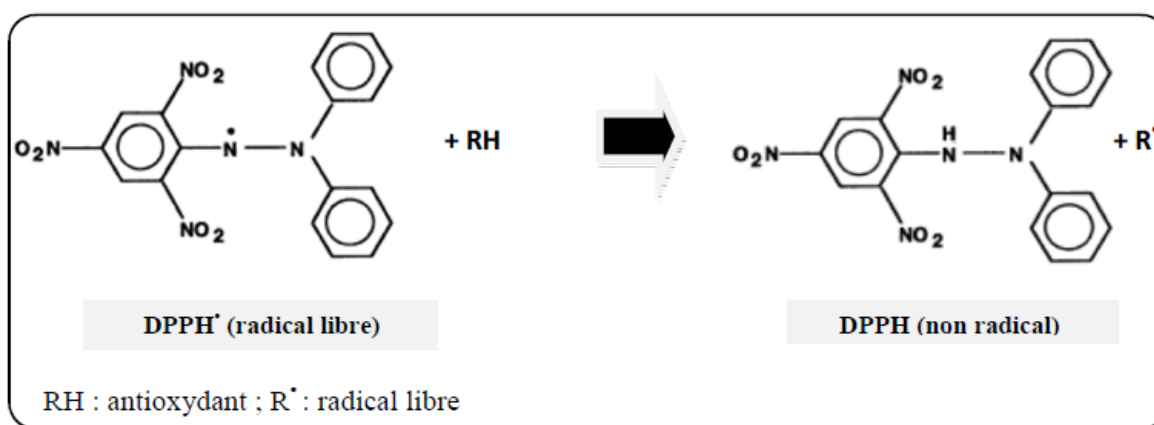
L'activité antioxydante des deux HEs *vis-à-vis* du radical DPPH \cdot a été évaluée par spectrophotométrie suivant la réduction de ce radical qui se traduit par son passage de la couleur violette à la couleur jaune mesurable à 517 nm.

Les antioxydants donateurs d'atome H (RH) sont capables de réduire le DPPH \cdot , ce qui conduit au 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH-H).

◆ Principe

Le DPPH est un radical stable qui possède un électron célibataire sur l'atome d'azote, caractérisé par une couleur violette et un pic d'absorption spectral maximal à 517 nm.

En présence d'un antioxydant l'électron célibataire devient apparié, ce qui conduit à la décoloration du DPPH du violet (forme radicalaire DPPH \cdot) au jaune (forme réduite DPPH-H) (**Figures 19, 20**). Cette décoloration représente donc la capacité de l'échantillon à piéger ce radical.



DPPH \cdot (violet)

DPPH-H (Jaune)

Figure 19: Structure chimique du DPPH \cdot et le mécanisme de sa réduction par un antioxydant.

◆ Procédure expérimentale

L'évaluation de l'activité antioxydante a été effectuée selon le protocole décrit par Noumi et *al.* (2011). À 1mL des différentes concentrations d'échantillons préparées dans l'éthanol, 250 µL d'une solution éthanolique de DPPH préparée à une concentration de 0,2 mM sont ajoutés. Après incubation pendant 30 min à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 517 nm. Le contrôle négatif est réalisé en remplaçant l'échantillon par l'éthanol et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH°, ce pourcentage est calculé selon la formule suivante.

Où:

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = (A_0 - A / A_0) \times 100$$

A_0 : Absorbance de la solution du DPPH° sans l'échantillon (contrôle négatif) ;

A : Absorbance de la solution du DPPH° en présence de l'échantillon.

Les pourcentages du DPPH° résiduels en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH° initiale de 50%. Cette valeur est appelée concentration efficace EC50 et parfois notée IC50.



Figure 20: Photographie montrant la réduction de la solution DPPH° (du violet au Jaune).

IV. 5. 2. Test du blanchissement du β-carotène

Le β-carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de la qualité de ces produits. Le β-carotène est extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation de l'acide linoléique (Belayoubi, 2012).

La mesure de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique et du β -carotène est une méthode efficace pour l'évaluation de l'activité antioxydante des HEs (Hussain *et al.*, 2008).

◆ Principe

Ce test consiste à mesurer à 490 nm la décoloration d'une solution de β -carotène, qui résulte de son oxydation par des radicaux libres produits par l'oxydation de l'acide linoléique sous l'effet de la chaleur. La présence d'antioxydants induit un retard de la cinétique de décoloration de cette solution, ce qui se traduit par une absorbance élevée indiquant que l'échantillon a un grand pouvoir antioxydant.

◆ Procédure expérimentale

L'évaluation du pouvoir antioxydant des HEs en utilisant le test du blanchissement du β -carotène a été réalisée selon la méthode décrite par Tepe *et al.* (2006).

Dans un premier temps, une émulsion de β -carotène/acide linoléique a été préparée en mélangeant 25 μ L d'acide linoléique, 200 mg de tween 40 et 0,5 mg de β -carotène solubilisé dans 1 mL de chloroforme, après évaporation du solvant sous faible pression et à une température de 40C°, 100 mL de l'eau saturée en oxygène sont ajoutés.

À 2,5 mL de l'émulsion de β carotène/acide linoléique, sont ajoutés 350 μ L d'échantillon préparé à une concentration de 2g/L.

L'absorbance de la solution de β -carotène est mesurée à 490 nm toutes les 2 h, durant 48 h d'incubation à température ambiante, contre un blanc constitué de l'émulsion sans β -carotène. Le pouvoir antioxydant est exprimé en pourcentage d'inhibition de l'oxydation de β -carotène selon la formule de Prakash *et al.* (2014):

$$\text{AAR} = A_t (\text{échantillon}) / A_0 (\text{échantillon}) \text{ (Prakash et al., 2014)}$$

AAR: activité antioxydante relative ; A_t : absorbance de l'échantillon à $t=48\text{H}$; A_0 : absorbance de l'échantillon à $t=0\text{H}$.

IV. 5. 3. Test de la réduction du fer ferrique en fer ferreux

◆ Principe

Le test du pouvoir réducteur consiste à évaluer l'aptitude de l'échantillon à donner un electron convertissant le fer de la forme Fe^{3+} à la forme Fe^{2+} qui peut être quantifiée par la mesure de

la formation de la couleur bleu ($\text{Fe}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) à 700 nm (Figure 21). Une absorbance élevée indique que l'échantillon possède un grand pouvoir réducteur.

◆ Procédure expérimentale

Ce test a été effectué selon la méthode de Pal Singh *et al.* (2012); 1,25 mL d'une solution tampon phosphate (0,2M- PH= 6,6) et 1,25 mL (1%) de ferricyanide de potassium [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] sont ajoutés à 0,5mL des différentes concentrations des échantillons. Après incubation de 20 min dans un bain marie à 50°C, 1,25 mL d'une solution aqueuse de l'acide trichloracétique (TCA) à 10% sont ajoutés au milieu réactionnel.

Après centrifugation de 10 min à 3000 g, 1,25 mL d'eau distillée et 250 μL de chlorure de fer(FeCl_3) à 0,1% sont ajoutés à 1,25 mL du surnageant. L'absorbance est déterminée à 700 nm contre un blanc contenant tous les réactifs sauf l'échantillon testé.

Les résultats sont exprimés en concentration effective à 50% (CE50) qui traduit la concentration d'antioxydants nécessaire pour l'obtention d'une absorbance de 0,5.

Le BHA est utilisé comme contrôle positif, dans les trois méthodes de l'évaluation de l'activité antioxydantes (DPPH, réduction du fer, le blanchissement du β carotène), et dans les mêmes conditions expérimentales. Il a été préparé dans de l'éthanol à des concentrations allant de 1/1000 à 1/20 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

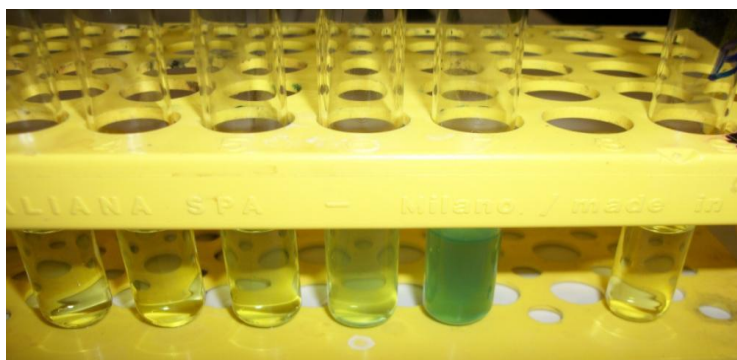


Figure 21: Photographie montrant la réduction du fer ferrique en fer ferreux en présence des HEs de *E. globulus*.

IV. 6. Activité antimicrobienne

Les différents protocoles peuvent être classés selon le milieu dans lequel se fait la diffusion de l'huile essentielle et selon la nature du contact de l'HE avec le germe. Les méthodes les plus utilisées sont: diffusion sur disque, dilution d'agar et dilution de bouillon (Burt, 2004). Ces méthodes sont relativement rapides, peu coûteuses et n'exigent pas un équipement de laboratoire sophistiqué.

IV. 6. 1. Origine et choix des souches microbiennes

Les bactéries étudiées ont été choisies pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité. Elles nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'université de Bejaia. Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 h à 37°C. 3 Bactéries à Gram⁺ et 2 Bactéries à Gram⁻ ont été testées.

Bactéries à Gram positif

Staphylococcus aureus(ATCC43300) : Famille des *Micrococcaceae*, cocci à Gram + ils s'organisent en groupes et en amas ayant la forme de grappes de raisin, immobiles, non sporulés, catalase positive. Pathogène le plus fréquent (infections nosocomial), car ubiquitaire et virulent (Pibiri, 2005).

Bacillus subtilis(ATCC6633): est une bactérie résistante, présente dans les sols. Elle contamine les aliments et une fois ingéré, *Bacillus subtilis* peut être à l'origine d'une intoxication alimentaire.(Guiraud,2003)

L. monocytogene: Petits bacilles à Gram positif, mobile, non sporulé. Aéro-anaérobie facultatif. Les infections à *L. monocytogenes* (Listeriose) sont sérieuses mais heureusement « rares » (Cuq, 2007).

Bactéries à Gram négatif

Escherichia coli(ATCC25922): appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, c'est un hôte normal de la flore intestinale. Cette bactérie est un bacille Gram négatif à mobilité péritriche. En industrie agroalimentaire, *E. coli* est particulièrement contrôlée. En effet, il est un bon indicateur de la contamination fécale d'un aliment lors de son processus de fabrication. Cette espèce ordinairement commensale est entéropathogène par l'expression de facteurs de virulence éventuellement acquis et /ou constitutifs (Cuq, 2007).

Pseudomonas aeruginosa(ATCC27853) : c'est l'exemple-type des bactéries pathogènes opportunistes, la contamination terminale par *Pseudomonas* est classiquement rapportée dans la littérature, touchant la robinetterie et les canalisations d'alimentation mais peu les collecteurs. La bactérie pénètre dans l'installation très souvent par des phénomènes de rétro contamination: mains, projection d'eau, siphons, elle colonise le réseau quand elle trouve un terrain favorable à son développement: température, oxygène, nutriments, support,... (Pibiri, 2005).

IV. 6. 2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (gélose nutritive) ayant au maximum 24h, on racle à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 10 mL d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne; son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland qui correspond à 10^8 UFC/mL, puis diluer pour obtenir un inoculum à 10^6 UFC/mL (Tyagi et Malik, 2011).

IV. 6. 3. Méthode de diffusion sur gélose

Afin de tester l'activité antimicrobienne des HEs, nous avons utilisé la méthode de l'antibiogramme par diffusion à partir de disques imprégnés d'HE (100%, 75%, 50%). Les milieux coulés en boîte de Pétri sontensemencés par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne de 10^6 UFC/mL (Damjanović-Vratnica et *al.*, 2011; Raho et Benali, 2012). Un volume correspondant à 10 μ L d'HE est déposé sur des disques de papier Whatman stériles de 6 mm de diamètre. En parallèle, des témoins sont utilisés afin de vérifier la croissance des différentes souches. Les boîtes de Pétri sont maintenues pendant 30 min à une température de 25-30 °C et sont ensuite incubées à 37°C/24 h. L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure, à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle, des diamètres des zones claires (mm) qui se forment autour des disques (\emptyset du disque est inclus).

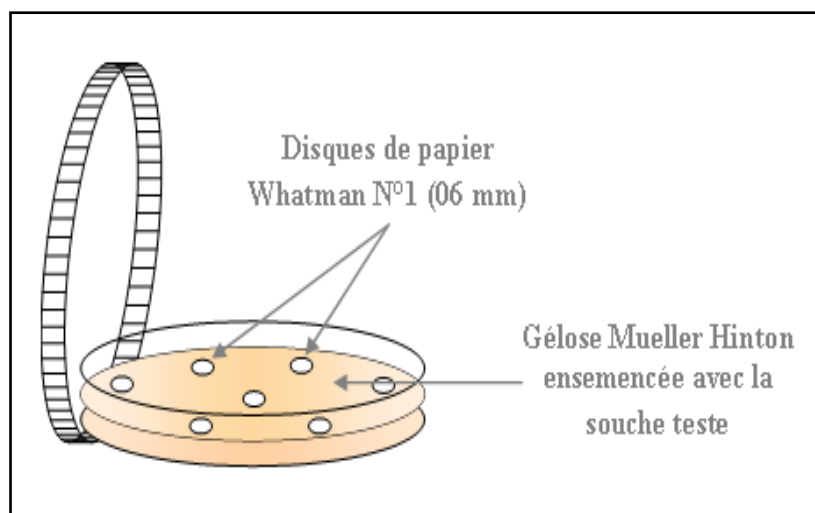


Figure 22: Méthode de diffusion sur disque (Bekka, 2009).

IV. 6. 4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI): Test de micro dilution

Les inocula des différentes souches ont été obtenus à partir de préculture de 18 heures d'incubation, la charge microbienne a été ajustée à 10^6 ufc/mL à l'aide d'une turbidité standard 0,5 McFarland. Les CMI des différentes HEs ont été déterminées par la méthode de microdilutions en puits.

Des plaques contenant 96 puits, ont été préparées en dispersant dans chaque puit des volumes allant de 187 μ L à 194 μ L de bouillon MH, et de 1 à 12 μ L de chaque échantillon d'HE; puis 5 μ L d'inoculum ont été versés dans les puits de chaque plaque, d'une manière à obtenir un volume final de 200 μ L (Djenene et *al.*, 2011).

IV. 6. 5. Détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB)

Pour la détermination de la concentration minimale bactéricide, un prélèvement à partir de la concentration minimale d'inhibition est effectué sur la gélose Mueller Hinton, puis on incube à 37°C pendant 18 à 24h. La concentration minimale bactéricide est défini comme étant la concentration minimale qui ne présente aucune croissance bactérienne (Cherrat et *al.*, 2014).

IV. 7. Analyse statistique

L'analyse statistique est réalisée par le programme XLSTAT 2009. Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne \pm SD. Les valeurs IC50 (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. La détermination des taux de signification sont faites par le test ANOVA univarié suivi du test de Tukey pour les comparaisons multiples. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

Chapitre V.

Résultats et discussions

V.1. Rendement en huile essentielle

Les rendements en HEs des deux parties (feuilles et fruits) sont montrés dans le tableau VII. L'étude statistique n'a révélé aucune différence significative entre eux.

Tableau VII : Rendement d'extractions des HEs

Echantillons	Rendements (%)
Fruits	3,11±0,4
Feuilles	2,53±0,1

Les résultats obtenus pour le fruit sont largement supérieurs à ceux rapportés par Pereira et al. (2005) et Mulyaningsiha et al. (2010), qui sont de 1,57% et 0,71%, respectivement. Mendes silva et ses collaborateurs (2011) ont noté une variation de ce rendement chez *E. cineria*, ce dernier dépend de la saison de récolte, il est de 0,73 en automne et de 0,85% au printemps. En effet, Emara et Shalaby, (2011) ont observé des modifications de conformation des canaux sécréteurs des HEs de *E. globulus* à travers les saisons comme le montre la figure suivante:

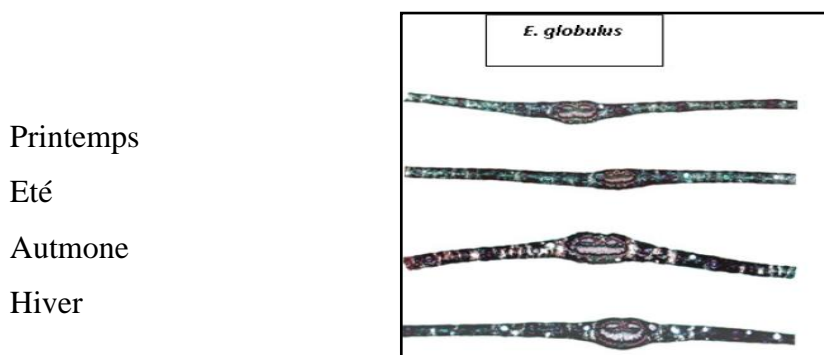


Figure 23 : Coupe transversale des feuilles de *E. globulus*

Il est de même pour les feuilles, puisque nos résultats sont supérieurs à ceux de Raho et al. (2012) qui est de 1,2% (P/P), de Pal singh et al. (2012) qui est de 1,2% (V/P) et de Damjanovic-vratnica et al. (2011) qui est de 1,8% pour les feuilles fraîches. Le rendement en huiles essentielles des plantes est en étroite relation avec l'état de fraîcheur de la plante utilisée pour l'extraction. De nombreux auteurs ont remarqué que les plantes sèches donnent un meilleur rendement que les plantes fraîches, Mendes silva et al. (2011) ont rapporté que les feuilles de *E. cinerea* donnaient un meilleur rendement à l'état sec (4,29%) que frais (3,91%). En outre, le rendement est tributaire de plusieurs facteurs qui sont la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation et le régime des vents exerçant une influence directe (Boukhatem et al., 2010), ainsi que du milieu géographique (Zrira et al., 1994).

V.2. Composition chimique des huiles essentielles des feuilles et du fruit

La composition des deux HEs est donnée dans le tableau VIII. D'après Brian et al. (1979), les HEs des feuilles sont riches en monoterpènes et celles du fruit en sesquiterpènes ce qui correspond aux résultats trouvés dans cette étude (tableau VIII). Le composé majoritaire retrouvé dans les HEs des feuilles est l'eucalyptol à 55,9%. Des taux variant de 23,7 à 80,9% ont été rapportés par Zrira et al. (1994) pour les espèces du genre *Eucalyptus* (*E. sideroxylon*, *E. astringens*, *E. salubris*, *E. sideroxylon*, *E. astringens*, *E. salubris*, *E. brockwaji*, *E. torquata* et *E. salmonophloia*). Des valeurs plus importantes ont été obtenues par d'autres études, avec une teneur en cineole de 79,02%; 85,8%; 91,61%; 85,3% et 95,61%, respectivement (Vilela et al., 2009; Noumi et al., 2010; Damjanovic Vratnica et al., 2011; Mendes et al., 2011; Bharti et al., 2012; Selvakumar et al., 2012). Ces mêmes composés ont été rapportés dans la littérature, avec des différences sur le plan quantitatif.

Tableau VIII: Composition des He des feuilles et du fruit de *E. globulus*

Les composés	Les Hes du fruit(%)	Les Hes des feuilles(%)
Monoterpenes	9,42	6,67
α-pinene	4,86	4,67
β-pinene	0,13	0,07
β-myrcene	0,2	-
α-phellandrene	2,46	-
α-terpinene	0,31	-
O-cymene	0,65	1,85
γ-Terpinene	0,31	0,07
Limonene	0,36	-
Sabinene	0,05	-
Monoterpenes Oxygenés	17,77	79,43
Eucalyptol (1,8-cineol)	12,4	55,9
isovaleraldehyde	3	10,16
2-pentanone-4-hydroxy-4- methyl	1,12	1,17
3-methylbutyl isovalerate	0,07	-
Exo-Fenchol	0,026	-
4-terpineol	1,38	0,7
α-Terpineol	0,31	5,52
Cis-Sabinol	0,18	-
Carvotanacetone	0,13	-
Linalool	-	0,1
2-pinen-4-ol	-	0,07
L-Pinocarvone	-	0,1
Crypton	-	3,13
α-carveol	-	0,07

cuminal	-	0,42
Piperitone	-	0,24
E-Neral	-	0,64
Phelandral	-	0,1
p-cymenol	-	0,46
methyl geranate	-	0,67
Limonene	-	0,03
Sesquiterpenes	35,59	0,34
β -gurjunene	0,49	-
α -copaene	0,24	-
α -humulene	0,26	-
α -gurjunene	1,77	-
Allo-Aromadendrene	25,01	0,03
Aromadendrene	1,85	0,02
τ -gurjunene	0,65	-
Ledene	3,97	0,28
β -Selinene	0,26	-
α -fellandrene	0,15	-
δ -cadine	0,91	-
Sesquiterpenes Oxygenés	72,8	13,89
Epiglobulol	4,26	0,21
Globulol	30	2,99
β -eudesmol	2,67	-
δ -cadinol	0,26	-
β -caryophyllene-oxide	0,14	-
spathulenol	7,52	-
Caryophyllene oxide	1,67	-
δ -cadinol	0,99	-

La composition des HEs est dépendante des facteurs environnementaux tels que le climat, la température, les nutriments (Akin et *al.*, 2010), l'incidence des rayons UV, la saison (Mendes silva et *al.*, 2011) et du processus d'extraction (Recoquillay et *al.*, 2009), mais aussi de la différenciation héréditaires des espèces en forme physiologique distincte (Zrira et *al.*, 1994).

V.3. La densité et l'indice de réfraction

L'analyse statistique a révélé l'existence d'une différence significative entre la densité des HEs du fruit et celles des feuilles, contrairement aux résultats de l'indice de réfraction, où la différence n'est pas significative (Tableau IX).

Tableau IX: Valeurs des indices de réfraction et de la densité des Hés étudiées

Echantillons	Densité	Indice de réfraction
Fruits	0,9051 ± 0,0002	1,4848 ± 0,033
Feuilles	0,9135 ± 0,0036	1,4687 ± 0,007

Ces valeurs sont légèrement supérieures à celles obtenues par Mendes silva et *al.* (2011) pour *E. cicerea* qui sont de 1,463/0,908 pour le fruit et de 1,458/0,909 pour les feuilles. Les indices de réfraction varient essentiellement avec la teneur en monoterpènes et en dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice plus élevé. D'après Hussain et *al.* (2008), l'indice de réfraction et la densité ne sont pas affectés par la variation des saisons. Pour certains auteurs, un faible indice de réfraction de l'HE indique sa faible réfraction de la lumière ce qui pourrait favoriser son utilisation dans les produits cosmétiques (Boukhatem et *al.*, 2010).

V.4. Activité antioxydante

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des HEs sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant. Selon la bibliographie, les méthodes les plus utilisées sont celles de la réduction du 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•), de l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique et celle de la chélation des métaux.

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des HEs des feuilles et du fruit de *E. globulus* a été réalisée par trois techniques chimiques : la réduction de fer, le piégeage du radical libre DPPH, et le blanchissement du β carotène.

V.4. 1. Piégeage du radical libre DPPH

L'utilisation de ce test pour l'évaluation de l'activité antioxydante est avantageuse ou préférable puisque c'est un radical plus stable que les radicaux hydroxyl ou superoxyde.

Les résultats de l'activité antiradicalaire des deux HEs et du standard (BHA) exprimés en pourcentage sont illustrés par la figure ci-dessous:

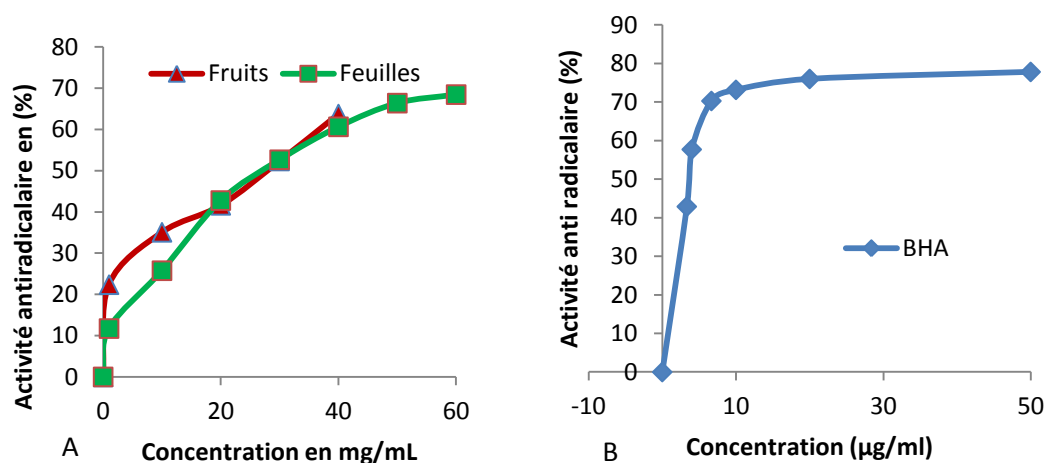


Figure 24: Activité anti radicalaire des HEs des (feuilles et fruits) (A) et du BHA et (B).

L'allure exponentielle des deux courbes, signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction du radical libre et la concentration de l'échantillon dans le milieu réactionnel. Les résultats montrent que l'He des fruits est doué d'une activité antioxydante supérieure à celles des feuilles.

L'analyse statistique indique une différence significative entre les valeurs des concentrations requises pour inhiber les 50% des radicaux libres des He des feuilles et du fruit et celle de l'antioxydant synthétique (BHA) (Tableau XI). Elle a permis de classer les différents échantillons selon l'ordre suivant: BHA>Fruit>Feuilles

Tableau XI : Valeurs des IC 50 des deux échantillons

Echantillons	Valeurs des IC 50 mg/mL
Fruits	27,0413 ± 0,1728
Feuilles	33,3290 ± 0,550
BHA	3,9630 ± 0,287

Les pourcentages d'inhibition notés pour les deux échantillons varient de 11,72 à 60,63% pour les feuilles, de 22,35 à 63,73% pour les fruits et ceci pour des concentrations variant de 1 à 40 mg/mL, respectivement. L'effet anti radicalaire noté pour le BHA est compris entre 37,69 à 77,89% pour des concentrations variant de 1µg à 50µg.

Les résultats de notre étude montrent des valeurs des IC50 (feuilles) plus importantes que celle de Noumi et *al.* (2012) qui est de 57 µg /mL, mais inférieures à celles de Jubril Olayinka et *al.* (2012) qui est de 136 µL/mL pour des feuilles fraîches, et celle de Singh et *al.* (2012) qui est de 425±6,79 µg/mL. D'après une étude menée par Sacchetti et *al.* (2005), les HEs des feuilles de *E. globulus* ont montré une faible activité antiradicalaire avec un taux d'inhibition inférieur à 25%, ceci est justifié par l'abondance des monoterpènes. Mishra et *al.* (2010) ont noté 50% d'inhibition pour une concentration de 30% (v/v). Selon Martins et *al.* (2014), le faible taux d'inhibition du radical DPPH pourrait être attribué à l'inefficacité des composés monocarbonés. D'après Ruberto et Baratta, (2000) citée dans Martins et *al.* (2014), les monoterpènes suivant: α pinene, β pinene, limonène, β myrcene, sabinene et terpinolene ont des propriétés antioxydantes, mais certains d'entre eux peuvent montrer une activité faible dépendante du mécanisme utilisé dans la réaction.

Les HEs comprennent plusieurs composés, chacun d'entre eux contribue à leurs activités biologiques. Une activité antioxydante modérée du terpinène et ses dérivés a été citée dans la littérature, par contre le pinene et le cymene possèdent une activité relativement non significative. Par ailleurs, une forte activité antioxydante des HEs est attribuée à leurs groupements phénoliques comme le thymol, le carvacrol et probablement aux 1,8 cineole (Jubril Olayinka et *al.*, 2012).

V.4. 2. Test de blanchissement du β carotène

Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique génère des radicaux peroxyde qui oxyderont le β-carotène hautement insaturé entraînant ainsi la disparition de sa couleur rouge, qui est suivie au spectrophotomètre à 490 nm.

La cinétique du blanchissement du β-carotène en absence et en présence des HEs et du BHA est présentée dans la figure 25. L'efficacité d'un antioxydant se traduit par une faible décoloration de la solution contenant le β carotène, et une faible diminution de l'absorbance (Husain et *al.*, 2008).

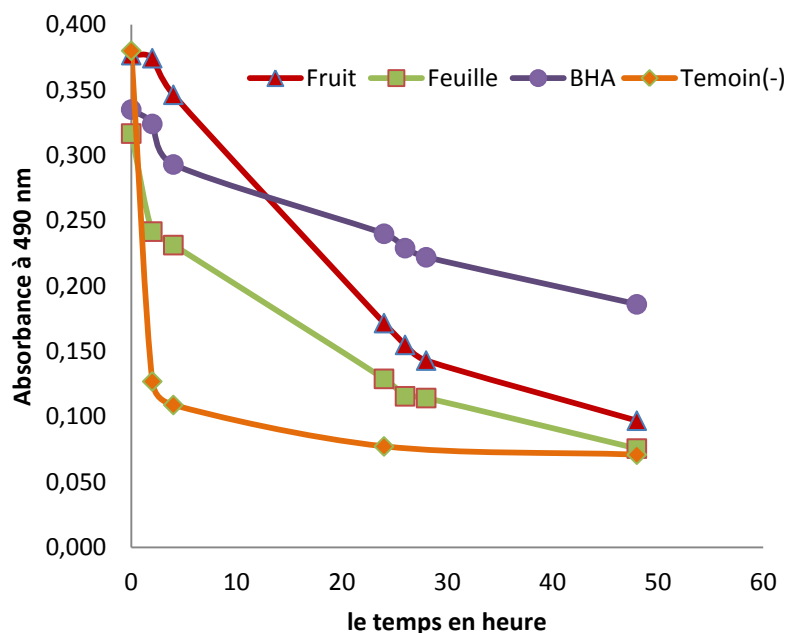


Figure 25 : Cinétique du blanchissement du β - carotène.

D'après ces résultats, nous avons remarqué que le BHA inhibe d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du β - carotène par rapport au contrôle négatif qui représente plus de 97% de la peroxydation (figure 26). Les deux huiles montrent une plus grande activité inhibitrice par rapport à celle du témoin négatif, mais inférieure à celle du BHA.

La différence d'efficacité d'inhibition des trois échantillons (BHA, He (FL) et He (FR)) est significative. L'analyse statistique a permis de les classer comme suit: BHA>Fruits>Feuilles. L'activité antioxydante des HEs utilisée dans notre étude est inférieure à celle rapportée par Sacchetti et al. (2005) avec un pourcentage d'inhibition de 60% pour *E. globulus*. Singh et al. (2012) ont trouvé pourcentage d'inhibition de 50% pour *E.citriodora*.

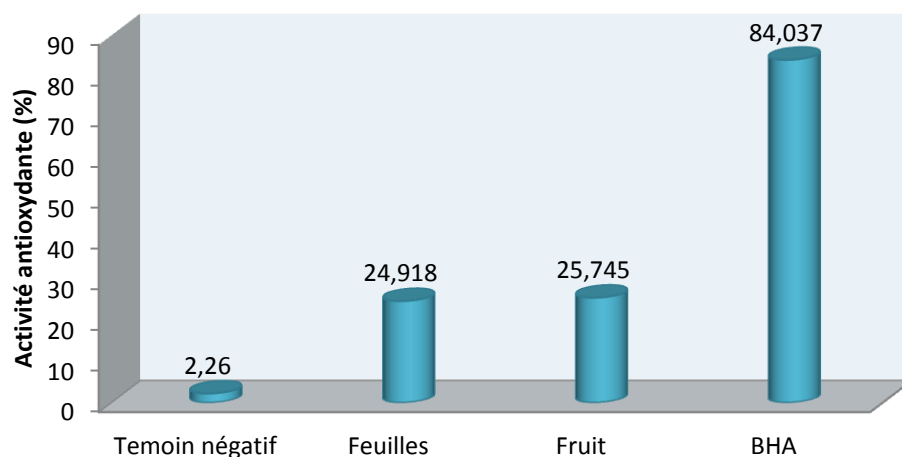


Figure 26 : Inhibition de l'oxydation de l'acide linoléique et du β -carotène par le BHA, et les HES des feuilles et des fruits de *E.globulus*.

Ces résultats sont confirmés par le calcul des IC₅₀ (Tableau X). En effet, l'étude statistique révèle des différences significatives entre les trois échantillons, elle nous a permis de classer leur pouvoir antioxydant comme suit: BHA>>Fruit>>Feuilles. En outre Noumi et *al.* (2011) ont trouvé un IC₅₀ de 48 μ g/mL d'une HES de commerce ce qui est largement inférieur à nos résultats.

Tableau X: Les concentrations requises pour inhiber 50% de la peroxydation.

Echantillons	Valeurs des IC 50 mg/mL
Fruits	4,933 \pm 0,2021
Feuilles	6,753 \pm 0,3857
BHA	0,455 \pm 0,187

La forte activité du fruit par rapport à celle des feuilles pourrait être expliquée par la différence de concentration en sesquiterpènes qui est de 35% pour le fruit et 14% pour les feuilles, ainsi qu'à la présence de groupements hydroxyle dans ces composés. Ceci est en accord avec les résultats de Martins et *al.* (2014), où les feuilles de *Schinus molle* qui contenait 14% de sesquiterpènes ont exercé une plus forte activité antioxydante que le fruit qui en contient 0,3%.

D'après Sacchetti et *al.* (2005), les résultats obtenus pour le blanchissement du β carotène sont meilleurs que ceux du piégeage du radical DPPH, notamment pour les plantes

présentant une teneur élevée en composés terpéniques, mais aussi la conséquence de la grande spécificité de ce test pour les composés lipophiles.

V.4. 3. Pouvoir réducteur

L'évaluation de l'activité antioxydante par réduction du fer est une méthode facile et reproductible, c'est pour cela qu'elle est très utilisée. La figure 27 montre que le pouvoir réducteur est fonction de la concentration. Dans ce test la couleur jaune de la solution a viré au bleu vert selon le pouvoir réducteur de HES. La présence de molécules réductrices induit la conversion du fer ferrique en fer ferreux (Wu et al., 2013).

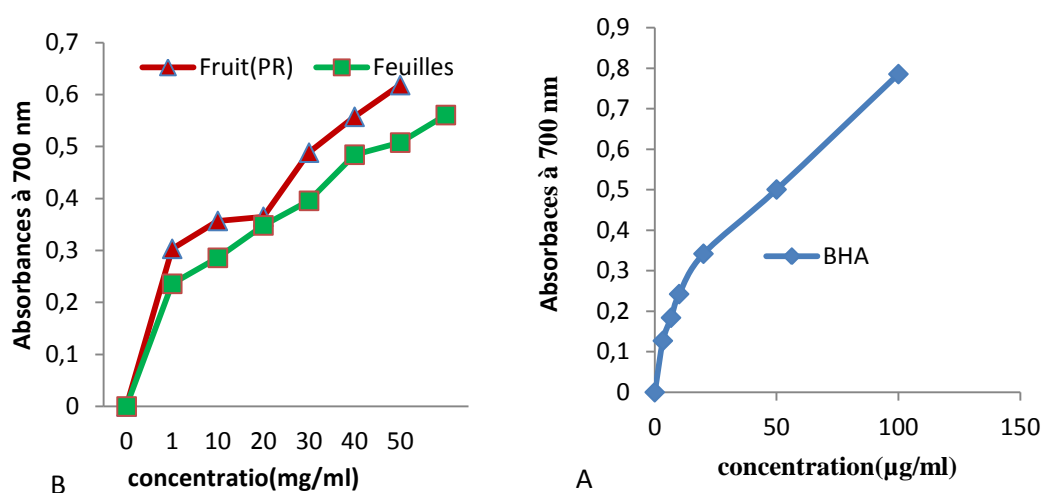


Figure 27: Pouvoir réducteur du BHA (A) et des HES de *E. globulus* (B)

Les HES des deux parties de la plante présentent des activités antioxydantes nettement inférieures à celle du standard (BHA), pour ce dernier une réduction de 50% du fer est notée pour 48 µg/mL. Pour les deux huiles les valeurs des IC₅₀ sont de 32,862± 1,841 mg/mL pour le fruit et 115,393 ± 1,453 mg/mL pour les feuilles (Tableau XI).

Tableau XII: Les concentrations requises pour réduire 50% de fer

Echantillons	Valeurs des IC 50 (mg/mL)
Fruits	32,862 ± 1,841
Feuilles	115,393 ± 1,453
BHA	0,048± 0.001

Les résultats montrent clairement que le fruit ($IC_{50}=32,862$ mg/mL) possède un pouvoir réducteur supérieur à celui des feuilles (115,393 mg/mL), ceci pourrait être la résultante de la différence de composition des deux huiles puisque le fruit est riche en sesquiterpènes oxygénés (72,80%), sesquiterpènes (35,59%), alors que les feuilles sont riches en mono terpènes oxygénés (79,43%).

L'activité antioxydante d'une HE est tributaire de plusieurs paramètres tels que:

- les facteurs génétiques, phase de développement, et environnement (Neffati et *al.*, 2009);
- La saison de la récolte (Neffati et *al.*, 2009);
- Les composés majoritaires, qui doivent être pris en considération, car il existe une interaction entre les différents constituants qui affectent les activités biologiques des HEs (Wu et *al.*, 2013), ainsi que la présence des structures phénoliques dans ces derniers (Geethalakshmi et *al.*, 2013).

L'activité antioxydante des huiles essentielles est également attribuable à certains alcools, éthers, cétones, et aldéhydes monoterpéniques: le tinalool, le 1,8-cinéole, le géraniol/nérol., le citronellal., l'isomenthone, la menthone et quelques monoterpènes: α -terpinène, γ -terpinène et α -terpinolène (Pionchon, 2008).

V. 5. Activités antibactérienne des huiles essentielles des feuilles et du fruit

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de la mesure du diamètre des zones d'inhibition, et de la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des HEs.

V.5. 1. Test de diffusion sur gélose

Les résultats sont exprimés selon trois niveaux d'activité (de Billerbeck, 2007) :

- Résistant ($D < 6$ mm) ;
- Intermédiaire ($13 \text{ mm} > D > 6$ mm) ;
- Sensible ($D > 13$ mm).

Le DMSO utilisé pour la dissolution des HEs n'a pas montré un effet antibactérien sur les souches testées.

V.5. 1.1. Activité antibactérienne du fruit

L'étude statistiques fait apparaître des différences significatives ($p < 0,05$) dans la sensibilité des différentes souches, à l'exception de *E. coli* et *L. monocytogene*, où la différence est non significative.

Le classement de la sensibilité des bactéries *vis-à-vis* des HEs des fruits selon un ordre croissant est comme suit: *S. aureus* > *P. aeruginosa* > *B. subtilis* > *E. coli* = *L. monocytogene*.

D'après les valeurs des zones d'inhibitions (Figure 28), et selon l'ordre de classement établi par De Billerbeck, (2007), les souches testées ont montré une sensibilité aux HEs des fruits de *E. globulus*.

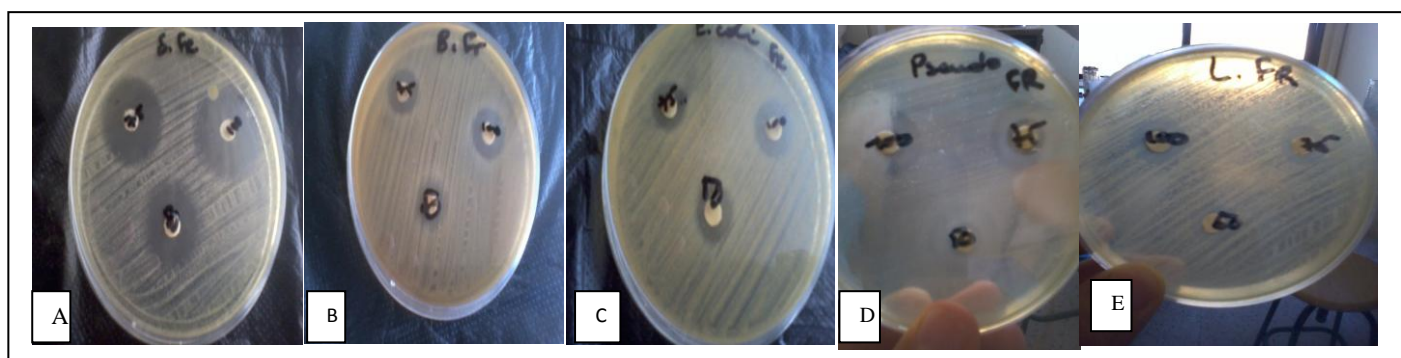


Figure 28: Photo graphie montrant l'action de l'HE du fruit sur les bactéries testées

V.5. 1.2. Activité antibactérienne des feuilles

Dans la figure 29 sont montrées les zones d'inhibition de la croissance bactérienne causées par les HEs des feuilles. L'analyse statistique a révélé des différences significatives de la sensibilité des différentes bactéries pour HE des feuilles, par contre des différences non significatives ($p < 0,05$) ont été observées entre *E. coli*, *B. subtilis*, et *L. monocytogene*.

Le classement établi par l'analyse statistique de la bactérie la plus sensible à la plus résistante est le suivant: *S. aureus* > *E. coli* = *B. subtilis* = *L. monocytogene* > *P. aeruginosa*.

Ces résultats, s'accordent avec ceux de Damjanovic –Vratnica et al. (2011) et Raho et benali, (2008) sur la sensibilité de *S. aureus* suivi de *E. coli* et la résistance de *P. aeruginosa vis à vis* des HEs des feuilles. Ces auteurs ont expliqué la résistance de *P. aeruginosa* par sa forte capacité de métaboliser un large spectre de composés organiques, ce qui favorise leur utilisation dans la bioremediation. *P. aeruginosa* est connu pour sa forte résistance intrinsèque contre de nombreux antibiotiques due à la restriction de sa membrane extérieure même pour les produits synthétiques (Elaiissi et al., 2011).

Les mêmes résultats ont été rapportés par De Billerbeck, (2007); Tyagui et Malik, (2011) et Elaïssi et *al.* (2011). Cependant, Bharti et *al.* (2012) ont rapporté que *P. aeruginosa* est sensible à l'HE des feuilles. Ceci pourrait être dû à une différence de composition de ces HEs, puisqu'elle est dépendante des facteurs environnementaux tels que le climat, la température, les nutriments (Akin et *al.*, 2010), l'incidence de la lumière, la saison (Mendes silva et *al.*, 2011), le processus d'extraction (Recoquilly et *al.*, 2009), mais aussi la différenciation héréditaires des espèces en formes physiologiques distinctes (Zrira et *al.*, 1994). La composition est dépendante aussi de l'état de fraîcheur des feuilles utilisées (Mendes silva et *al.*, 2011).

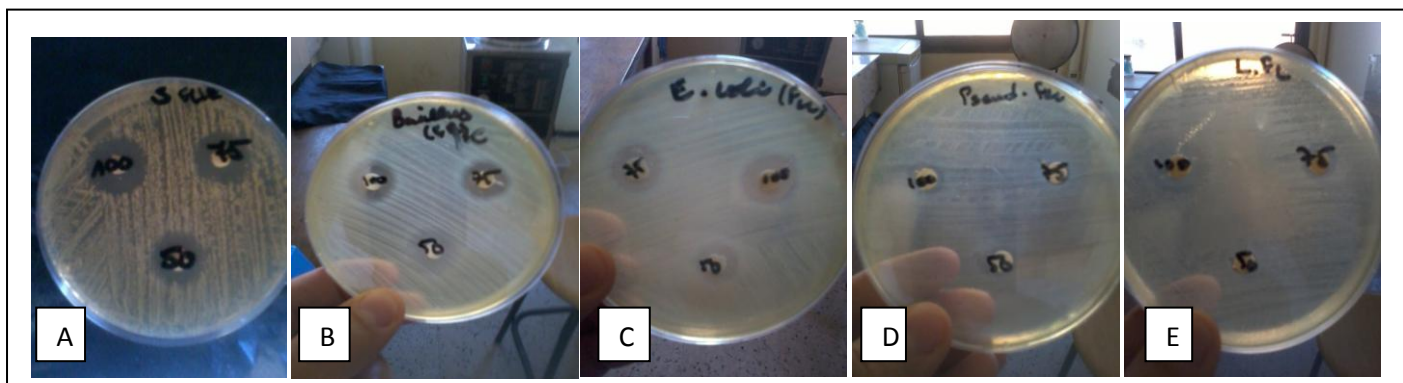


Figure 29: Photo graphie montrant l'action de l'HE des feuilles sur les bactéries testées

V.5. 1.3. Activité antibactérienne des huiles essentielles des feuilles et fruits

La comparaison de la sensibilité des bactéries aux HEs étudiées révèle (Figure 30):

- Une sensibilité similaire de *E. coli* et *L. monocytogene* pour les deux huiles;
- Des différences significatives de sensibilité des autres bactéries par rapport aux HEs des feuilles et du fruit ;

L'analyse statistique de l'effet des deux HEs sur les bactéries étudiées nous a permis de classer ces dernières selon leur sensibilité: *S. aureus* (FT), *P. aeruginosa* (FT) >> *S. aureus* (FL), *B. subtilis* (FT) >> *E. coli* (FT), *E. coli* (FL), *B. subtilis* (FL), *L. monocytogene* (FL), *L. monocytogene* (FT) >> *P. aeruginosa* (FL).

D'après les résultats les deux HEs ont une activité antibactérienne *vis-à-vis* de toutes les bactéries testées. Cependant, *S. aureus* est la plus sensible ce qui est en accord avec les résultats des études antérieures menées sur *E. globulus* et celles menées par Traore et *al.* (2013) sur l'espèce *E. houseana* et sur *E. odorata* menées par Elaïssi et *al.* (2011).

Bacillus subtilis est plus résistante que *S. aureus* pour les HEs testées. En effet, dans des conditions défavorables pour sa croissance, cette bactérie a la capacité de former une endospore pour s'adapter aux conditions du milieu ce qui peut être à l'origine de sa résistance par rapport à *S. aureus* (Ahmad et Beg, 2001; Nascimento et al., 2000) cité par Boulekbache et al. (2011).

Les résultats révèlent que les bactéries étudiées sont plus sensibles aux HEs des fruits que celles des feuilles, ceci pourrait être due à la présence de l'aromadendrene et du 1,8 cineole, car Mulyaningsih et al. (2010) ont rapporté un effet synergétique entre ces deux molécules contre *B. subtilis* et *S. aureus* en combinant 0,12 mg/mL d'aromadendrene et 16 mg/mL de 1,8 cineole. Cette étude a également révélé que l'aromadendrene possède une meilleure activité antimicrobienne que le cineole et le globulol et que cette activité serait due à son caractère lipophile, ce qui lui permet de traverser la membrane cellulaire, de nature phospholipidique, en outre il possède un groupement méthylène réactif et un cycle cyclopropane qui peut alkyler les protéines et ainsi perturber leur conformation (Mulyaningsih et al., 2010). En effet, dans notre étude une différence de composition entre les HEs des feuilles et du fruit a été observée, ce dernier est plus riche en aromadendrene, en globulol, et en limonène.

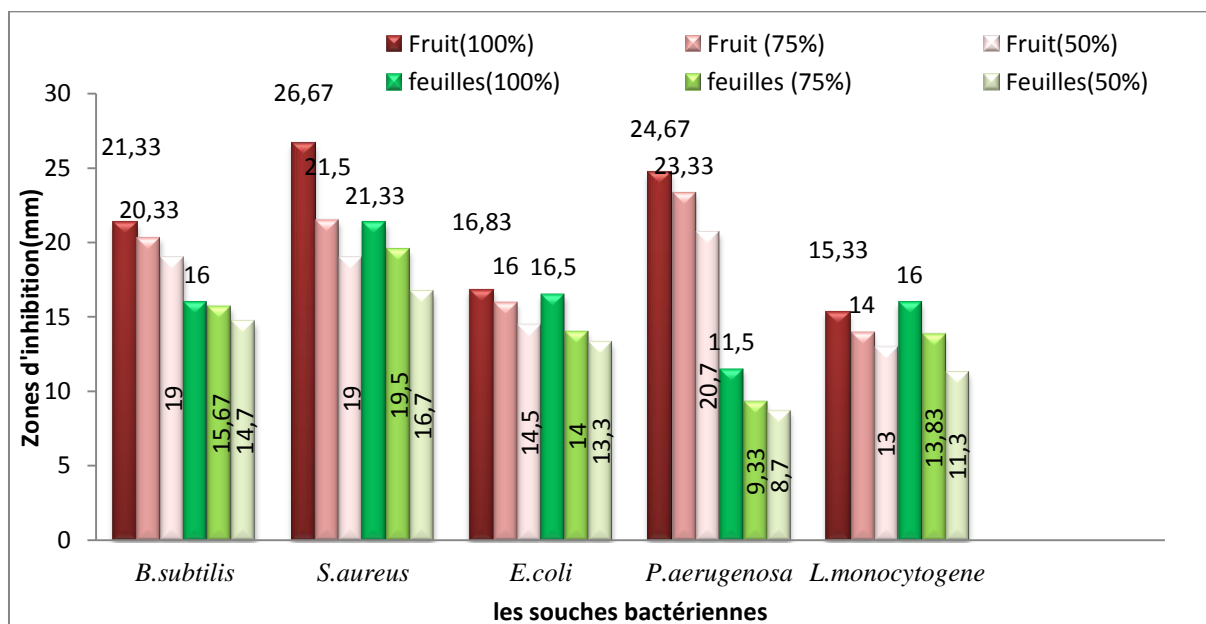


Figure 30: Les zones d'inhibition des bactéries provoquées par les HEs du fruit et des feuilles de *E. globulus*.

V.5. 1.4. Comparaison de l'activité antibactérienne des deux huiles essentielles avec celle des antibiotiques

L'analyse comparative des effets des HEs et des antibiotiques (Figure 31) a révélé la:

- Résistance de *P. aerugenosa* à la tétracycline, et de *B. subtilis vis à vis* de la gentamycine ce qui est confirmé par le rapport de l'Afssaps, (2005), ceci pourrait être le fruit d'une résistance de cette souche par un déficit de porine, nécessaire à l'entrée de l'ATB ou par une surexpression de l'efflux actif (Carle, 2009) ;
- Sensibilité des bactéries étudiées à la gentamycine ;
- Différence significative entre l'effet de l'HE et les deux antibiotiques sur la même souche bactérienne ;
- Similarité de l'action antibactérienne de la tétracycline et des HEs des fruits sur *S. aureus* ;
- Même sensibilité de *B. subtilis vis-à-vis* de l'HE des feuilles et de la tétracycline, ce qui peut s'expliquer par le fait que les HEs des feuilles et des fruits ont le même mode d'action que la tétracycline sur les bactéries Gram+ ;
- Même sensibilité de *E. coli* et de *L. monocytogene* pour la tétracycline et la gentamycine, sachant que ces deux ATB inhibent la synthèse des protéines. En effet, les bactéries à Gram - et à Gram+ sont sensibles à la gentamycine (Marquet, 2004) ;
- Sensibilité similaire à la gentamycine a été notée pour *P. aerugenosa* et *E. coli* ceci pourrait être du au même mode d'action de la gentamycine sur les bactéries Gram-. La variation de l'activité antimicrobienne des agents antibactériens pourrait s'expliquer par des différences structurales entre les bactéries (Rather et al., 2012).

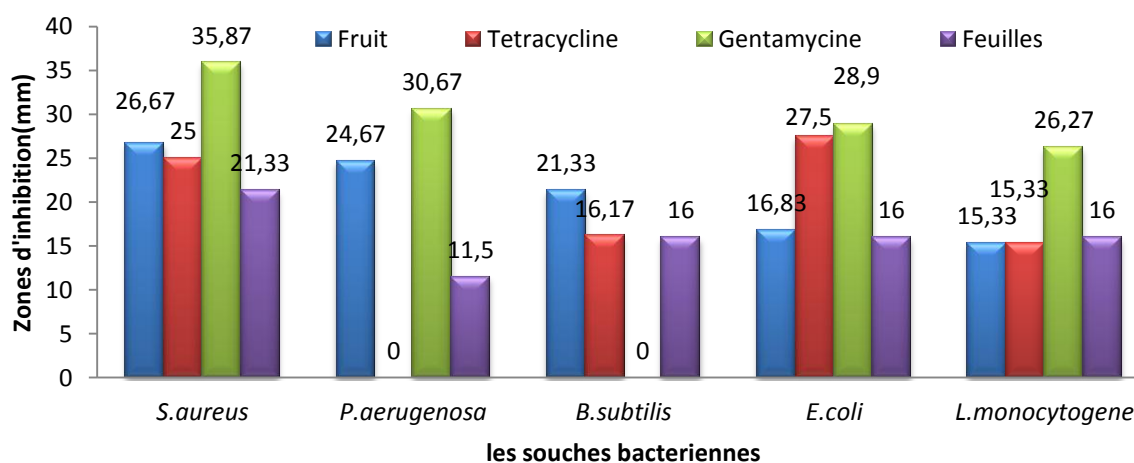


Figure 31 : Comparaison des effets antibactériens des HEs avec ceux des antibiotiques

V.5. 2. Détermination des CMI et CMB par la méthode de microdilution

Les résultats des CMI et CMB sont montrés dans la figure 32. Les CMI et CMB obtenues reflètent ceux de la méthode de diffusion en ce qui concerne la sensibilité accrue des germes étudiés à l'HE des fruits par rapport à celle des feuilles. La valeur la plus faible de CMI est observée pour l'HE des fruits sur *L. monocytogene* qui est de 3 mg /mL et la valeur la plus importante est constatée pour l'HE des feuilles (13,70 mg/mL) sur *P. aeruginosa*. Ces valeurs montrent que les bactéries à Gram+ sont plus sensibles aux HEs que les bactéries à Gram-, ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à Gram positif possèdent uniquement le peptidoglycane qui ne constitue pas une véritable barrière sélective de ces composés (Tyagui et Malik, 2011; Raho et Benali, 2012).

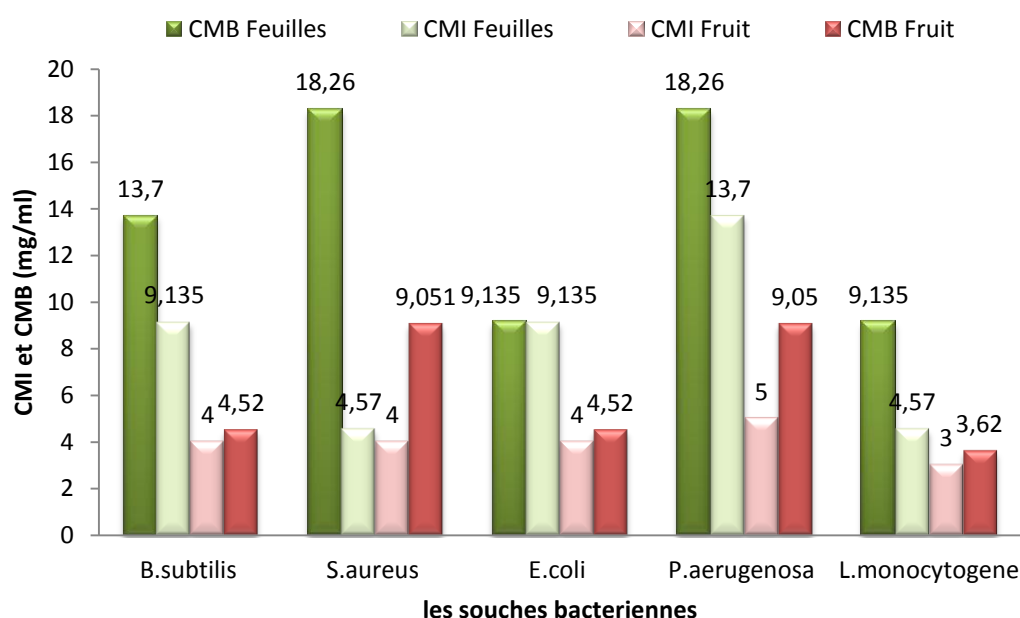


Figure 32 : CMI et CMB des HEs des feuilles et du fruit

Les résultats obtenus sont supérieurs à ceux de Bharti et al. (2012), qui a rapporté des CMI de 0,75 μ L /mL et de 1,56 μ L/mL contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*, respectivement, et ceux obtenus par Damjanovic –Vratnica et al. (2011) qui sont de 0,09 mg/mL pour *S. aureus* et *E. coli* et de 1,57 à 3,13 mg/mL pour *P. aeruginosa*. Les valeurs des CMI sont également supérieures à celles obtenues par Tyagui et Malik, (2011) qui sont 2,25 mg/mL pour *S. aureus* et *B. subtilis*, de 4,5 mg/mL pour *E. coli* et de 9 mg/mL pour *P. aeruginosa*. Ceci pourrait se justifier soit par la différence des méthodes utilisées ou par la différence de composition des HEs, car elles ne sont pas de même origine géographique. En effet, de nombreuses études ont rapporté que l'activité antimicrobienne des HEs est liée à leur composition; et les groupements

fonctionnels (alcool, phénols, terpènes, et cétones) des composés sont associés à cette activité (Tyagui et Malik, 2011). Même constatation pour les CMB qui sont supérieures à celles obtenues par les mêmes auteurs, à l'exception de *E.coli* et de *P. aeruginosa*, pour lesquelles les CMB sont proches de celles obtenues par Tyagui et Malik, (2011), ceci pourrait être le résultat de la sensibilité de ces deux germes pour un composé commun dans les HEs étudiées. Les CMI des HEs du fruit contre *S. aureus* et *B. subtilis* sont beaucoup plus importantes que celle rapportée par Mulyaningsih et al. (2010) qui est de 0,25 mg/mL. Par contre pour *P. aeruginosa* et *E. coli* nous avons obtenu des CMI inférieures à celles rapportées par le même auteur qui sont de 8 mg/mL et > 8 mg/mL, respectivement. L'activité antibactérienne des HEs des fruits de *E. globulus* pourrait être liée à un effet synergétique possible entre les différents composés minoritaires, tels que le limonène combiné au cineole (Van Vuuren et Viljoen, 2007; Mulyaningsih et al., 2010).

De nombreuses études ont rapporté que l'activité antimicrobienne des HEs est liée à leur composition, aux groupements fonctionnels (alcool, phénols, terpènes, et cétones) (Tyagi et Malik, 2011), à la nature des structures chimiques qui les constituent, et à leurs proportions jouent ainsi un rôle déterminant (Laib et al., 2012). Elle est souvent réduite à l'activité de ses composés majoritaires, ou ceux susceptibles d'être actifs. Évalués séparément sous forme de composés synthétiques, ils confirment ou infirment l'activité de l'HE de composition semblable. Il est cependant probable que les composés minoritaires agissent de manière synergique. De cette manière, la valeur d'une HE tient à son « totum », c'est à dire dans l'intégralité de ses composants et non seulement à ses composés majoritaires (Pibiri, 2005; Tyagui et Malik, 2011). En effet, Barel et al. (1991) ont rapporté une activité antimicrobienne des composés minoritaires tels que le α -terpineol, et le terpinen-4-ol. D'après Shunying et al. (2005), ce dernier a montré une activité bactériostatique *vis à vis* des bactéries responsables des infections urinaires.

Selon Satrani et al. (2007), les alcools terpéniques sont particulièrement actifs contre les cellules microbiennes car ils sont solubles dans les milieux aqueux et ils provoquent des dégâts importants sur leurs parois cellulaires; les alcools possèdent une activité bactéricide plutôt que bactériostatique. En effet, la caractéristique la plus importante des HEs et de leurs composés est leur hydrophobicité, ce qui leur permet de traverser la membrane lipidique des cellules et des mitochondries et de perturber leur structure et les rendre ainsi plus perméables, ainsi les molécules et les ions peuvent sortir de la cellule en entraînant sa mort (Bharti et al. 2012).

Selon Mendes silva et *al.* (2011), le composé responsable de la forte activité microbienne contre *S. aureus* serait le terpinéol. Effectivement, les HEs des feuilles contiennent du terpineol à 16,4%. Selon cet auteur la concentration de ce composé augmente pendant l'hiver. D'autre part, Rather et al. (2012) ont classé par ordre décroissant l'activité antibactérienne des composés suivant: α -pinene, β -pinene, limonene, β -caryophyllene et germacrene D.

Conclusion

La valorisation des HEs dans l'industrie alimentaire passe par une étape préliminaire de détermination de leur composition chimique (pour les caractériser, et pour mettre en évidence leur éventuelle spécificité), ainsi que par l'étude de leur propriétés biologiques, afin de les utiliser comme agent antioxydant et conservateur, qui permettraient de prévenir le phénomène d'oxydation lipidique qui aboutit au rancissement et la prolifération des micro-organismes. Ces derniers sont responsables des altérations organoleptiques et des intoxications alimentaires.

Les HEs peuvent même être utilisées comme aromatisant grâce à leur propriété odorante, ce qui leur permet de remplacer les additifs, surtout que ces derniers sont pour la plupart d'origine synthétique, et leurs conséquences sur la santé publiques sont néfastes.

L'extraction des HEs des feuilles et du fruit de *E. globulus* a été réalisée par hydrodistillation, le rendement est de $2,53 \pm 0,1\%$ pour les feuilles et de $3,11 \pm 0,4\%$ pour le fruit.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des HEs a été réalisée par trois méthodes différentes; la méthode de réduction du DPPH•, la méthode de blanchissement du β -carotène et le pouvoir réducteur du fer. Les résultats sont inférieurs à ceux du standard (BHA) qui a donné des concentrations inhibitrices très faibles (DPPH : $3,96 \mu\text{g/mL}$), PR : $48,88 \mu\text{g/mL}$, β carotène : $0,455 \text{ mg/mL}$), suivi du fruit (β carotène : $4,933 \text{ mg/mL}$, DPPH ; $27,0413 \text{ mg/mL}$, PR : $32,862 \text{ mg/mL}$), enfin les feuilles avec les valeurs suivantes: $6,753$ pour le β carotène ; $33,3290$ pour le DPPH et $115,393 \text{ mg/mL}$ pour le pouvoir réducteur du fer.

Concernant l'activité antibactérienne, la méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien des HEs de *E. globulus vis-à-vis* de cinq souches différentes. Trois Gram positif (*S. aureus*, *L. monocytogene*, *B. subtilis*) et deux Gram négatifs (*E. coli*, *P. aerugenosa*). Ce pouvoir est relativement élevé, avec des zones d'inhibition variant de $13 \pm 0,58$ à $26,67 \pm 0,29 \text{ mm}$ pour le fruit et de $8,7 \pm 0,51$ à $21,33 \pm 0,58$ pour les feuilles. Les résultats ont mis en évidence la sensibilité de tous les germes étudiés aux HEs de *E. globulus* surtout *S. aureus*. La sensibilité de *P. aerugenosa* à l'HE du fruit est à souligner car cette dernière est connue par sa résistance.

La méthode de dilution a confirmé les résultats de la méthode de l'aromatogramme. Les CMI obtenues sont comprises entre 3 et 5 mg/mL pour le fruit et 4,57 et 9,135 mg/mL pour les feuilles. De même, les valeurs de la CMB de l'HE sont comprises entre 3,62 et 9,05 mg/mL pour le fruit, et de 9,135 à 18,26 mg/mL.

Une très forte sensibilité de *S. aureus* pour les deux huiles étudiées a été observée. Quant à *P. aeruginosa*, elle exhibe une sensibilité très intéressante à l'HE du fruit sachant qu'elle est bien connue pour sa résistance.

En fin, nos résultats indiquent que l'HE de *E. globulus* est douée d'une activité antioxydante, et antibactérienne intéressantes. Nous pouvons conclure qu'elle pourrait être un agent antioxydant et conservateur très prometteur pour l'industrie alimentaire capable d'empêcher l'oxydation des aliments et de réduire la croissance microbienne responsable de l'altération des denrées alimentaires.

A l'issue de la présente étude, il serait intéressant de compléter ce travail par:

- ❖ Une recherche sur l'activité fongicide des HEs de la plante, et aussi de rechercher leur activité antibactérienne sur d'autres germes;
- ❖ Une application de ces HEs sur un aliment adéquat sans modifier ses caractéristiques organoleptiques, de faire une analyse sensorielles de cet aliment, et voir le comportement de cet additif naturel ;
- ❖ Une étude semblable pour les HEs des fleurs de *E. globulus*.

Références bibliographiques

Akin M., Aktum A and Nostro A.(2010). Antibacterial activity and composition of the essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. and *Myrtus communis* L. growing in Northern Cyprus. *African Journal of Biotechnology Vol. 9 (4), pp. 531-535, 25 ISSN 1684-5315 © 2010 Academic Journal.*

Akolade, Jubril Olayinka A. , Olutayo Olawumi. O., Michael Olalekan A., Sarah Abimbola A, Doyinsola Idiat I and, Abayomi Theophilus O.(2010) Chemical composition, antioxidant and cytotoxic effects of *Eucalyptus globulus* grown in north-central Nigeria *J. Nat. Prod. Plant Resour., 2012, 2 (1):1-8*

Amadou B.S(2004). Etude de la phytochimie et de l'activité biologique de *Cambretum glutinosum* Perr.ex DC(Combretaceae).Thèse de doctorat en Pharmacie. Université De Bamako. Mali.P15,16

Amakura Y., Umino Y., Tsuji S., Ito H, Hatano S., Yoshida T., Tonogai Y.(2002). Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. *Food Chemistry 77 (47-56)*

André M.L(2013). les additifs alimentaire un danger méconnu. © Éditions Jouvence, ISBN 978-2-88911-405-4 P22,P23

Arma R. (2012).Plantes médicinales .robin.arma@free.fr <http://www.robinarma.com>.P119

Auddy B, Ferreira M., Blasina F., Lafon L., Arredondo F., Dajas F., Tripathi P.C., Seal T., Mukherjee B.(2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases *.Journal of Ethnopharmacology 84 (2003) 131_138*

Baba Aissa F. (2000). Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Edition: Librairie moderne – Rouiba: P101

Bachir Raho G. et Benali M. (2012). Antibacterial activity of the essential oils of *Eucalyptus globules* against *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine (2012)739-742*

Barouki R.(2005). **Stress oxydant et vieillissement.** Inserm UMR-S490, Université René Descartes, 45, rue des Saints Pères, 75270 Paris Cedex 06, France et Service de biochimie, Hôpital Européen Georges Pompidou, 20, rue Leblanc, 75015 Paris, France.P268

Barus C.(2008). Etude électrochimique de molécules antioxydantes et de leur association en milieux homogène et biphasique - Application aux produits dermocosmétiques.Thèse de doctorat en : Génie des procédés et environnement. Université Toulouse III - Paul Sabatier.P21

Batish D R, Pal Singh H, Kumar Kohli A , Shalinder Kaur S.(2008).Eucalyptus essential oil as a natural pesticide *Forest Ecology and Management 256 :2166-2174*

Becila A.(2009).Prévention contre les alterations et les contaminations microbiennes mémoire de magister en *Alimentation, Nutrition et Santé*. Université Mentouri – Constantine.p20,23

Becquart P(2011), Sécurité des huiles et graisses .www.paulbecquart.fr

Bekka F.(2009). Effet des huiles essentielles d'Origanum glandulosum Desf. et Artemisia herba alba Asso sur des bactéries multirésistantes. Memoie de magister en Microbiologie Appliquée. Université se Béjaia

Belkheiri N.(2010). Dérivés phénoliques à activités antiathérogene.Thèse de doctorat en chimie-Biologie-Santé.Université Toulouse III - Paul Sabatier,France.

Belyagoubi N.(2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien.These de doctorat en Biologie Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.

Benabdelkader T.(2012). Biodiversité, Bioactivité et Biosynthèse des Composes Terpéniques Volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas Sensu Lato*, un Complexe d'Espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique. Thèse de doctorat en Biologie et Ecophysiologie Végétale de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger et de l'Université Jean-Monnet de Saint-Etienne, France. P10,25

Benbrook C.M.(2005). Accroître la teneur en antioxydants des aliments grâce à l'agriculture et à la transformation alimentaire biologiques. Rapport sur l'état des connaissances scientifiques. P7 ,6

Benjilal.B. ; Tantaoui-Elara. A. ; Ismaïli-Alaou. M. ; Avadi.A.(1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes médicinales et phytothérapie*1986, Tome XX, n° 2, p. 155-167

Bharti P, Bai S, Seasotiya L, Malik A et Dalal S(2012).Antibacterial activity and Chemical Composition of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against selected Bacteria *International Journal of Drug Development & Research. Vol. 4 . Issue 4. ISSN 0975-9344*

Bouguerne B. (2012). conception et synthèse de dérivés phénoliques hautement fonctionnalisés et étude de leurs propriétés biologiques vis –a- vis des maladies cardiovasculaires(athérosclérose). Thèse de doctorat en chimie biologie-santé .Université de Toulouse III –Paul Sabatier.

Bouguerra A.(2012). Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de *Foeniculum vulgare* Mill. en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire .Memoire de Magister en Sciences Alimentaires .Université Mentouri Constantine

Bouhadjera K.(2005). Contribution a l'étude chimique et biologiquede deux plantes médicinales sahariennes *oudneya africana* r.br. et *aristida pungens* .Thèse de doctorat en Chimie Organique Appliquée. Université Abou Bekr Belkaid . P44

Boulekbache-Mekhlouf L.(2011).Activités biologiques et caractérisation des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la région de Bejaia: *Eucalyptus globulus*. Thèse de doctorat en Sciences Alimentaire. Université de Bejaia. p12.

Bousbia N.(2011). extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydant a partir de produits naturels et de co-produits agro-alimentaires. Thèse de doctorat en Chimie de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse et de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique. P16

Brewer M.S(2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. Institute of Food Technologists® Vol. 10, 2011 _ Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety p221p229 p227

Buronso A.M.(2008).Grand guide des huiles essentielles Santé Beauté et Bien Etre 23.7362.9 ISBN :978-2-0123-7362-4

Burt S.(2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94 (2004) 223– 253

Caillet S et Lacroix M.(2007). INRS-Institut Armand-Frappier 531, Boul. des Prairies Laval (Qc) H7V 1B7 P7

Carle S(2009).La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important .Pharmactuel *Vol. 42*.

CherratL., Espina L., Bakkali M, Pagánb R., Laglaoui A.(2014) Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* xxx (2014) xxx–xxx

Chiasson. H et Beloin.N(2007). Les huiles essentielles, des biopesticides « Nouveau genre » Bulletin de la Société d'entomologie du Québec *Antennae* , vol. 14, no 1

Chouitah O.(2012).Composition chimique et activité antibactérienne des feuilles de *Glycyrrhiza glabra*. Thèse de doctorat en Biochimie. Université d'oran.p17

Cohen D. (2013). les huiles essentielles à l'officine : dangers pour la femme enceinte et le nouveau-né . Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Joseph Fourier de Grenoble. p 6,7

CoudercV.L(2001).Toxicité des huiles essentielles.Thèse de doctorat en veterinaire.Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse.P 6,7,12

Cuq J.L(2007). Microbiologie Alimentaire, Les relations microorganismes / aliments / consommateurs ,Les maladies microbiennes liées à la consommation d'aliments,Les agents antimicrobiens. Département Sciences et Technologies des Industries Alimentaires P30 ;34,50

D.,Figueredo G., et Chalchat J.C. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Eucalyptus citriodora* Hook et *Eucalyptus houseana* W.Fitzg. ex Maiden. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7(2): 800-804, ISSN 1991-8631

Da silva F.(2010) .Utilisation des huiles essentielles en infectiologie ORL. Thèse de doctorat en Pharmacie .Université Henri Poincaré - Nancy p17,10,p18

Daroui-Mokaddem H. (2012). Etude phytochimique et biologique des especes *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniololusatum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *chrysanthemum trifurcatum* (asteraceae).Thèse de doctorat en Biochimie Appliquée. Université Badji Mokhtar-Annaba.P8,14,28

De Billerbeck V-G(2007).Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytotherapie* (2007) 5: 249–253 © Springer 2007 DOI 10.1007/s10298-007-0265-z

Degryse A. C, Delpla I,et voinier M.A(2008). Risques et bénéfices possibles des huiles essentielles .Atelier sante et environnement-IGS-EHESP.P9

Delaquis J.P.; Stanich K., Girard B, Mazza G.(2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology* 74 101– 109

Djarri.L.(2011). Contribution a l'étude des huiles essentielles et des métabolites secondaires de trois plantes Algériennes de la familles des apiaceae *Daucus reboudii* Coss. ex Batt. & Trab., *Kundmannia sicula* (L.) DC., et *Elaeoselinum thapsioides* Maire. Thèse de doctorat en Phytochimie .Université Mentouri de Constantine

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 oeufs entiers liquides conservés à 7 ± 1 °C *Phytothérapie* (2011) 9: 343–353 © Springer-Verlag France . DOI 10.1007/s10298-011-0664-z

Djenane D., Yangüela J., Gómez D and Roncalés P.(2012).Perspectives on the use of essential oils as antimicrobials against *campylobacter jejuni* cect 7572 in retail chicken meats packaged in microaerobic atmosphere. *Journal of Food Safety* 32 /37–47 © 2011 Wiley Periodicals, Inc. ISSN 1745-4565

El haib A.(2011).Valorisation de terpenes naturels issus de plantes marocaines par transformations catalytique.These de doctorat en Chimie organique et catalyse. Université de Toulouse III.France. p 5,6 ,7

Elaissi A, Hadj Salah K, Mabrouk S, Larbi K.M, Chemli R, Harzallah-Skhiri F(2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species essential oils . *Food Chemistry* 129 (2011) 1427–1434

Eymard S.(2003).Mise en évidence et suivi de l'oxydation des lipides au cours de la conservation et de la transformation du chinchard (*Trachurus trachurus*) : choix des procédés. Thèse de doctorat en Biochimie. Ecole polytechnique de l'Université de Nantes. France.P30

- Fabre M.C., Genin A., Merigoux J., Moget E. (1992).** Herboristerie familiale ,des recettes simples avec des plantes simples pour résoudre les problèmes simples.
- Favier A. (2003).** Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique PP :108-109
- Fisher K.; Philip C (2008).** Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science & Technology* 19 (2008) 156-164
- Fraval, (2005).** Le Longicorne de l'eucalyptus -1ère partie. *Insectes* 4 n° 139
- Garnero J. (2002).** Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physico-chimiques. P9
- Geethalakshmi R.; Sarada D.V.L (2013).** Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Trianthema decandra* L. *Journal of pharmacy research* 6- 101 -1060
- Ghedira K., Goetz P., Le jeune R. (2008).** Eucalyptus globulus Labill, monographie médicalisée *Phytothérapie* 6 :197-200
- Girard G. (2010).** Les propriétés des huiles essentielles dans les soins bucco-dentaires d'hier à aujourd'hui. Mise au point d'un modèle préclinique de lésion buccale de type aphte pour tester les effets thérapeutiques des huiles essentielles. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy P12,13
- Goetz P., Ghedira K. (2012).** *Phytothérapie infectieuse*, Springer Verlag, France, Paris, P 272
- Gounelle De Pontanel (1980).** Les Additifs Alimentaires Et Le Consommateur Commission Des Communautés Européennes. ISBN 92-825-1233-9 p17,18,19
- Guiraud J. et Galzy P. (1980).** Analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Edition: Usine Nouvelle-Paris, ISBN : 2-7327-0000-2, pp: 95,203.
- Guiraud J.-P. (2003).** Micro-organismes intervenant dans l'industrie alimentaire. In " *Microbiologie Alimentaire* ". Edition: Dunod, ISBN : 2 10 007259 5, pp: 79-95.
- Guo Q.-M. and Yang X.-W. (2006).** Cypellocarpin C and other compounds from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 543-545.
- Gutierrez J.; Barry-Ryan C.; Bourke P. (2008)** The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Journal of Food Microbiology* 124 (2008) 91-97
- Guzun T (2010).** Peroxydation des lipides émulsionnés et transfert d'ions de fer à l'interface huile/eau stabilisée par des protéines de lait : influence des résidus phosphates et de la stabilité de chélate de fer Stratégie d'enrichissement en fer des aliments et contrôle de la peroxydation des lipides. Thèse de doctorat en Science de l'aliment. Université de Bourgogne. France. P45

Hale A.L., Reddivari L., Ndambe Nzaramba M., Bamberg J.B., Creighton Miller J.(2008) Interspecific Variability for Antioxidant Activity and Phenolic Content Among Solanum Species. *Jr Am. J. Pot Res* 85:332–341 DOI 10.1007/s12230-008-9035-1

Hasegawa T., Takano F, Takata T., Niiyama M., OhtaT.(2008) Bioactive monoterpene glycosides conjugated with gallic acid from the leaves of *Eucalyptus globules* .*Phytochemistry* 69 (2008) 747–753

Herzi N.(2013). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison del'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. Thèse de doctorat en Génie des Procédés et de. Institut National Polytechnique de Toulouse l'Environnement

Hussain A.I., Anwar F., Sherazi S.T.H.,Przybylski R.(2008). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations.*Food Chemistry* 108 (2008) 986_995

Kahouli I.(2010). Effet antioxydant d'extraits de plantes (*Laurus nobilis L., Rosmarinus officinalis,Origanum majorana, Oléa Europea L.*) dans l'huile de canola chauffé. Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval dans le cadre du programme de maîtrise en génie agroalimentaire pour l'obtention du grade de Maître es sciences (M.Sc.) P22

Kaloustian J., Chevalier J.,Mikail C. , Martino M. , Abou L. , Vergnes M.F.(2008) Etude de six huiles essentielles : composition chimique et activite antibacterienne. *Phytothe´rapie* (2008) 6: 160–164 © Springer 2008 DOI 10.1007/s10298-008-0307-1

Khodadad Piralikheirabadi., Mehdi Razzaghi-Abyaneh. , Halajian A.(2009).Acaricidal effect of *Pelargonium roseum* and *Eucalyptus globules* essential oils against adult stage of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* in vitro. *Veterinary Parasitology* 162 :346–349

Lambert R.J.W., Skandamis P.N. , Coote P.J., Nychas G.-J.E.(2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 91, 453±462.

Lavigne P.(2012). Commensal de la peau et des muqueuses de l'homme (rhino-pharynx, intestin, vagin). <http://www.answersingenesis.org/articles/aid/v4/n1/genesis-of-mrsa> et http://medicalab.blogspot.fr/2012_07_01_archive.html

Lenoir I(2011).Effet protecteur des polyphénols de la verveine odorante dans un model d'inflammation colique chez le rat .Thèse de doctorat en Nutrition. Université Blaise Pascal d'Auvergne .P18

Maciel M.V., Morais , S.M ., Bevilaqua C.M.L., Silva R.A., Barros R.S., Sousa R.N. ,Sousa L.C. , Brito E.S. , Souza-Neto M.A.(2010). Chemical composition of *Eucalyptus* spp. essential oils and their insecticidal effects on *Lutzomyia longipalpis*. *Veterinary Parasitology* 167 :1–7

- Makhloufi A. (2010).** Etude des activités antimicrobienne et antioxydante de deux plantes médicinales poussant à l'état spontané dans la région de bechar(*Matricaria pubescens* (Desf.) et *Rosmarinus officinalis* L) et leur impact sur la conservation des dattes et du beurre cru. Thèse de doctorat en Microbiologie et sécurité sanitaire des aliments. Université de Tlemcen. P 64,65,66,67,74
- Malecky M.(2008)** .Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de doctorat en Physiologie de la Nutrition Animale (biotechnologie) .Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement(AgroParisTech). P29,30,32
- Mayer F.(2012).** Utilisations thérapeutiques des huiles essentielles :Etude de cas en maison de retraite ,Thèse de doctorat en Pharmacie. Université de lorraine .France. p11,25,26,27
- Mishra A K, Sahu N, Mishra A, Ashoke K. Ghosh, Jha S, Chattopadhyay P.(2010)** Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of essential oil of Eucalyptus leaf *Pharmacognosy Journal* || Vol 2 | Issue 16 P25-28
- Ngakegni-Limbili.A.C.(2012).** Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des huiles essentielles et des lipides de réserve des fruits et graines saisonniers de la région Afrique Centrale. Thèse de doctorat en Sciences des Agro-ressources. Université de Toulouse .p18
- Opdyke D.L.J.(2002).**Eucalyptus oil .P107
- Pal Singh H.,Kaur S.,Negi K.,Kumari S.,Saini V.,Batish R D.,Kumar Kohli R.(2012)** Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of Eucalyptus citriodora(lemon-scented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *LWT - Food Science and Technology* 48: 23-241
- Pastre J., Priymenko N(2007)** .Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. *Revue Méd. Vét.*, 158, 4, 180-189
- Pastre J.O.C.(2005).** Intérêt des anti-oxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat en Veterinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. P180
- Pelli K ., Lyly M.(2003).** les antioxydants dans l'alimentation. ISBN :2-7380 1069-5° ISBN : 2-7380-1069-5
- Penchev P.I.(2010).** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions.These de Doctorat en: Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. P 9 ,P17,P19
- Pereira S.,Freire S.R.C.; Neto P., Silvestre J. D., and Silva M.S.A.(2005).** Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal .*Flavour and fragrance journal flavour fragr. J.* 2005; 20: 407-409
- Pérez S., Renedo C. J., Ortiz A., Mañana M., Silió D., Peredo J. (2005).** comparison of energy potential of the eucalyptus globulus and the eucalyptus nitens. University of cantabria av los castros s/n, 39005 santander (spain).

Pibiri M.C(2005). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. Thèse de doctorat en sciences. École Polytechnique Fédérale De Lausanne.France. p37

Piochon M.(2008).Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne:composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Thèse de doctorat en ressources renouvelables.Universite du Quebec:P7,11,17,20

Plesiat P.(2011). GDR Pseudomonas. Centre National De La Recherche scientifique agroupement De Recherche.France.

Poaty-Poaty .B(2009). Modification chimique d'antioxydants pour les rendre lipophiles : application aux tannins.These de doctorat en Sciences et Techniques de la Matière et des Procédés. Université Henri Poincaré – Nancy. P1

Raho B, Ghalem M et Benali M(2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*.African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 2(10). pp. 211-215, ISSN 1996-0816 © 2008 Academic Journals

Rather M.A., Dar B.A, Dar M.Y, Wani B.A, Shah W.S., Bhat B.A., Ganai B.A., Bhat K.A, Anand R., Qurishi M.A(2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents.Phytomedicine 19//1185– 1190

Recoquillay F.(2009).L'intérêt des huiles essentielles. 9ème Journée Productions porcines et avicoles.p59

Rhayour K.(2002). Etude du mécanisme de l'action bactéricide des huiles essentielles sur *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis* et sur *Mycobacterium phlei* et *Mycobacterium fortuitum* Thèse de doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'environnement et la santé .Université Sidi Mohamed Ben Abdellah .Maroc .P12

Rogez H ; Larondel Y.(2008).Etudes chimiques, nutritionnelles et technologiques sur des antioxydants naturels issus de végétaux amazoniens». *Tropicultura*. P26, 2, 127-128,127.

Satrani B, Ghanmi M, Farah A , Aafi A , Fougrach H, Bourkhiss B , Bousta D,Talbi M(2007). Composition Chimique Etactivité Antimicrobienne De L'huile Essentielle De *Cladanthus Mixtus*. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 2007, 146, 85-96.

Smadja J.(2009). Les Huiles Essentielles .Colloque GP3A - Tananarive Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments (LCSNSA). Université de La Réunion. P22 ,23

Smith-Palmer A, Stewart J and Fyfe L.(1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essencesagainst five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 1998, 26, 118–122

Song A., Wang Y., Liu Y.(2009). Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus* Labill from China. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 4 (4)PP

Soubra L.(2008).Évaluations Scientifiques Des Risques Toxiques Liés A Certaines Substances Chimiques Additifs Alimentaires) Et Contaminants (Mycotoxines.These De Doctorat Ensciences Et Industries Du Vivant Et De L'environnement. Institut Des Sciences Et Industries Du Vivant Et De L'environnement (Agro Paris Tech).P21

Stefanakis M.K.; Touloupakis E.; Anastasopoulos E.; Ghanotakis D.; Katerinopoulos H.E.;Makridis P(2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control* 34 (2013) 539e546

Tabart J.(2011). Optimisation et caractérisation d'un extrait de cassis riche en antioxydants utilisable comme complément alimentaire et .Etude de ses effets sur la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. Thèse de doctorat en Biochimie, Biochimie moléculaire et cellulaire, Bioinformatique et Modélisation. Université de Liège.

Tehrany A, Gaiani C, Becker L, Bendouma M,Bonnart A,Bousquière J,Donzeau A, Gervais C, Hiernaux M, Maison M,Mathieu R, Napolitano L, Obadia E, Palermo A, Thollet M (2009). Les additifs alimentaires le meilleur et le pire...P10

Traore N., Sidibe L., Bouare S., Harama D., Somboro A., Fofana B., Diallo D.,Figueredo G., et Chalchat J.C. Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Eucalyptus citriodora*Hook et *Eucalyptus houseana* W.Fitzg. ex Maiden. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7(2): 800-804, ISSN 1991-8631

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

Vilela G. R., De Almeida G. S., Bismara Regitano D'Arce M. A., Duarte Moraes M. H., Ota'vio Brito J, das G.F. da Silva M F, ão Cruz Silva S, de Stefano Piedade S M, Calori-Domingues M. A., Micotti da Gloria E(2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare *Journal of Stored Products Research* 45 :108–111

Warot S.(2006). Les Eucalyptus utilisés en Aromathérapie .Préparatrice en pharmacie. Mémoire de fin de formation en Phyto-aromathérapie.p3

Zhiri A et Baudoux D.(2008).les huiles essentielles chémotyées :ISBN :2-919905-27-9 Edition Inspir Development. P7,P38

Zhiri A., Mayaud L., Bouhdid S., Baudoux D, Abrini J, Aubert G(2010). Evaluation de l'activité bactéricide et bactériostatique des huiles essentielles vis-à-vis des souches d'origine clinique résistantes aux antibiotiques.Congres Francophone de Phytothérapie – Beyrouth.

Zrira S.,El khiran F., Benjllal B.(1994). Huiles essentielles de six espèces xérophytes d'*Eucalyptus*: effet du milieu sur les rendements et la composition-chimique. Actes Inst. Agron. Veto (Maroc), Vol. 14 (1): 5 - 9

Glossaire

Glossaire médical

Aisselles : Creux situé entre la partie supérieure et interne du bras et la partie du thorax

Analgésique : Qui supprime ou atténue la douleur.

Antibactérien : Qui inhibe le développement des bactéries.

Antibiogramme : Résultats de l'étude in vitro de la sensibilité d'un germe à différents antibiotiques.

Antibiotique : Toute substance naturelle capable d'inhiber In vivo le développement des bactéries.

Anti-inflammatoire : Qui soulage les inflammations.

Antimicrobien : Qui détruit les microorganismes.

Antiparasitaire : Qui détruit les parasites.

Antirhumatismal : Qui exerce une action anti-inflammatoire dans certaines affections rhumatismales.

Antiseptique : Qui détruit les germes pathogènes notamment par application externe.

Bactéricide : Qualificatif attribué aux antibiotiques qui agissent sur les bactéries en les détruisant.

Bactériostatique : Agent qui inhibe la croissance et la reproduction des bactéries sans les détruire.

Balsamique : Qui contient un baume (produit naturel d'origine végétal, formé de résine riche en acide benzoïque et en acide cinnamique) qui en a les propriétés.

Commensal : Se dit d'un microorganisme qui partage la nourriture de son hôte, sans préjudice pour celui-ci. On donne le nom bactérie commensale à des germes non pathogènes chez l'homme.

Fébrifuge : Qui fait disparaître la fièvre.

Grippe : Maladie virale, épidémique qui s'accompagne d'une forte fièvre.

Infection : L'ensemble des conséquences pathologiques qui peuvent en résulter d'un envahissement de l'organisme par un agent étranger tel que bactérie, virus, parasite capable de multiplier.

Infection nosocomiale : Infection acquise dans les hôpitaux lors d'une hospitalisation pour une autre affection.

Inflammation : Ensemble de réactions locales qui se produisent dans l'organisme en réponse à l'action irritante ou à la perturbation créées par un certains nombres de facteurs. Ces réactions se caractérisent essentiellement par quatre symptômes : rougeur, tumeur, chaleur et douleur.

Inhalation : Action de respirer par le nez la vapeur produite par une préparation médicinale bouillante.

Intoxication alimentaire : Ensemble des troubles secondaires par l'ingestion d'aliments que ces dus à une contamination bactérienne.

Opportuniste : Microorganisme présent dans la flore (association d'espèce bactérienne vivant à l'état commensal sur leur hôte) normale de l'individu, qui n'est pas pathogène pour l'homme dans les conditions normales, mais qui devient pathogène suite affaiblissement des défenses de l'organisme.

Prolifération : Multiplication de cellules ou de bactéries.

Pulmonaire : Qui se rapporte au poumon.

Rhumatisme : Terme générique vague se rapportent à un groupe d'affections aiguës ou chroniques d'origine diverses et parfois inconnues affectant essentiellement les articulations.

Scavenger : Terme anglo-saxon signifiant piégeur.

Septicémie : Etat morbide dû à la dissémination sanguine de germes pathogènes provenant d'un foyer infectieux.

Tonique : Fortifie ou stimule l'activité de l'organisme.

Toxi-infection : Intoxication par des toxines bactériennes.

Un expectorant : Est un médicament ou une herbe qui augmente l'expulsion du mucus de la trachée ou des bronches par de l'expectoration ou de la toux

eupnéique : Ayant une respiration normale.

Béchiqque : Qui guérit la toux.

Un antispasmodique (ou spasmolytique) : est un produit permettant de lutter contre les spasmes musculaires

Glossaire Botanique

Actinomorphe (ou régulière) : Se dit d'une fleur dans les pièces des verticilles (sépalés, pétales, étamines) sont rangées selon la symétrie axiale.

Angiospermes : Ce terme ressemble toutes les plantes dont les ovules sont inclus dans un ovaire clos. Après la fécondation, l'ovaire des angiospermes se transforme en fruit renfermant des graines.

Arbre : Plante ligneuse, à tige ou tronc unique et droit dont la taille d'au moins 5 à 7 m de hauteur, peut être considérable à l'âge adulte, non rameaux à la base, ne porte pas de branche qu'à partir d'une certaine hauteur au dessus du sol. Les branches se divisent en rameaux sur lesquels s'attachent les feuilles.

Arbustes : Végétal ligneux dont la taille est inférieure à 7 m, produisant un grand rameaux grêles mais présentant, par ailleurs, tous les caractères d'arbre. Les arbustes peuvent être à feuilles caduques ou à feuilles persistantes.

Capsule : Fruit sec, à déhiscences variées, à nombreuses graines, contenant une ou plusieurs loges et dérivant d'un ovaire à plusieurs carpelles.

Ecorce : Couche externe d'une tige ligneuse, d'un tronc d'arbre, de ses branches ou d'une racine et qu'on peut détacher ; elle est de couleur, de consistance, de forme et d'épaisseur variable selon les espèces. S'exfoliant à sa partie externe et elle se renouvelle par le phellogène.

Étamine : Pièce formée de deux parties, les filets et l'anthère (partie terminale, élargie d'une étamine et renfermant, ordinairement, les grains de pollen).

Falciforme : Se dit d'un organe (feuilles le plus souvent) dont la forme arquée rappelle celle d'une faux ou d'une faucille.

Feuille : C'est l'organe principal de la photosynthèse, de la respiration de la transpiration des plantes; à son niveau se font les échanges entre le végétal et l'atmosphère.

Fruit : Ovaire mûr (habituellement après fécondation) et toute autre structure qui lui est étroitement associée.

Graine : Ovule fécondé par le pollen et renfermant l'embryon et ses réserves.

Gymnospermes : Ce sont des végétaux souvent de grande de taille, caractérisées par des graines nues c'est-à-dire non enfermées dans un carpelle comme les angiospermes.

Ligneux : Qualifie un organe (tige, rameau ou racine) ou une plante pourvue d'un appareil de soutien bien développé, de nature analogue à celle du bois.

Limbe : Partie élargie de la feuille surmontant le pétiole.

Ombelle : Type d'inflorescence indéfinie chez laquelle les pédoncules floraux, tous de même taille sont insérés au même niveau.

Opercule : Petit couvercle de certains fruits à déhiscence circulaire.

Opposé : Se dit d'organes insérés par deux, l'un face à l'autre à la même hauteur.

Persistant : Qualifie des organes (feuille, calice, style) qui subsistent à la fin de chaque cycle végétatif annuel.

Sessiles : Se dit de tout organe (fleur, fruit, feuilles) dépourvu de pédoncule, pédicelle ou pétiole et s'insère directement à l'axe principal.

Un lignotuber : Est un renflement riche en amidon qui se forme sur les racines ou les tiges souterraines de certaines plantes. pour lesquelles les lignotubers sont une assurance de survie en cas d'incendie ou de prédation par les animaux. Ils sont capables d'émettre des rejets à partir de bourgeons naissant à la surface du lignotuber, phénomène connu sous le nom de recépage.

Glauque : De la couleur vert moyen tirant sur le bleu comme la mer.

Limbe : Le limbe est la partie élargie de la feuille surmontant le pétiole. Il peut prendre des formes très variables. La diversité des limbes est due principalement à la diversité des modes de nervation et ensuite au plus ou moins grand découpage du limbe dans chaque type de nervation.

Un pétiole (du latin *petiolus* : petit pied) : Désigne la pièce foliaire, reliant le limbe à la tige. Le pétiole a la structure interne d'une tige. C'est l'équivalent du pédoncule pour le fruit.

Un cotylédon : Ressemble à une feuille mais n'en est pas une au sens embryologique du terme (elle ne provient pas d'un bourgeon). C'est une structure de réserve qui permet également la photosynthèse dans les premiers jours de la plante. Elle finira par disparaître lorsque les feuilles auront pris le relais.

Rutacées : Est une Famille de plantes dicotylédones, dialypétales, comprenant des herbes (rue, fraxinelle), des arbustes ou des arbres (citronnier, oranger) croissant dans des régions chaudes ou tempérées et caractérisées par la présence d'un appareil sécréteur interne.

Zingibéracées : Est une famille de plantes monocotylédones qui comprend 700 espèces réparties en une cinquantaine de genres. Ce sont des plantes herbacées pérennes, productrices d'huiles essentielles, des régions tropicales.

Lamiaceae: Famille de plantes dicotylédones de l'ordre des lamiales dont le type est le lamier (*Lamium*). L'ancien nom de famille des lamiacées, à laquelle appartient la sauge, vient du latin *labium* qui veut dire « lèvre » et caractérise la forme des fleurs en forme de « gueule » entourée de ses 2 lèvres pulpeuses.

Les Asteraceae : Sont des plantes ordinairement herbacées dans nos régions mais pouvant être arborescentes ou arbustives. Les feuilles sont alternes, moins souvent opposées, rarement verticillées, toujours exstipuléées..

Les cupressacées : Conifère résineux tel que le cyprès, le thuya et le genévrier, constituent, selon les auteurs, une famille ou une tribu d'abiétacées, les cupressinées.

Pipéracées : Famille de plantes dicotylédones apétales, herbacées et arbustives des régions tropicales, comprenant de nombreuses espèces dont les principales sont le cubèbe et le

poivrier, très recherchées pour leurs propriétés aromatiques, astringentes et narcotiques, ou pour leurs qualités ornementales.

G

Aphis gossupii : Puceron du cotonnier, Puceron du melon

Pediculus humanus : Le terme de pou est un nom vernaculaire ambigu qui désigne avant tout, en français , un insecte parasite de l'homme, qui donne la pédiculose du cuir chevelu ou la pédiculose corporelle.

Musca domestica : La mouche domestique est la plus commune des espèces de mouches. Elle porte le nom de domestique bien que ce ne soit pas un animal domestique, mais c'est un insecte qui entre volontiers dans les maisons (domus en latin). Cette synanthropie en fait l'un des insectes ayant la plus vaste aire de répartition dans le monde.

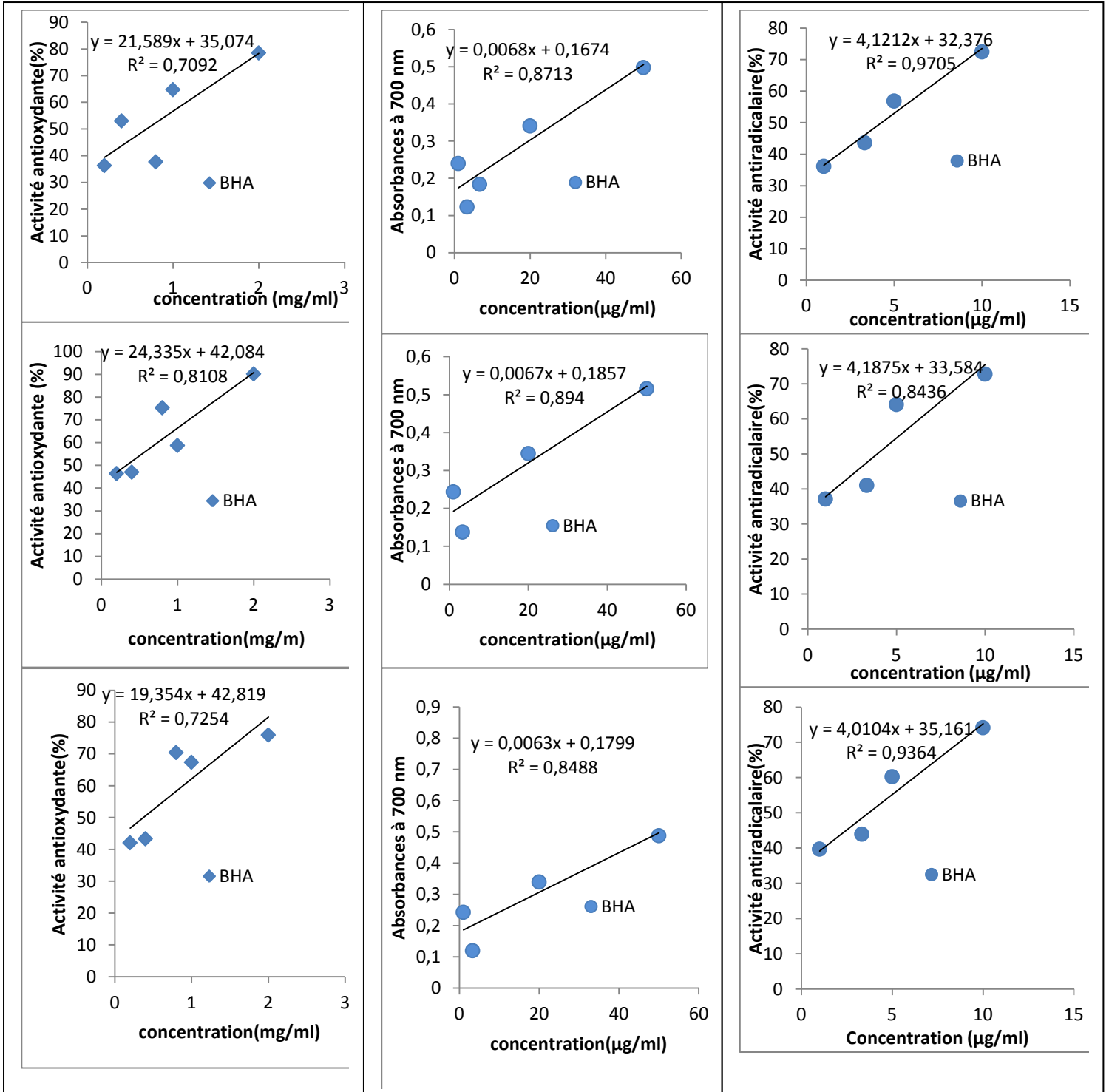
Annexes

Annexe 1 : Les courbes de régressions utilisées pour calculer les IC 50 du BHA(Standard) :

1-β -carotrene

2-Pouvoir réducteur du fer

3-DPPH

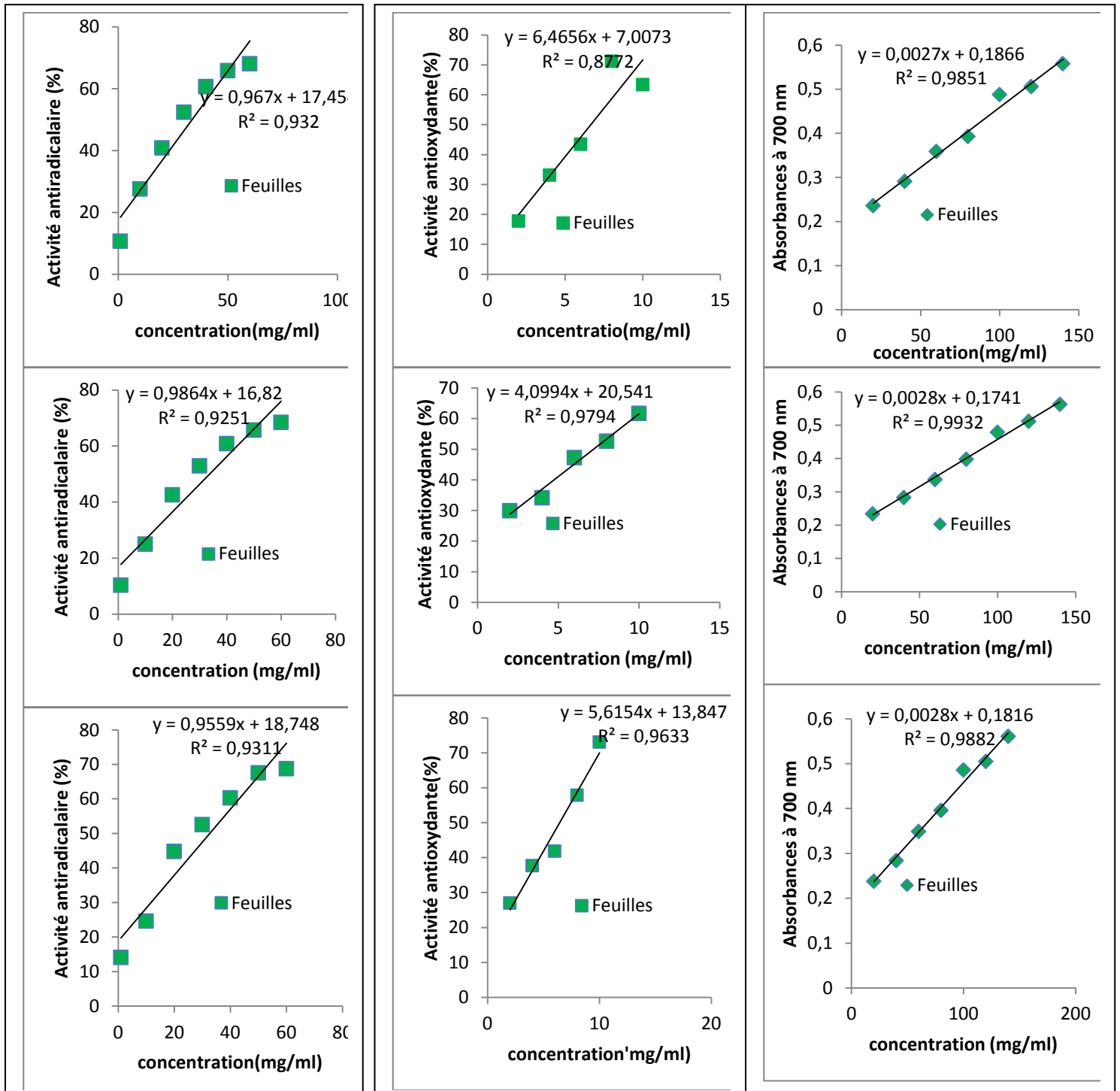


Annexe 2: Les courbes de régression de calcul des IC 50 des différents tests (Feuilles)

1-DPPH

2-β-carotene

3-Le pouvoir réducteur

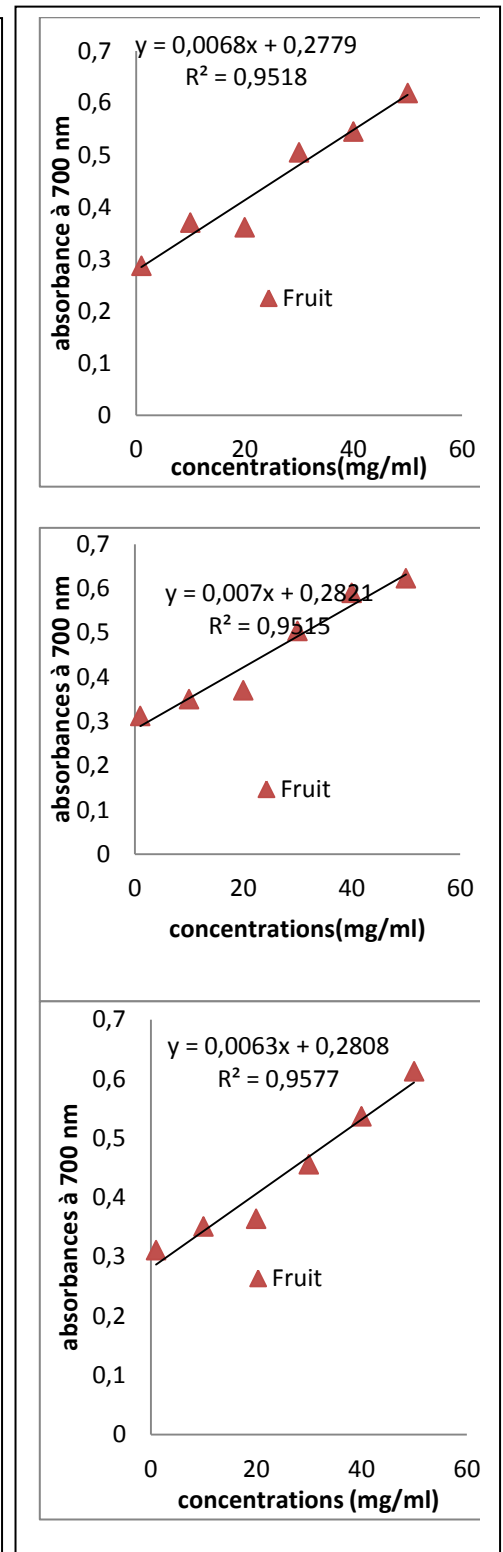
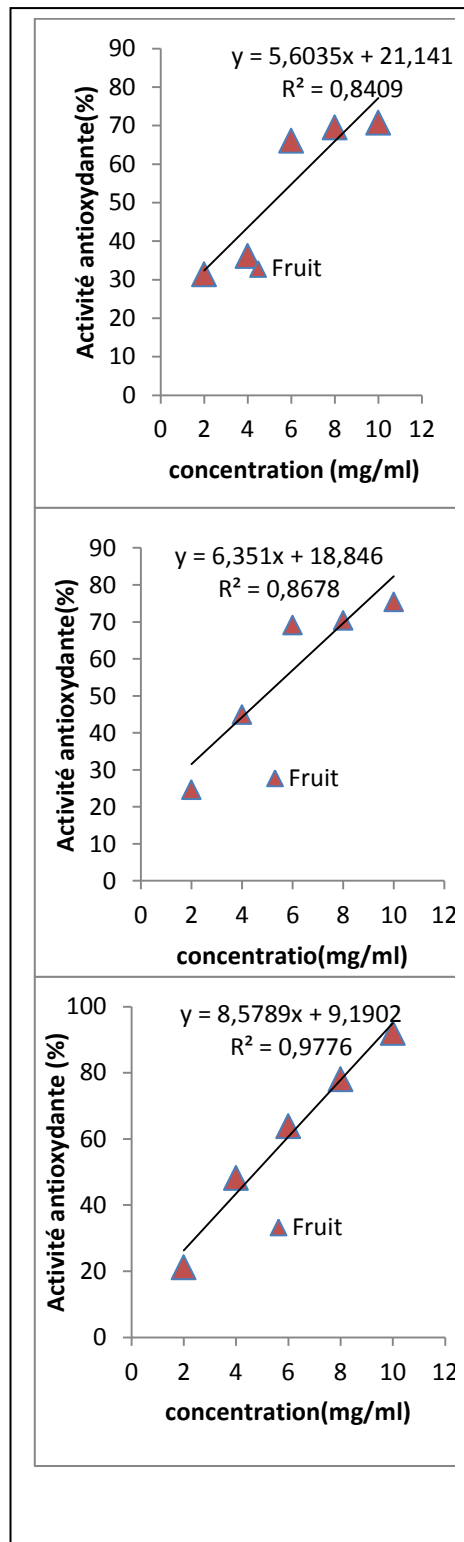
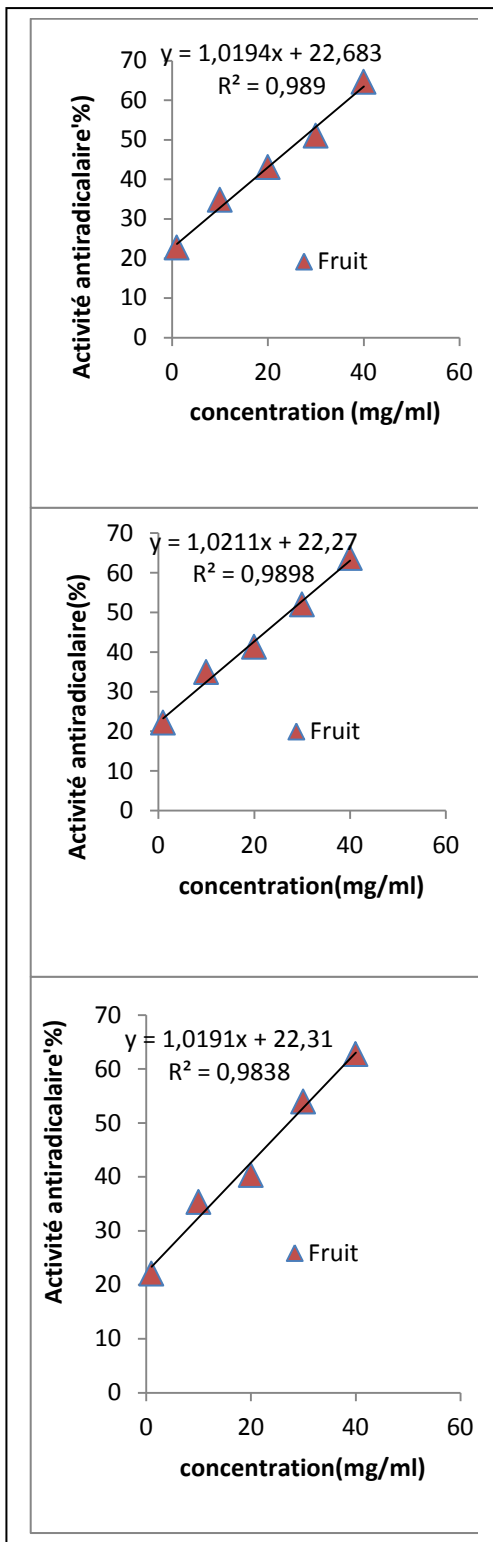


Annexe 3 : Les courbes de régression de calcul des IC 50 des différents tests (Fruit)

1-DPPH

2- B-carotene

3-Pouvoir réducteur



Annexe 6 : Résultats des comparaisons multiples des diamètres zones d'inhibitions par le test de Tukey ($P < 0,05$) :

Les feuilles :

Modalité	Moyenne estimée	Groupes		
<i>P.aerugenosa</i> FL 100%	11,500	A		
<i>E.coli</i> FL100%	16,000		B	
<i>L. monocytogene</i> FL100%	16,000		B	
<i>B.subtilis</i> FL 100%	16,000		B	
<i>E. coli</i> FL100%	16,750		B	
<i>S.aureus</i> FL 100%	21,333			C

Fruit :

Modalité	Moyenne estimée	Groupes			
<i>L. monocytogene</i> FT 100%	15,333	A			
<i>E. coli</i> FT 100%	16,833	A			
<i>B.subtilis</i> FT 100%	21,333		B		
<i>P.aerugenosa</i> FT 100%	24,667			C	
<i>S. aureus</i> FT 100%	26,667				D

Fruit et feuilles :

Modalité	Moyenne estimée	Groupes			
<i>S. aureus</i> FT 100%	26,667	A			
<i>P.aerugenosa</i> FT 100%	24,667	A			
<i>B.subtilis</i> FT 100%	21,333		B		
<i>S.aureus</i> FL 100%	21,333		B		
<i>E. coli</i> FT 100%	16,833			C	
<i>E. coli</i> FL100%	16,750			C	
<i>B.subtilis</i> FL 100%	16,000			C	
<i>E.coli</i> FL100%	16,000			C	
<i>L. monocytogene</i> FL100%	16,000			C	
<i>L. monocytogene</i> FT 100%	15,333			C	
<i>P.aerugenosa</i> FL 100%	11,500				D

Annexe 5 : Composition des milieux de cultures utilisés :

Mueller-Hinton	
Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	10 g
	pH = 7,4

Gélose nutritive	
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
	pH = 7,2

Eau physiologique	
Chlorure de sodium 0,9%	9 g/L

Bouillon nutritif	
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
Chlorure de sodium	5 g
	pH = 7,2

Annexe 4 : Résultats des comparaisons multiples des valeurs des IC 50 par le test de Tukey

Tableau I : Test du β -carotène

Modalité	Moyenne estimée	Groupes		
BHA	0,455	A		
Fruit	4,933		B	
Feuille	6,647			C

Tableau II : Test du pouvoir réducteur du fer.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes	
Fruit	32,861	A	
Feuille	115,393		B

Tableau III : Test du pouvoir antiradicalaire :

Modalité	Moyenne estimée	Groupes	
Fruit	27,041	A	
Feuille	33,329		B

Annexe 8

Tableau I : CMI et CMB(mg/ml) des He du fruit et des feuilles d'E.globulus

Bacterie	He du fruit.		He Feuilles	
	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>B.subtilis</i>	4	4,52	9,135	13,70
<i>S.aureus</i>	4	9,051	4,57	18,26
<i>E.coli</i>	4	4,52	9,135	9,135
<i>P.aerugenosa</i>	5	9,05	13,70	18,26
<i>L.monocytogene</i>	3	3,62	4,57	9,135

Tableau II : Diametre des zones d'inhibition du fruits(mm)

Diamètre des zones d'inhibition de l'He des fruits (mm)				Tétracycline	gentamycine
	100%	75%	50%	30µg/disque	10µg/disque
<i>B.subtilis</i>	21,33 ± 1,15 (S)	20,33 ± 0,60 (S)	19,0 ± 1,00 (S)	16,17 ± 1,04	0,00 ± 0,00
<i>S.aureus</i>	26,67 ± 0,29 (S)	21,5 ± 1,8 (S)	19 ± 2,02 (S)	25,0 ± 1,00	35,87 ± 0,42
<i>E.coli</i>	16,83 ± 0,29 (S)	16 ± 1,00 (S)	14,5 ± 0,50 (S)	27,5 ± 0,5	28,9 ± 0,79
<i>P.aerugenosa</i>	24,67 ± 0,58 (S)	23,33 ± 0,6 (S)	20,7 ± 0,38 (S)	0,00 ± 0,00	30,67 ± 0,42
<i>L.monocytogene</i>	15,33 ± 0,58 (S)	14 ± 1,00 (S)	13 ± 0,58 (S)	28,27 ± 0,83	26,27 ± 0,25

Tableau III : Diamètre des zones d'inhibition des He des feuilles

Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	100%	75%	50%
<i>B.subtilis</i>	16 ± 1,00 (S)	15,67 ± 1,5 (S)	14,7 ± 0,51 (S)
<i>S.aureus</i>	21,33 ± 0,58 (S)	19,5 ± 0,5 (S)	16,7 ± 0,51 (S)
<i>E.coli</i>	16,5 ± 0,5 (S)	14 ± 0,9 (S)	13,3 ± 0,51 (S)
<i>P.aerugenosa</i>	11,5 ± 0,5 (I)	9,33 ± 0,6 (I)	8,7 ± 0,51 (I)
<i>L.monocytogene</i>	16 ± 1,00 (S)	13,83 ± 0,3 (S)	11,3 ± 0,69 (I)

(A). aureus, (B) *B.subtilis*, (C) *E.coli*, (D) *P.aerugenosa*, (E) *L.monocytogene*.

(S) : sensible, (I) Intermédiaire, suivant la classification De Billerbeck, 2007.

Résumé

Eucalyptus globulus est une plante très connue pour ses vertus thérapeutiques et assainissantes. Dans le but de mettre en valeur les huiles essentielles (HEs) de ses feuilles et de son fruit, nous avons étudié leur composition, et leurs propriétés biologiques. L'extraction des HEs a été réalisée par hydrodistillation avec un appareil de type clevenger. Les feuilles ont donné un rendement de 2,53% contre 3,11% pour le fruit. La composition des deux HEs a été déterminée par CPG/SM, et 34 composés sont identifiés dans le fruit (Globulol (30%), Alloaromadendrene (25%), Eucalyptol (12,4%), α -pinene (4,86%), Ledene (3,97%), Isovaleraldehyde (3%) et d'eudesmol (2,67%)) ;et 30 dans les feuilles (1,8 cineole (64,92%), Isovaleraldehyde (11,8%), Epiglobulol (7,52%), α -terpineol (6,41%), α -pinene (5,42%), Crypton (3,64%), O-cymen (2,15%), et 2 pentanon4hydroxymethyl (1,98%)). Les résultats de l'activité antioxydante montrent que le BHA a le plus fort potentiel antioxydant avec des valeurs de IC50 de 3,96 μ g/mL, 48 μ g/mL et 0,475 mg/mL pour les tests du DPPH, le pouvoir réducteur et le β -carotène, respectivement; suivi du fruit (27,04 mg/mL, 32,86 mg/mL et 4,93 mg/mL), et des feuilles (33,32mg/mL, 115,39mg/mL et 6,75mg/mL). L'activité antibactérienne a révélé un effet inhibiteur des huiles essentielles vis-à-vis de toutes les bactéries testées avec des valeurs de CMI de 3 et 4 mg/mL pour l'HE du fruit, et des valeurs comprises entre 4,52 et 13,7 mg/mL pour les HEs des feuilles. Un effet bactéricide est observé avec des CMB variant de 3,62 mg/mL et 9,05 mg/mL pour les HEs du fruit et de 9,135 à 18,26 mg/mL pour celles des feuilles. Les résultats montrent également la sensibilité de *S. aureus* aux deux HEs, et celle de *P. aeruginosa* aux HEs du fruit. Mais les deux HEs semblent avoir le même effet sur *B. subtilis*, *E. coli* et *L. monocytogene*. Les résultats de notre étude confirment les propriétés biologiques des HEs des feuilles et mettent en valeur celles du fruit de la plante *E. globulus*.

Abstract

Eucalyptus globulus is very famous for its therapeutics effects, so, in order to develop the use of essential oils of its leaves and fruits, we have studied their composition, and their biological properties. The extraction of essential oils was realized by hydrodistillation with a Clevenger type apparatus. The yields of extractions are 2,53% and 3,11% for leaves and fruits respectively. The composition of essential oils was determined by GPC/MS.34 components were identified in fruit(Globulol (30%), Alloaromadendrene (25%), Eucalyptol (12,4%), α -pinene (4,86%), Ledene (3,97%), Isovaleraldehyde (3%) and d'eudesmol (2,67%))and 30 in Leaves: (eucalyptol(55,9%),isovaleraldehyde(10,16%),globulol(2,99%), α -terpineol(5,52%), α -pinene(4,67%),Crypton (3,13%),O-cymen,(1,87%), 2pentanon 4hydroxymethyl (1,98%). Results of the antioxidant activity revealed that BHA showed the best antioxidant potential with the follow IC50 values (3,96 μ g/mL, 48 μ g/mL et 0,475mg/mL),for the DPPH, reducing power and the β -carotene bleaching respectively, followed by fruits (27,04 mg/mL, 32,86 mg/mL et 4,93 mg/mL), and leaves (33,32mg/mL, 115,39mg/mL et 6,75mg/mL). The antibacterial activity show an inhibition effect of essential oils against all the tested bacteria with MIC values of 3 and 4mg/mL for the fruits, and they are comprised between 4,52mg/mL and 13,7mg/mL for the leaves. A bactericidal effect is observed, with MBC varying between 3,62mg/ml and 9,05 for fruits, and 9,135 at 18,26 for the leaves. Our results showed the sensibility of *S.aureus* for the two essential oils, the sensibility of *P.aeruginosa* for the fruit essential oil. The same effect of the essential oils is noted for *B.subtilis*, *E.coli*, and *L.monocytogene*. Our results confirm the the biological effects of essential oils of leaves, and valorize the biological properties of essential oils of fruits of *E.globulus*.

ملخص:

تعرف نبتة الكاليتوس بفوائدها الصحية و التطهيرية. قنا بهذه الدراسة من اجل المقارنة بين الخصائص البيولوجية لازيوت الطيارة لأوراق و ثمرات هذه ملخص

النبتة استخلاص الزيوت الطيارة تم بواسطة التقطير المائي و قد توصلنا إلى مردود يقدر ب 2.53 % بالنسبة للأوراق أما الثمرة قد حصلنا على 3.11 % .

بالنسبة لمكونات هذه الزيوت فقد تم التعرف على 34 مكون للثمرة (الغلوبولول 30%)، الواروماداناران 25% اكالبتول 12,4 % الفابنان 4,86% لدان 3,97 % ازوبالدهيد 3% اندسمول 2,67%

أما الأوراق فهي مكونة من السنيول 55,9%، ازوبرالدهيد 11,8%، الغلوبولول 7,52%، ألفاتربانيول 6,41%، ألفابنان 5,42%، والكربتون 3,64% و مكونات أخرى

نتائج الفعالية ضد الأكسدة اظهرت أن BHA اكثر فعالية ضد الأكسدة اذ حصل على النتائج التالية: 3.96 مكروغ امل ، 48 مكروغ امل و 0.475 مكروغ امل للثمرات التالية باحترام الترتيب التالي لتثبيت الجذور الحرة، قوة ارجاع الحديد، تبيض البتا كروتان ثم ثليه الثمرات بالنتائج التالية : (27.04 مغ امل ، (32.86 مغ امل) وفي الأخير تأتي الأوراق (32,33 مغ امل ، 39,115 مغ امل ، 93,6 مغ امل

أما بالنسبة لفعالية هذه الزيوت على بعض البكتيريا فهي جيدة اذ أنها تمكنت من كبح نموها بتركيز 3 مغ امل و 4 مغ امل بالنسبة للثمرات ، أما الأوراق فهي ما بين 4,52 مغ امل و 13,7 مغ امل .

أظهرت النتائج أن كلا العينتين لها فعالية قاتلة لجميع البكتيريا المدروسة اذ أعطت التراكيز التالية القاتلة للبكتيريا 3,62 مغ امل الى 9,05 مغ امل أما الأوراق فهي ما بين 9,132 و 18,26 مغ امل .

بكتيريا *S.aureus* اظهرت تحسسها الزائد لكل من الأوراق، الثمرات، لكن بكتيريا *P.aeruginosa* حساسة للثمرات فقط لكنها تقاوم زيت الأوراق ، أما بالنسبة للبكتيريا التالي *E.coli et L.monocytogene* هي حساسة لكلا من الزينين _ نتائج دراستنا تثبت مميزات الزيوت الطيارة لأوراق الكالتوس وتقيم الزيوت الطيارة للثمرات نبتة الكالتوس.