**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE DE MEDEA**

**FACULTE DES SCIENCES**



**Mémoire**

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Biologie

**Spécialité :** Biotechnologie et Microbiologie appliquée

**Présenté Par :**

**HAMIDA Linda** **HADJA Sabiha**

**Thème**

# Etude biologique des huiles essentielles extraites a partir des feuilles sèches *d'Eucalyptus blakelyi L.* et *Eucalyptus cladocalyx L.*

**Devant les jurys : 21- 06- 2018**

| | | |
|---|---|---|
| Mme **BOUKHALFOUN Leila** | MAB | Promotrice |
| Mme **ZIOUANI Lydia** | MAB | President |
| Mme **BOUHERAMA Amina** | MAB | Examinateur 1 |

***Année Universitaire : 2017/2018***

# *Remerciement*

*Je remercie tout d'abord le bon Dieu qui m'a donné le courage et la patience pour terminer ce modeste travail. Je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude à notre encadreur Mme BOUKHALFOUN Leila Pour sa prise en charge et ses bons conseils, qui ont abouti à l'élaboration d'un travail qui, nous l'espérons, sera satisfaisant.*

*Nous tenons à remercier Mr Ainas pour son aide et ses conseils précieux.*

*Mme ZIOUANI Maitre assistante qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.*

*Je remercie les membres du jury qui m'ont honoré on acceptant d'examiner ce travail.*

*Mr DJENEN Maitre assistante qui m'a fait le grand honneur d'accepter de Faire partie du jury*

*Mm BOUHRAMA Maitre assistante qui m'a fait le grand honneur d'accepter de Faire partie du jury*

*Mes sincères remerciements vont également à toute l'équipe du service de laboratoire de pédologie et microbiologie du département science de la nature et de la vie, pour leur aide et collaboration.*

*Nous remercions les gens du laboratoir de recherche du l'université de boumerdes ,du laboratoire de l'université de chlef et l'institut nationnalle de la recherche forestiere à Bainem .*

*Et enfin nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à La réalisation de ce travail.*

# Dédicace

Les louanges sont à Allah seigneur des mondes qui ma comblé

de grâce en me permettant d'achever en bonne santé ce modeste

travail que je dédie :

A ceux que j'aime du fond de mon coeur, à qui je dois la vie et qui

n'ont cessé, à aucun moment, de me soutenir et de m'encourager

par leurs prières et leurs sacrifices : Mes chers parents ;

A mon ange ranim ainsi  mes frères, ma belle soeur

A ma grande mère, à touts les étudiants du Master II du département

science de la nature et de la vie ,

et bien sûr à mon binôme Linda

*Sabiha*

# *Dédicace*

Dédicace  à ma mère et A la mémoire  de mon père

Qui m'ont soutenu moralement tout au long  de mes études.

Aussi je dédie ce travail

A mes frères  amine, mohamed redha et  abdelrahim

A mes sœurs : ratiba, chahrazed, loubna et naziha

A ma chère et  mon binôme sabiha et la petite ranim

A toute ma famille

A tous mes amis et camarades

A tous personnes que n'aurions nommées ici et tous que connue moi.

*Linda*

## Résumé

Les huiles essentielles ont de nombreuses propriétés thérapeutiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine fongique, les dermatophytes, celles d'origine bactérienne. Le but de notre étude est de déterminer l'effet antimicrobien, antifongique et antioxydant d'huile essentielle, de *l'Eucalyptus blakelyi.L* et *Eucalyptus cladocalyx.L* végétale sur certaines bactéries et champignons pathogènes. Ou le rendement a été enregistré pour *Eucalyptus cladocalyx.L* 0.58 % et 2.5 % pour *Eucalyptus blakelyi.L*. Le critère adopté pour l'activité antibactérienne et antifongique est basé sur la méthode de diffusion en milieu solide (sensibilité). Notre étude révèle que l'huile essentielle de *l'Eucalyptus cladocalyx.L* à une forte activité antibactérienne en marquant sept souches sensibles et deux résistantes par rapport à l'huile essentielle *d'Eucalyptus blakelyi.L* qui a marqué cinq bactéries sensibles et quatre résistantes , ainsi les deux souches fongiques *Cadida albicans*, *Rhizopus sp* sont faiblement sensibles à les deux huiles d'Eucalyptus .les huiles essentielles des ceux espèces ont été testées pour leur pouvoir antioxydant en utilisant les techniques de DPPH, le pouvoir réducteur en la comparant à la vitamine C . Les huiles de feuilles d'*Eucalyptus bakelyi.L* avaient des activités de piégeage des radicaux supérieure à celles d'*Eucalyptus cladocalyx.L* avec une valeur d'EC50 égale à **141.17**µg.ml-1 **470.58µg.ml-1** respectivement, la vitamine c a montré une activité plus élevées avec un valeur d'EC50 égale à 0.61µg.ml-1.

**MOTS-CLéS** : *Eucalyptus blakelyi.L*,*Eucalyptus cladocalyx.L* , huile essentielle .antioxydant

DPPH, EC50.

# ABSTRACT

Essential oils have many therapeutic properties. In herbal medicine, they are used for their antiseptic properties against infectious diseases of fungal origin, against dermatophytes, those of bacterial origin. The aim of our study is to determine the antimicrobial,antifungal effect and antioxydant of essential oils of the plant *Eucalyptus cladocalyx.L* and *Eucalyptus blakelyi.L* on some pathogenic bacteria and fungic . Where the yield has been registered for *Eucalyptus cladocalyx.L* 0.58% and 2.5 % for *Eucalyptus blakelyi.L* .The test adopted is based on tne animicobial and antifungal activity with the diffusion method on solid medium (sensitivity), this method allows determining the susceptibility or resistance of an organism for the sample studied. our study reveal that the oil essential of *Eucalyptus cladocalyx*.L have a strong antimicrobial activity by marking seven strains sensitive and two resistant compared with the oil essential of Eucalyptus who scored five strains sensitive and four resistant . as well as , both fungal strains *Cadida albicans*, *Rhizopus sp*

Are weakly sensitive to the two Eucalyptus oils. the essential oils of both species have been tested for their antioxidant power using DPPH techniques the reducing power by comparing it with vitamin C. *Eucalyptus.blakelyi.L* leaf oils had a high radical scavenging activities than those of *Eucalyptus. Cladocalyx.L* with an **EC50** value equal to **141.17µg.ml-1** and *Eucalyptus cladocalyx.L* **470.58µg.ml-1** respectively, the Vitamin C showed higher activity with **EC50** value equal to **0.61µg.ml-1.**

**KEYWORDS***:, Eucalyptus blakelyi.L*, *Eucalyptus cladocalyx.L*, antioxidant essential oil

DPPH, EC50.

# ملخص


الزيوت الأساسية لديها العديد من الخصائص العلاجية يتم استخدامها في الأدوية العشبية ضد الأمرض التي تسببها البكتيريا

و كان الهدف من دراستنا تحديد تأثير مضادات المكروبات و مضادات الأكسدة للزيت العطري *Eucalyptus cladocalyx*و *Eucalyptus blakelyi.L* النباتية على بعض البكتيريا و الفطريات الضارة و تم تسجيل المردود بنسبة 0.58 بالمائة *Eucalyptus cladocalyx*و 2.50 بالمائة *Eucalyptus blakelyi.L* نعتمد في التجارب المحققة استعمال مضادات البكتيريا و الفطريات على طريقة الانتشار في الوسط الصلب .تكشف دراستنا أن الزيت الأساسية *Eucalyptus cladocalyx.L لها* قدرة عالية ضد البكتيريا نسجل سبعة بكتيريا حساسة و بكتيريتان غير حساسة مقارنة بالزيت الأساسية *Eucalyptus blakelyi.L*التي سجلت خمس بكتيريا حساسة و اربع بكتيريا غير حساسة .نسجل أيضا أن لفطر*Candida albicans* و *Rhizopus sp* حساسية ضعيفة ضد الزيت العطرية *Eucalyptus*.تم اختبار مضادات الأكسدة للزيوت العطرية بطريقة DPPH* مقارنة مع الفيتامين س .سجلت قيمة CE50 *Eucalyptus blakelyi.L* ب 141.17µg.ml-1 و **470.58µg.ml-1** ل *Eucalyptus cladocalyx.L* .سجلت الفتامين س القيمة الأعلى ب 0.61µg.ml-1.



الكلمات المفتاحية : *Eucalyptus blakelyi.L,Eucalyptus cladocalyx.L* ,الزيوت الأساسية, مضادات الأكسدة

# Liste des abréviations

| | |
|---|---|
| AFNOR | Association Française de Normalisation |
| °C | Degré Celsus |
| CMI | Concentration Minimale Inhibitrice |
| G | Gramme |
| H | Heures |
| MH | Muller Hinton |
| Ml | Millilitre |
| µl | Microlitre |
| Mm | Millimètre |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CE50 | Concentration Efficace à 50% |
| DO | Densité Optique |
| DPPH* | Diphenylpicrylhydrazine |
| PDA | Potato Dextrose Agar |
| PR | Pouvoir de la Réduction en % |

# Liste des figures


| | | |
|---|---|---|
| **Figure 01** | Structure chimique d'isoprène ($C_5H_8$) | **6** |
| **Figure 02** | Structures chimiques de quelques composés d'huile essentielle | **7** |
| **Figure 03** | arbre adulte d'*E.blakelyi* | **18** |
| **Figure 04** | les bourgeons d'E.blakelyi | **18** |
| **Figure 05** | l'écorce d'*E blakelyi* | **18** |
| **Figure 06** | les feuilles et fruits d'*E blakelyi* | **18** |
| **Figure 07** | arbre adulte d'*E cladocalyx* | **20** |
| **Figure 08** | les bourgeons d'*E cladocalyx* | **20** |
| **Figure 09** | l'écorce de l'*E cladocalyx* | **20** |
| **Figure 10** | le fruit d'*E.cladocalyx* | **20** |
| **Figure 11** | Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Pétri | **22** |
| **Figure 12** | Illustration de la méthode des microatmosphères | **23** |
| **Figure 13** | Illustration de la méthode de dilution d'agar | **24** |
| **Figure 14** | Illustration de la méthode de dilution bouillon | **25** |
| **Figure 15** | Réaction du DPPH• avec un antioxydant | **28** |
| **Figure 16** | Photo de préparation des suspensions bactériennes | **34** |
| **Figure 17** | Photo ensemencement des suspensions fongiques Sur milieu PDA. | **36** |
| **Figure 18** | Dépôt des disques imprégné d'huile essentielle | **36** |
| **Figure 19** | Préparation des dilutions de la vitamine C. | **38** |
| **Figure 20** | Préparation des dilutions des huiles essentielles | **39** |
| **Figure 21** | Photo de galerie API20E pour *E.feacalis* | **42** |
| **Figure 22** | Photo de galerie API20E pour *E.coli* | **42** |
| **Figure 23** | représentation graphique des zones d'inhibition d'*E.blakylei* sur des souches bactériennes | **44** |
| **Figure 24** | représentation graphique des zones d'inhibition d'*E.cladocalyx* sur des souches bactériennes | **45** |
| **Figure 25** | Représentation graphique des zones d'inhibition d'*E.blakelyi* sur des souches fongiques | **48** |
| **Figure 26** | Représentation graphique des zones d'inhibition d'*E.cladocalyx* sur des souches fongique | **48** |
| **Figure 27** | Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique | **49** |

| | | |
|---|---|---|
| **Figure 28** | Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'e*ucalyptus blakelyi* | **50** |
| **Figure 29** | Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'*Eucalyptus cladocalyx* | **51** |

# Liste des tableaux


| | | |
|---|---|---|
| **Tableau I** | Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux Pays producteurs dans le monde en 2008 | **4** |
| **Tableau II** | Les caractères morphologiques ; le type respiratoire et le test de catalase | **41** |
| **Tableau III** | Illustration du profil biochimique de la souche *E.coli* et *E.faecalis* | **42** |
| **Tableau IV** | les zones d'inhibition (mm) de différentes dilutions d'*E.balkelyi* | **43** |
| **Tableau V** | Les zones d'inhibition de différentes dilutions d'*E.cladocalyx* | **45** |
| **Tableau VI** | la concentration minimale inhibitrice d'*E.cladocalyx* et *E.blakelyi* sur les souches bactériennes testées | **46** |
| **Tableau VII** | Les zones d'inhibition de différentes dilutions *d'E.cladocalyx et E.blakylei* sur les souches fongique | **47** |
| **Tableau VIII** | Pourcentage de réduction du DPPH par l'acide ascorbique | **49** |
| **Tableau IX** | Pourcentage de réduction du DPPH par *E.blakelyi* | **49** |
| **Tableau X** | Pourcentage de réduction du DPPH par *E.cladocalyx* | **50** |

Tableau des matieres

## TABLEAU DES MATIERES

Résumé
Remerciements
Partie bibliographie
Liste des figures
Liste des tableaux
Introduction..... 1

Partie I: Rappel Bibliographiques

chapitre I: Généralité sur les huiles essentielles

1.Bref historique ..... 3
2.Définitions ..... 3
3.production mondiale des huiles essentielles..... ..... 4
4 .Répartition ,localisation des huiles essentielles ..... 4
5 . critères de qualité ..... 5
5.1.Dénomination botanique..... 5
5.2.Conditions de la production de la plante ..... 5
5.3.Partie de la plante utilisée ..... 5
5.4 .Précision de chimiotype (ou chimotype)..... 5
5.5.Mode d'obtention de l'huile essentielle..... 6
5.6 .Identification et analyse chromatographique ..... 6
6.Propriétés physiques..... 6
7.Composition chimique des huiles essentilles..... 6
7.1.Monoterpènes..... 7
7.2.Sesquiterpènes..... 8
7.3.Composants odorants..... 8
8.Techniques d'extraction des huiles essentilles ..... 9
8.1.L'entrainnement à la vapeur d'eau ..... 9
8.2.La distillation à vapeur saturée ..... 9
8.3.L'hydro diffusion..... 10
8.4.L'hydro-distillation..... 10
8.5.L'expression à froid..... 10
8.6.Extraction par solvant..... 11

8.7.Extraction par les corps gras..... 11
8.8.Extraction par micro-ondes ..... 11
9.Toxicité des huiles essentilles ..... 12

Chapitre II : Etude des plantes sélectionnées ..... 13
1.Présentation botanique et géographique de la famille des Myrtaceae..... 13
2.Généralités sur l' Eucalyptus..... 13
3.Répartition géographique de l'eucalyptus en Algérie..... 14
4.Présentation géographyque et botanique du genre Eucalyptus..... 14
5.Proprietés thérapeutiques du genre Eucalyptus ..... 14
6.Dénomination internationale de *l'Eucalyptus blakelyi et Eucalyptus cladocalyx*..... 15
7.Classification phylogénitique d'Eucalyptus..... 16
8.Descreption botanique ..... 17
Chapitre III : Les activités biologiques des huiles essentielles
1.Itroduction ..... 21
2.Activité antimcrobienne..... 21
2.1.Méthodes d'evaluations de l'activité antimicrobienne..... 21
2.1.1.Evaluation de l'activité antibactérienne.....21
2.1.1.1.Méthode de l'arommatogramme.....21
2.1.1.2.Méthode de microatmosphère.....22
2.1.1.3.Méthode de dilution ..... 23
2.1.1.3.1.Méthode de dilution d'agar.....23
2.1.1.3.2.Méthode de dilution de bouillon.....24
2.1.2.Evaluation de l'activité antifongique .....25
3.Facteurs influençcant sr l'activité antimicrobienne.....25
3.1.Dispersion et solubilité des huiles essentielles.....26
3.2.Effet du dissolvant et émulsifiant.....26
4.Activité antioxydante.....27
4.1.Méthodes d'evaluation de l'activité antioxydante.....27
Partie II : Matériels et Méthodes
1.Matériels biologiques :
1.1.Matériels végétal .....30
1.1.1.La Récolte et séchage..... 30

1.1.2.Extraction des huiles essentilles .....30
1.1.3.Rendement des huiles essensielles.....31
2.Evaluation de l'ctivité antibactérienne .....31
2.1.Origine et choix des souches .....31
2 .2.Confiramation des souches .....31
2.2.1.Etude des caractères morphologiues .....31
2.2.2.Recherche des critères biochimiques .....32
3.Les milieux de cultures .....33
4.Préparation des suspenssions bactériennes .....33
5.Test de lactivité antibactérienne .....34
6.Evaluation de l'activité antifongique.....36
7.Cocentration minimale inhibitrice.....37
8.Evaluation de l'activité antioxydante.....37

Partie III: Resultat et discussion

**1. Rendement en huile essentielle d*'Eucalyptus blakelyi et cladocalyx***.....41
2.Activité antibactérienne.....41
2.1.Identification des bactéries .....41
2.2.Identification par la galerie API.....41
2.3.Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles .....43
3. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice .....46
4. Evaluation de l'activité antifongique huiles essentielles.....47
5 .Evaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles.....48

**2. Discussion**

# Introduction

# Introduction générale

Depuis l'antiquité, et certainement bien avant, les plantes ont servi de pharmacothèque naturelle et pragmatique pour l'homme. Personne ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissent, mais c'était un fait incontesté et qui paraissait magique. En effet il est étonnant qu'une feuille, une fleur ou une racine puisse guérir ou tout au moins soulager un état pathologique ou des troubles organiques. **(Schauenberg P. et Paris F., 2010)**

Après quelques siècles de domination de la synthèse chimique, la pharmacologie, mais aussi la nutrition et l'agroalimentaire redécouvrent les vertus des plantes dites médicinales, ce qui est le cas de toutes les plantes. Elles sont de plus en plus considérées comme source de matières premières essentielles pour la découverte de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments **(Maurice, 1997).**Mais leurs usages traditionnels n'ont jamais disparus, bien au contraire. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), en 2008, 80 % de la population mondiale repose sur la médecine traditionnelle pour leurs soins primaires. **(Pierangeli et al, 2009)**

Dans le bagage chimique des plantes, les huiles essentielles, les alcaloïdes et autres composés phénoliques, représentent des molécules de fortes valeurs, utilisées dans les industries pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. Les activités antibactériennes de ces produits ont été rapportées dans de très nombreux travaux. **(Bouzouita et al, 2008)**

Une huile essentielle est un produit odorant, de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique sans chauffage **(Bruneton, 2009).** Les végétaux riches en essences se trouvent surtout chez les Conifères, Myrtacées, Labiées, Ombellifères et Rutacées au niveau de différents organes de la plante **(Mautrait et Raoult, 2009).**

La plupart de leurs propriétés sont dues aux huiles essentielles produites par leur métabolisme secondaire **(Rashid et al, 2010).**

Ces huiles ont une activité biologique et thérapeutique aussi variée, par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. (Svoboda et Hampson, 1999)

# Introduction générale

L'activité des huiles volatiles réside dans les centaines de molécules chimiques qui la constituent comme les terpénoides.Ces derniers donnent à la plante son odeur, d'autres sont responsables du parfum. **(Cowan, 1999)**

Le domaine d'application des huiles essentielles sont diversifiés malgré l'arrivée sur le marché des composés de synthèse ; C'est ainsi qu'elles trouvent de nombreuses applications dans l'industrie chimique et dans le domaine de l'agroalimentaire (condiments, épices, aromatisants,…) et l'aromathérapie (parfumerie, cosmétique et savonnerie). **(Petitjean, 1974)**

Parmi les plantes de la flore Algérienne, les eucalyptus notamment *Eucalyptus blakeyli* et *Eucalyptus cladocalyx* , dont elles ont plusieurs utilisations (culinaire, pharmaceutique, etc.). Une recherche dans des travaux sur ces deux plantes médicinales nous a permis de trouver quelques études sur les effets de l'huile essentielle extraite des feuilles d'Eucalyptus des deux espèces. Dans ce contexte, cette étude a été menée pour évaluer l'activité antibactérienne, antifongique et antioxydante de l'huile essentielle extraite des feuilles *d'Eucalyptus blakeyli* et *Eucalyptus cladocalyx* .

Chapitre I

# Généralités sur les huiles essentielles

## 1. historique

Depuis la plus haute antiquité les parfums et les arômes forment parmi les premiers signes de connaissance qui marquent la vie des hommes. Ils furent étroitement associés à la vie spirituelle de l'homme (Egypte- Inde), ainsi qu'à l'histoire de la médecine (Grec, Empire Romains et Empire arabe).

Au début de XVI siècle, Parascelsus von Hohenheim, médecin Suisse considéré comme le père de la pharmacochimie étudie l'extraction de « L'âme » des végétaux sous forme de quintessencie ou cinquième essence dont laquelle on donnera le nom « d'esprit » et puis « d'essences » et finalement « huile essentielle » **(Bernard, 1988)**. Il existe aujourd'hui approximativement 3000 huiles essentielles, dont environ 300 sont réellement commercialisées, destinées principalement à l'industrie des arômes et des parfums **(Essawi et al. 2000)**.

## 2. Définitions

Il s'agit d'un mélange de composés lipophiles, volatils et souvent liquides, synthétisés et stockés dans certains tissus végétaux spécialisés. Extraites de la plante grâce à des procédés physiques tels l'hydro distillation, l'entraînement à la vapeur ou par expression à froid ; les huiles essentielles sont responsables de l'odeur caractéristique de la plante **(Bruneton, 1993).**

Les produits obtenus par extraction avec d'autres procédés ne sont pas repris dans la définition d'huile essentielle donnée par la norme AFNOR (Association Française de Normalisation) (**AFNOR, 2000).** Contrairement à ce que le terme pourrait laisser penser, les huiles essentielles ne contiennent pas de corps gras comme les huiles végétales obtenues avec des pressoirs (huile de tournesol, de maïs, d'amande douce, etc.). Il s'agit de la sécrétion naturelle élaborée par le végétal et contenue dans les cellules de la plante, soit dans les fleurs(bergamotier, rosier), soit dans les sommités fleuries (tagète, lavande), soit dans les feuilles(citronnelle, eucalyptus), ou dans l'écorce (cannelier), ou dans les racines (vétiver), ou dans les fruits (vanillier), ou dans les graines (muscade) ou encore autre part dans la plante **(Anton et Lobstein, 2005).**

Le terme « huile » s'explique par la propriété que présente ces composés, de Se solubiliser dans les graisses et par leur caractère hydrophobe. Le terme « essentielle » fait référence au parfum, à l'odeur plus ou moins forte dégagée par la plante **(Bruneton, 1993).**

## 3. Production mondiale des huiles essentielles

Plusieurs pays tirent une grande partie de leurs ressources de l'exploitation des plantes à huiles essentielles. On estime aujourd'hui à environ 40 000 le nombre d'espèces aromatiques croissant dans le monde dont 3 000 ont été étudiées et 300 sont exploitées Industriellement **(Souza et al.,2006).** Plus de 90 % des espèces à étudier et à valoriser poussent dans les pays tropicaux (**Ouamba, 1991**). Les principales huiles essentielles produites et les principaux pays producteurs sont résumés dans le tableau I.

Tableau I : Récapitulation des principales huiles essentielles produites et des principaux Pays producteurs dans le monde en 2008 (**Perfumer et Flavorist, 2009).**

| **Huiles essentielles** | **Production (Tonnes)** | **Principaux pays producteurs** |
|---|---|---|
| Huiles d'oranges | 51000 | USA, Brésil, Argentine |
| Huiles du citron | 9200 | Argentine, Italie, Espagn |
| Huiles de l'eucalyptus | 4000 | Chine, Inde, Australie, Afrique du Sud |
| Huile de la menthe | 3300 | Inde, USA, Chine |
| Huile du clou de girofle | 1800 | Indonésie, Madagascar |
| Huiles de la menthe verte | 1800 | USA, Chine |
| Essence de la citronnelle | 1800 | chine, Sri Lanka |
| Huiles du bois de cèdre | 1650 | USA, Chine |
| Huile de la lavande | 1100 | France |

## 4. Répartition, localisation des huiles essentielles

Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs. Il y aurait, selon Lawrence17500 espèces aromatiques. Les genres capables d'élaborer les constituants qui composent les huiles essentielles sont repartis dans un nombre limité de familles :Myrtacées, lauracées, rutacées, lamiacées, astéracées; opiacée ;cupressacées, zingibéracées,pipéracées…etc.

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux: des fleurs, des feuille, des écorces, des bois, des racines, et des rhizomes .Dans le cas le plus simple, les huiles essentielles se forment dans le cytosol des cellules où, soit elles se rassemblent en gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles, soit elles s'accumulent dans les

vacuoles des cellules épidermiques ou des cellules du mésophile de nombreux pétales **(Gehard;1993).**

D'autre structures histologiques spécialisées souvent localisées sur ou à proximité de la surface de la plante sont impliquées dans l'accumulation des huiles volatiles. Ces structures regroupent les poils et canaux secteurs et les poches sécrétrices **(Bruneton, 1999).**

## 5. Critère de qualité

Selon les recommandations françaises (2008), pour garantir leur qualité, les HE devront notamment être obtenues à partir de matières premières précisément identifiées, contrôlées selon des procédés définis, présentées des caractères physico-chimiques précis, être conservées de façon satisfaisante.

Les caractéristiques physiques, organoleptiques, chimiques et chromatographiques des HE sont définies sur le plan français par des normes établies par **l'AFNOR,** élaborées par une commission spécifique. Ces normes sont établies en étroite collaboration avec les producteurs ainsi que les importateurs et sont le fruit d'un échange entre experts.

### 5.1. Dénomination botanique

L'origine végétale du produit doit être définie avec précision par la dénomination scientifique botanique selon les règles.

### 5.2. Conditions de production de la plante

Les matières premières végétales sont obtenues à partir de plantes de collecte ou de plantes cultivées, ces dernières pouvant être issues de semis ou de bouturage.

### 5.3. Partie de la plante utilisée

Les HE peuvent être accumulés dans tous les types d'organes végétaux : les fleurs, les feuilles, dans les écorces, les bois, les racines, les rhizomes, les fruits secs, ou les graines.

### 5.4. Précision du chimiotype (ou chémotype)

Pour une même espèce botanique, il peut exister plusieurs races chimiques ou chimiotypes qui trouvent leur origine dans de légères différences des voies de biosynthèse, aboutissant à l'accumulation de métabolites secondaires différents.

### 5.5. Mode d'obtention de l'huile essentielle

Le choix de la technique dépend principalement de la matière première: son état originel et ses caractéristiques, sa nature proprement dite.

### 5.6. Identification et analyses chromatographiques

L'analyse des HE, l'identification des constituants, la recherche d'éventuelles falsifications peuvent se faire à l'aide de techniques telles que la chromatographie en phase gazeuse sur phases stationnaires polaires, apolaires, couplée avec une détection par spectrométrie de masse.

## 6. Propriétés physiques :

Liquides à température ambiante, les huiles essentielles sont volatiles, ce qui les différencie des huiles fixes. Elles ne sont que très rarement colorées. Leur densité est en général inferieure à celle de l'eau. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévie la lumière polarisée. Solubles dans les solvants organiques usuels, elles sont liposolubles **(Bruneton, 2008).**

## 7. Composition chimique des huiles essentielles

Les plantes aromatiques ont la particularité de renfermer au sein de leurs organes sécréteurs, des cellules génératrices de métabolites secondaires où il apparaît clairement comment les molécules très volatiles sont synthétisées à partir d'unités méthyl-2-buta-1,3-diène (isoprène) et où les réactions d'addition de ces unités conduisent aux terpènes, sesquiterpènes, di-terpènes et leurs produits d'oxydation tels que les alcools, aldéhydes, cétones, éthers et esters terpéniques. L'ensemble de ces produits sont accumulés dans des cellules sécrétrices offrant à la plante une odeur caractéristique **(HEINRICH et al. 1983).**

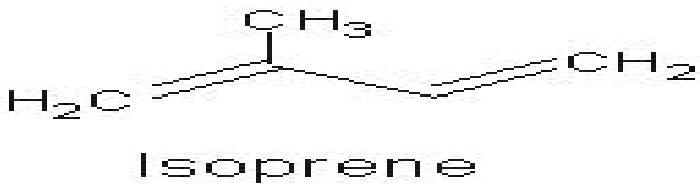



Figure 01 : Structure chimique d'isoprène $(C_5H_8)_n$

Les terpènes constituent une famille de composés largement répandus dans le règne végétal. Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité

isoprénique à 5 atomes de carbone ($C_5H_8$) reconnue par Wallach dès 1887. Cet isoprène (I) est à la base du concept de la "règle isoprénique" énoncée en 1953 par Ruzicka et complétée par Lynen et al (1958) et Bloch et al (1959) (**Mohammedi, 2006).** Cette règle considère le di-phosphate d'isopentényle (II), désigné sous le nom d'isoprène actif, comme le véritable précurseur de la molécule terpénique ; d'où le nom d'isoprénoïdes sous lequel on les désigne également. Les terpènoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène en une série de structures homologues : hemiterpènes C5 (1 unité isoprène), monoterpènes C10 (2 unités isoprènes), sesquiterpènes C15 (3 unités isoprènes), diterpènes C20 (4 unités isoprènes), triterpènes C30 (6 unités isoprène), tetraterpène C40 (8 unités isoprène), polyterpènes (C5) n où n peut être 9-30 (**Mohammedi, 2006).**

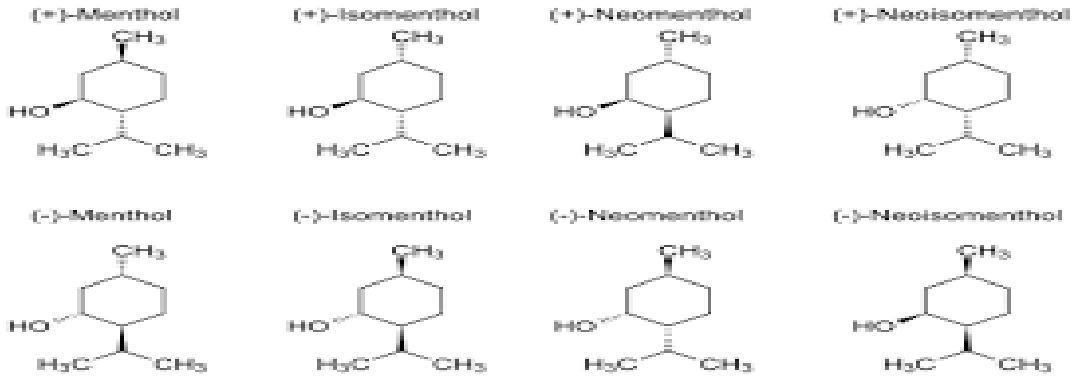



Figure02 : Structures chimiques de quelques composés d'huile essentielle

La composition chimique des plantes aromatiques est complexe, elle est constituée de deux fractions. La première fraction dite volatile (COV) est présente dans différents organes de la plante selon la famille ; cette fraction est composée de métabolites secondaires qui constituent l'huile essentielle.

La deuxième fraction dite non volatile de la plante, composés organiques non volatils (CONV), est composée essentiellement de coumarines, flavonoïdes **(Cisowski,1985),** composés acétyléniques ainsi de lactones sesquiterpéniques ,phénols ou polyphénols, jouant un rôle fondamental dans l'activité biologique de la plante **(Mohammedi, 2006**) .

### 7.1. Monoterpènes

Les carbures sont presque toujours présents. Ils peuvent être acycliques (myrcène, ocimène...), monocycliques (α et β-terpène, α-cymène) ou bicycliques (pinènes, 3-carène, camphère, sabinène…) et constituent parfois plus que de 90% d'huile essentielle, notamment

chez le citrus et la famille des térébenthines. La réactivité des cations intermédiaires justifie l'existence de nombreuses molécules fonctionnalisées (**Bruneton, 1993).**

• Alcools, des éthérés oxydes : bornéole, géraniol, citronillol, menthol et cinéole 1,8 (éther-oxyde) ou eucalyptol ;

• Phénol : thymol, cavacrol, eugénol et anéthol ;

• Aldéhydes : aldéhyde cuminique, aldéhyde cinnamique, aldéhyde aninsique et citronellal ou citral ;

• Esters : acétate de linalyle et acétate de geranyle ;

• Cétone : thuyon, carvone et monthon ;

• Aldéhydes-phénols : aldéhyde salicylique ou aldéhyde prolocatéchique ;

• Acides : acide benzoïque et acide cinnamique ;

• Lactone : ligustilide ;

• Composés sulfurés : isosulfocyanate.

### 7.2. Sesquiterpènes

La variation structurale dans cette série est de même nature que dans le cas précédent : carbures, alcools et cétones, étant les plus fréquents (**Bruneton, 1993).**

Nous trouverons ci-dessous quelques exemples des sesquiterpènes caractéristiques des huiles essentielles :

• Carbures : β- bisobolène, β-caryoohyllènes et longifolène ;

• Alcools : farnésol, carotol, patchoulol et β-santatol ;

• Cétones : nootakatone, cis-longipinane-2,7 dione et β-citocone ;

• Aldéhydes : sininasale;

• Esters : acétate de cédryle.

### 7.3. Composés odorants

Les dérivés phénylpropane (C6 et C3) sont beaucoup moins fréquents que les précédents. Ce sont très souvent des Allyles et Propyphénoles,parfois des aldéhydes caractéristiques de certaines huiles essentielles d'apiaceae tels que : anéthol, anisaldéhyde, apiol, methyl-chavicol, eugénol, myristicine et asorones cinamaldéhyde. Les huiles essentielles renferment aussi des composés odorants de type « phynilpropanoide » qui empruntent une voie biosynthétique dite shikimate, conduisant essentiellement à la synthèse de la lignine (**Bernard et al. 1988).**

## 8. Techniques d'extraction des huiles essentielles

L'analyse des huiles essentielles émises par une plante se déroule en trois étapes; extraction des composés aromatiques, analyse de l'extrait et traitement des résultats pour identifier et quantifier les composés. Les composés organiques volatils sont généralement présents dans les matrices végétales à de très faibles concentrations, et sont de polarités, solubilités, volatilités et stabilités très variables. Les molécules odorantes sont constituées d'un squelette hydrocarboné qui peut être linéaire, cyclique ou aromatique. Presque toutes les fonctions chimiques portées par ces chaînes sont représentées: alcools, composés carbonylés (Principalement les aldéhydes), esters, éthers, phénols et enfin dérivés soufrés et hétérocycles.
Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation, une méthode d'expression à froid et l'entraînement à la vapeur de l'eau: L'hydro distillation. Elles peuvent être mises en œuvre sur les systèmes discontinus ou continus, à la pression ambiante, en surpression ou en dépression **(Pollien, 1998).** D'une façon générale, les principales méthodes d'extraction sont :

### 8.1. L'entraînement à la vapeur d'eau:

Les méthodes d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont basées sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînables par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. Sous l'action de la vapeur d'eau introduite ou formée dans l'extracteur, l'essence se libère du tissu végétal et est entraînée par la vapeur d'eau. Le mélange de vapeurs est condensé sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par décantation **(Afnor, 2000).**
En fonction de sa densité, elle peut être recueillie à deux niveaux:
-niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent ;
- niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau. Les principales variantes de l'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau sont l' hydro distillation, la distillation à vapeur saturée et l'hydro diffusion **(Teuscher etal, 2005).**

### 8.2. La distillation à vapeur saturée:

Dans cette variante, la matière végétale n'est pas en contact avec l'eau. La vapeur d'eau est injectée au travers de la masse végétale disposée sur des plaques perforées.
La distillation à vapeur saturée est la méthode la plus utilisée à l'heure actuelle dans l'industrie pour l'obtention des huiles essentielles à partir de plantes aromatiques ou médicinales. En général, elle est pratiquée à la pression atmosphérique ou à son voisinage et à 100°C,

température d'ébullition de l'eau. Son avantage est que les altérations de l'huile essentielle recueillie sont minimisées (**Wichtl etAnton, 2003).**

Pour certaines productions (lavande, menthe), on utilise des alambics mobiles qui sont en fait des bennes de récolte conçues pour être intercalées par l'agriculteur lui –même, après remplissage ,dans un montage de distillation **(Bruneton,2008 ).**

**8.3**. **L'hydro diffusion:**

Elle consiste à pulvériser de la vapeur d'eau à travers la masse végétale, du haut vers le bas. Ainsi le flux de vapeur traversant la biomasse végétale est descendant contrairement aux techniques classiques de distillation dont le flux de vapeur est ascendant. L'avantage de cette technique est traduit par l'amélioration qualitative et quantitative de l'huile récoltée, l'économie de temps, de vapeur et d'énergie (**Bassereau, 2007).**

**8.4. L'hydro distillation:**

Le principe de l'hydro distillation est celui de la distillation des mélanges binaires non miscibles. Elle consiste à immerger la biomasse végétale dans un alambic rempli d'eau, que l'on porte ensuite à ébullition. La vapeur d'eau et l'essence libérée par le matériel végétal forment un mélange non miscible. Les composants d'un tel mélange se comportent comme si chacun était tout seul à la température du mélange, c'est à dire que la pression partielle de la vapeur d'un composant est égale à la pression de vapeur du corps pur. Cette méthode est simple dans son principe et ne nécessite pas un appareillage coûteux. Cependant, à cause de l'eau, de l'acidité et de la température du milieu, il peut se produire des réactions d'hydrolyse, de réarrangement, de racémisation, d'oxydation, d'isomérisation, etc. qui peuvent très sensiblement conduire à une dénaturation (**Bruneton, 1993).**

**8.5. L'expression à froid:**

L'extraction par expression à froid, est souvent utilisée pour extraire les huiles essentielles des agrumes comme le citron, l'orange, la mandarine, etc. Son principe consiste à rompre mécaniquement les poches à essences. L'huile essentielle est séparée par décantation ou centrifugation. D'autres machines rompent les poches par dépression et recueillent directement l'huile essentielle, ce qui évite les dégradations liées à l'action de l'eau **(Chaintreau et al, 2003).**

**8.6. Extraction par solvants:**

La méthode de cette extraction est basée sur le fait que les essences aromatiques sont solubles dans la plupart des solvants organiques. L'extraction se fait dans des extracteurs de

construction variée, en continu, semi-continu ou en discontinu. Le procédé consiste à épuiser le matériel végétal par un solvant à bas point d'ébullition qui par la suite, sera éliminé par distillation sous pression réduite. L'évaporation du solvant donne un mélange odorant de consistance pâteuse dont l'huile est extraite par l'alcool. L'extraction par les solvants est très coûteuse à cause du prix de l'équipement et de la grande consommation des solvants. Un autre désavantage de cette extraction par les solvants est leur manque de sélectivité de ce fait de nombreuses substances lipophiles (huiles fixes, phospholipides, caroténoïdes, cires, coumarines, etc.) peuvent se retrouver dans le mélange pâteux et imposer une purification ultérieure **(Shellie et al, 2004).**

### 8.7. Extraction par les corps gras:

La méthode d'extraction par les corps gras est utilisée en fleurage dans le traitement des parties fragiles de plantes telles que les fleurs, qui sont très sensibles à l'action de la température. Elle met à profit la liposolubilité des composants odorants des végétaux dans les corps gras. Le principe consiste à mettre les fleurs en contact d'un corps gras pour le saturer en essence végétale. Le produit obtenu est une pommade florale qui est ensuite épuisée par un solvant qu'on élimine sous pression réduite.

Dans cette technique, on peut distinguer l'enfleurage où la saturation se fait par diffusion à la température ambiante des arômes vers le corps gras et la digestion qui se pratique à chaud, par immersion des organes végétaux dans le corps gras **(Cordero et al. 2007).**

### 8.8. Extraction par micro- ondes :

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelé: Vacuum Microwave Hydro distillation (VMHD), consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats.

## 9. Toxicité des huiles essentielles

La majorité des intoxications par les plantes connues est la cause d'un surdosage car leur accumulation dans l'organisme crée des affections dégénératives et même des effets secondaires plus banales (vomissements, vertiges, syncopes)**(Valnet, 1984).** L'abus

d'essences concentrées peut aussi provoquer l'engorgement du foie et la rétention d'urine.**(Schauemberg et Paris, 2010).**

Il existe également des huiles essentielles qui peuvent provoquer des irritations cutanées lorsqu'on les utilise de façon externe (**Kothe, 2007).** Les effets toxiques se manifestent par des réactions allergiques (eczémas, abcès). Ce sont surtout les huiles essentielles et purifiées qui provoquent ces inflammations **(Schauemberg et Paris, 2010).**

Les huiles essentielles sont des médicaments et une dose qui peut entrainer des troubles très graves, par contre les baumes, les huiles de corps, les huiles de bains vendus dans le commerce, sont sans danger, si bien sûr en respectent la posologie **(Salle, 1987).**

Chapitre II

# Généralités sur les plantes étudies

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

La famille Myrtaceae - Myrtacées est une famille de plantes dicotylédones, deux cotylédons sur l'embryon, deux feuilles constitutives de la graine. Les Myrtaceae sont réparties en environ trois mille espèces réparties en 134 genres environ. Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques des zones tempérées, sub-tropicales 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. Dans cette famille, on peut citer les genres : Eucalyptus, Psidium dont fait partie le goyavier, Myrtus dont fait partie le myrte (arbuste du maquis méditerranéen), Eugenia dont le giroflier (*Eugenia cariophyllata*) qui donne le clou de girofle. On rencontre aussi des espèces dont les fruits sont comestibles (genres Feijoa, Eugenia, Campomanesia). Il existe aussi une espèce de figuier étrangleur en NouvelleZélande (*Metrosideros robusta)*( **Bruneton J., 1999).bea**ucoup d'espèces appartenant à cette famille sont une source d'HE pour la parfumerie ou pour l'usage thérapeutique. Les fleurs à odeur suave des Myrtaceae sont pollinisées par divers insectes, oiseaux ou mammifères ; le nectar sert de monnaie d'échange. Chez les genres Eucalyptus, Melaleuca et Callistemon, les étamines sont plus remarquables que les pétales, donnant à l'inflorescence un aspect de goupillon. Les espèces à fruit charnu 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 (**Bruneton J., 1999).**

## 2. Généralités sur l'Eucalyptus :

L'Eucalyptus est originaire de l'Australie, son introduction en Algérie date de 1863. La plantation massive de ces arbres ne se fera qu'à partir de 1950 **(FoudilCherif, 1991**). Grâce à leur facilité d'adaptation, les espèces *E. globulus, E. camaldulensis, E. gomphocephala,* sont les plus répandues dans la région méditerranéenne. Près de 600 espèces sont connues dans le monde **(Foudil-Cherif, 1991).**

Certains eucalyptus s'hybrident facilement entre elles étant donné la facilité avec laquelle les graines de pollen se transfèrent d'une espèce à une autre, ce qui complique encore plus leur identification **(Foudil-Cherif, 1991).**

## 3. Répartition géographique de l'Eucalyptus en Algérie :

Les eucalyptus occupaient une surface de 5 855 hectares dont plus de la moitié dans la région Oranaise **(Boudy, 1955)**. Actuellement des plantations longent le littoral d'El-Kala et d'Azzefoun. On retrouve cette espèce dans la région de la Mitidja et celle de Hadjout **(Foudil-Cherif, 1991).**

## 4. Présentation botanique et géographique du genre Eucalyptus

Les Eucalyptus sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur, originaire d'Australie, notamment de la province de Tasmanie ; l'Eucalyptus fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, l'Eucalyptus assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom d'« arbre à la fièvre » ou Australian fever tree( **Juergens, UR., Dethlefsen, U., 2003). la p**lupart des Eucalyptus ont des feuilles persistantes. Comme les autres membres de la famille des myrtaceae, les feuilles d'Eucalyptus sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre. Les feuilles, bleutées, ont une curieuse caractéristique: sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales et glauques, et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes, pétiolées, très allongées, parfois un peu courbées comme des lames de faux, et d'un vert luisant. Les fleurs forment une petite boîte s'ouvrant par un couvercle : les étamines sont enfermées dans un étui fermé par un opercule (d'où le nom d'Eucalyptus du grec eu = bien et kaluptos = couvert) formé par la fusion des pétales et/ou des sépales. Les fleurs sont très variées. Elles ont de très nombreuses étamines qui peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, rose ou rouge. Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol **( Bruneton J., 1999 ).**De nombreux Eucalyptus sont utilisés dans le monde pour produire du bois de service: poteaux, bois de mine, bois de feu, perches, bois de construction.

## 5. Propriétés thérapeutiques du genre Eucalyptus

De nombreux pays ont rapidement intégré les usages médicinaux des feuilles d'Eucalyptus dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, Île de la Réunion, Europe, etc. La production commerciale d'huile essentielle d'Eucalyptus a débuté en 1860, dans la région de Victoria en Australie. Actuellement, l'Australie, le Maroc, l'Espagne et certains pays

de l'ex-URSS sont parmi les principaux producteurs. Au XIXe siècle, on utilisait l'HE pour aseptiser les cathéters urinaux dans les hôpitaux anglais .De nos jours, elle entre dans la fabrication de rince-bouche (Listerine, par exemple) et de dentifrices ; les produits et les solvants endodontiques utilisés en dentisterie comprenant de l'huile de plusieurs plantes entre autre l'huile de clou de girofle et d'Eucalyptus ( **Goldestein, H.B., Epstein, B.J., 2000), o**n s'en sert aussi comme dégraissant industriel. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles d'Eucalyptus, de l'HE (*E. globulus*) pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme, pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (voie externe). Des essais sur des souris ont cependant permis d'observer que l'Eucalyptus exerce une activité antidouleur ( **Atta, AH., Alkofahi, A., 1998 Santos, F.A., Rao, VS., 2000) .on** pense généralement que cette activité serait attribuable aux propriétés antioxydantes de la plante .(**Grassmann, J., Hippeli, S., 2000**) ,l'HE d'Eucalyptus citronné (*E. citriodora*) est un remède traditionnel pour éloigner les insectes piqueurs . Au cours d'une étude croisée menée en Suède, un insectifuge à base d'Eucalyptus citronné (Citriodiol) a réduit de moitié les morsures de tiques (**Baudoux, D. 2001)**. Au cours d'un essai effectué en Malaisie, un produit à base d'Eucalyptus citronné a été très efficace pour prévenir les morsures de sangsues (*Haemadipsa sylvestris*) . (**Tesche, S., Metternich, F., 2008 Meister, R., Wittig, T., 1999,) la f**umée d'*Eucalyptus camaldulensis* est également employée dans les lieux de stockage des denrées comme agent de Conservation contre les insectes et les champignons. L'efficacité de cette pratique serait due à la richesse de la fumée en thymol et en cinéole (**Kamal, M., Tantaaoui, El.A., Ismaili, A.M., 1997).**

## 6. Dénomination internationale de *l'Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* :

La dénomination internationale de l'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* selon (auteur) est la suivante :

Le mot « Eucalyptus » vient du grec ; Eu « bien » et kaluptos « couvert »

**-Noms communs :**

***Eucalyptus blakelyi* =la gomme rouge**

***Eucalyptus cladocalyx* = la gomme de sucre**

**-Noms vernaculaires**:

كالتيوس : **Arabe**

**Français**: eucalyptus

**Anglais**: eucalyptus.

**Allemagne** :eukalyptus

**Espagne** :eucalipto

**Italie** : eucalypto

**Algerie** :kalytous

## 7- Classification phylogénétique de l'Eucalyptus :

***- Eucalyptus blakelyi***

La classification d'*Eucalyptus blakelyi* selon (**Metro 1970)** est la suivante :

Règne : Plantae.

Sous-Règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe :Magnoliopsida

Sous - Classe : rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtacées

Genre : Eucalyptus

Espèce : *Eucalyptus blakelyi*

***-Eucalyptus cladocalyx***

On classe *Eucalyptus cladocalyx* selon(Metro 1970) comme suit :

Règne : Plantae.

Sous-Règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe :Magnoliopsida

Sous - Classe : rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtacées

Genre : Eucalyptus

Espèce : *Eucalyptus cladocalyx*

## 8. Description botanique :

***-Eucalyptus blakelyi* :**

*E. blakelyi* pousse généralement jusqu'à 20 m de haut et dépasse rarement 50 m.

**-L'ecorce :**

Elle est lisse, blanche, grise, jaune-verte, gris-verte ou gris rosâtre, se répandant en bandes ou en flocons irréguliers. L'écorce rugueuse peut parfois occuper les premiers 1-2 m du tronc. **(Forest dieback).**

**Les feuilles** :

Les feuilles juvéniles sont pétiolées, ovales à largement lancéolées, atteignant 26 cm de long et 8 cm de large, vertes, gris-vert ou bleu-vert, légèrement décolorées.

Les feuilles adultes sont lancéolées à étroitement lancéolées, acuminées, lamines de 8-30 cm de long et de 0,7-2 cm de large, vertes ou gris-vert.

**La fleur :**

L'inflorescence est axillaire renfermant 7-11 (parfois jusqu'à 13) fleurs; les fleurs sont de couleur blanche, avec pédoncules minces, cylindriques ou quadrangulaires, de 6-15 mm de long; les pédicelles sont minces, de 5-12 mm de long; l'hypanthium est hémisphérique de 2-3 mm de long et 3-6 mm de large, l'opercule est globulaire-rostre (typique) ovoïde-conique,en forme de corne comme *E. tereticornis*, de 4-6 mm de long et 3-6 mm de large(Forest dieback).

**Le fruit :**

Les fruits sont hémisphériques ou ovoïdes, de 5-8 mm de long; renfermant des disques larges ascendants **( Forest dieback).**



Figure 03 : arbre adulte de l'*E.blakelyi*



Figure 04 : les bourgeons d'E.blakelyi



Figure 05 :l'écorce de l'*E blakelyi*




Figure 06 : les feuilles et fruits d'*E.blakely*

***-Eucalyptus cladocalyx***

Est un arbre à hauteur moyenne de 20 m, mais il peut atteindre jusqu'à 35 m. Le diamètre est environ 75cm. Typiquement, ces arbres sont classés comme étant de bonne forme **(Florabank. Retrieved , 2017).**

**La tige :**

Les tiges sont ramifiées et peuvent être claires aux deux tiers de la hauteur des arbres sur les sites les plus favorables, alors que sur les sites les plus pauvres, les tiges sont claires pour seulement un tiers à la moitié de la hauteur totale (**Florabank. Retrieved 2017).**

**L'écorce :**

Elle est lisse, l'excrétion dans les grandes taches irrégulières produisant un jaune marbré coloré à l'orange, surface gris et bleu-gris **( Florabank. Retrieved 2017).**

**Les feuilles :**

Les jeunes feuilles sont opposées pendant quelques paires, alternées, ensuite elliptiques puis orbiculaires de 5-6 x 7-9 cm, vert foncées.

Les feuilles adultes sont larges lancéolées, avec une surface supérieure vert foncée, brillante et une surface inférieure terne, plus pâle, 11-15 x 2-2,4cm.

**La fleur :**

Les inflorescences sont axillaires, renfermant 7ou plus de fleurs, ces dernières sont de couleur blanches.

**Le fruit :**

Les fruits sont sur des tiges, en forme de tonneau ou urcéolés, nervurés, 9-15 x 6-10 mm avec 3-4 valves qui sont profondément enfermés.

**La graine :**

La graine est gris-brun clair, ovoïde comprimée, souvent pointue à une extrémité, légèrement bridée et presque lisse, hémisphérique, souvent légèrement plus large que l'hypanthium (**Florabank. Retrieved 2017).**



**Figure 07 : arbre adulte de l'*E cladocalyx***



**Figure 08: les bourgeons *d'E.cladocalyx***

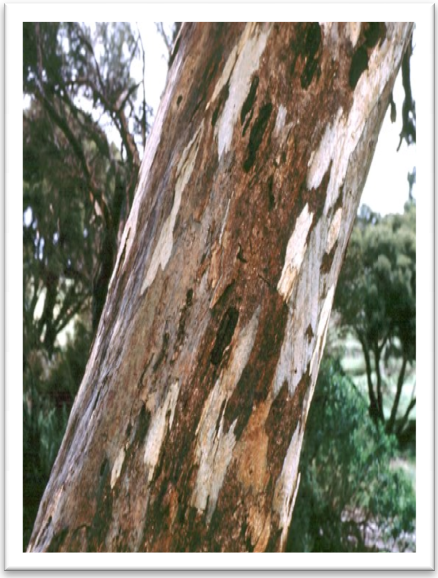


**Figure 09 : l'écorce de l'*E. cladocalyx***



**Figure 10 : le fruit d'*E.cladocalyx***

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

La famille Myrtaceae - Myrtacées est une famille de plantes dicotylédones, deux cotylédons sur l'embryon, deux feuilles constitutives de la graine. Les Myrtaceae sont réparties en environ trois mille espèces réparties en 134 genres environ. Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques des zones tempérées, sub-tropicales 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. Dans cette famille, on peut citer les genres : Eucalyptus, Psidium dont fait partie le goyavier, Myrtus dont fait partie le myrte (arbuste du maquis méditerranéen), Eugenia dont le giroflier (*Eugenia cariophyllata*) qui donne le clou de girofle. On rencontre aussi des espèces dont les fruits sont comestibles (genres Feijoa, Eugenia, Campomanesia). Il existe aussi une espèce de figuier étrangleur en NouvelleZélande (*Metrosideros robusta)*( **Bruneton J., 1999).bea**ucoup d'espèces appartenant à cette famille sont une source d'HE pour la parfumerie ou pour l'usage thérapeutique. Les fleurs à odeur suave des Myrtaceae sont pollinisées par divers insectes, oiseaux ou mammifères ; le nectar sert de monnaie d'échange. Chez les genres Eucalyptus, Melaleuca et Callistemon, les étamines sont plus remarquables que les pétales, donnant à l'inflorescence un aspect de goupillon. Les espèces à fruit charnu 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 (**Bruneton J., 1999).**

## 2. Généralités sur l'Eucalyptus :

L'Eucalyptus est originaire de l'Australie, son introduction en Algérie date de 1863. La plantation massive de ces arbres ne se fera qu'à partir de 1950 **(FoudilCherif, 1991**). Grâce à leur facilité d'adaptation, les espèces *E. globulus, E. camaldulensis, E. gomphocephala,* sont les plus répandues dans la région méditerranéenne. Près de 600 espèces sont connues dans le monde **(Foudil-Cherif, 1991).**

Certains eucalyptus s'hybrident facilement entre elles étant donné la facilité avec laquelle les graines de pollen se transfèrent d'une espèce à une autre, ce qui complique encore plus leur identification **(Foudil-Cherif, 1991).**

## 3. Répartition géographique de l'Eucalyptus en Algérie :

Les eucalyptus occupaient une surface de 5 855 hectares dont plus de la moitié dans la région Oranaise **(Boudy, 1955)**. Actuellement des plantations longent le littoral d'El-Kala et d'Azzefoun. On retrouve cette espèce dans la région de la Mitidja et celle de Hadjout **(Foudil-Cherif, 1991).**

## 4. Présentation botanique et géographique du genre Eucalyptus

Les Eucalyptus sont de grands arbres dont certaines espèces peuvent atteindre 100 mètres de hauteur, originaire d'Australie, notamment de la province de Tasmanie ; l'Eucalyptus fut rapidement planté dans les régions subtropicales de l'Asie et du bassin méditerranéen. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît, l'Eucalyptus assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom d'« arbre à la fièvre » ou Australian fever tree( **Juergens, UR., Dethlefsen, U., 2003). la p**lupart des Eucalyptus ont des feuilles persistantes. Comme les autres membres de la famille des myrtaceae, les feuilles d'Eucalyptus sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre. Les feuilles, bleutées, ont une curieuse caractéristique: sur les jeunes arbres, elles sont opposées, sessiles, ovales et glauques, et quand l'arbre grandit, elles deviennent alternes, pétiolées, très allongées, parfois un peu courbées comme des lames de faux, et d'un vert luisant. Les fleurs forment une petite boîte s'ouvrant par un couvercle : les étamines sont enfermées dans un étui fermé par un opercule (d'où le nom d'Eucalyptus du grec eu = bien et kaluptos = couvert) formé par la fusion des pétales et/ou des sépales. Les fleurs sont très variées. Elles ont de très nombreuses étamines qui peuvent être de couleur blanche, crème, jaune, rose ou rouge. Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol **( Bruneton J., 1999 ).**De nombreux Eucalyptus sont utilisés dans le monde pour produire du bois de service: poteaux, bois de mine, bois de feu, perches, bois de construction.

## 5. Propriétés thérapeutiques du genre Eucalyptus

De nombreux pays ont rapidement intégré les usages médicinaux des feuilles d'Eucalyptus dans leur pharmacopée : Chine, Inde, Sri Lanka, Afrique du Sud, Île de la Réunion, Europe, etc. La production commerciale d'huile essentielle d'Eucalyptus a débuté en 1860, dans la région de Victoria en Australie. Actuellement, l'Australie, le Maroc, l'Espagne et certains pays

de l'ex-URSS sont parmi les principaux producteurs. Au XIXe siècle, on utilisait l'HE pour aseptiser les cathéters urinaux dans les hôpitaux anglais .De nos jours, elle entre dans la fabrication de rince-bouche (Listerine, par exemple) et de dentifrices ; les produits et les solvants endodontiques utilisés en dentisterie comprenant de l'huile de plusieurs plantes entre autre l'huile de clou de girofle et d'Eucalyptus ( **Goldestein, H.B., Epstein, B.J., 2000), o**n s'en sert aussi comme dégraissant industriel. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles d'Eucalyptus, de l'HE (*E. globulus*) pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme, pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (voie externe). Des essais sur des souris ont cependant permis d'observer que l'Eucalyptus exerce une activité antidouleur ( **Atta, AH., Alkofahi, A., 1998 Santos, F.A., Rao, VS., 2000) .on** pense généralement que cette activité serait attribuable aux propriétés antioxydantes de la plante .(**Grassmann, J., Hippeli, S., 2000**) ,l'HE d'Eucalyptus citronné (*E. citriodora*) est un remède traditionnel pour éloigner les insectes piqueurs . Au cours d'une étude croisée menée en Suède, un insectifuge à base d'Eucalyptus citronné (Citriodiol) a réduit de moitié les morsures de tiques (**Baudoux, D. 2001)**. Au cours d'un essai effectué en Malaisie, un produit à base d'Eucalyptus citronné a été très efficace pour prévenir les morsures de sangsues (*Haemadipsa sylvestris*) . (**Tesche, S., Metternich, F., 2008 Meister, R., Wittig, T., 1999,) la f**umée d'*Eucalyptus camaldulensis* est également employée dans les lieux de stockage des denrées comme agent de Conservation contre les insectes et les champignons. L'efficacité de cette pratique serait due à la richesse de la fumée en thymol et en cinéole (**Kamal, M., Tantaaoui, El.A., Ismaili, A.M., 1997).**

## 6. Dénomination internationale de *l'Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* :

La dénomination internationale de l'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx* selon (auteur) est la suivante :

Le mot « Eucalyptus » vient du grec ; Eu « bien » et kaluptos « couvert »

**-Noms communs :**

***Eucalyptus blakelyi* =la gomme rouge**

***Eucalyptus cladocalyx* = la gomme de sucre**

**-Noms vernaculaires**:

كالتيوس : **Arabe**

**Français**: eucalyptus

**Anglais**: eucalyptus.

**Allemagne** :eukalyptus

**Espagne** :eucalipto

**Italie** : eucalypto

**Algerie** :kalytous

## 7- Classification phylogénétique de l'Eucalyptus :

***- Eucalyptus blakelyi***

La classification d'*Eucalyptus blakelyi* selon (**Metro 1970)** est la suivante :

Règne : Plantae.

Sous-Règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe :Magnoliopsida

Sous - Classe : rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtacées

Genre : Eucalyptus

Espèce : *Eucalyptus blakelyi*

***-Eucalyptus cladocalyx***

On classe *Eucalyptus cladocalyx* selon(Metro 1970) comme suit :

Règne : Plantae.

Sous-Règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe :Magnoliopsida

Sous - Classe : rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtacées

Genre : Eucalyptus

Espèce : *Eucalyptus cladocalyx*

## 8. Description botanique :

***-Eucalyptus blakelyi* :**

*E. blakelyi* pousse généralement jusqu'à 20 m de haut et dépasse rarement 50 m.

**-L'ecorce :**

Elle est lisse, blanche, grise, jaune-verte, gris-verte ou gris rosâtre, se répandant en bandes ou en flocons irréguliers. L'écorce rugueuse peut parfois occuper les premiers 1-2 m du tronc. **(Forest dieback).**

**Les feuilles** :

Les feuilles juvéniles sont pétiolées, ovales à largement lancéolées, atteignant 26 cm de long et 8 cm de large, vertes, gris-vert ou bleu-vert, légèrement décolorées.

Les feuilles adultes sont lancéolées à étroitement lancéolées, acuminées, lamines de 8-30 cm de long et de 0,7-2 cm de large, vertes ou gris-vert.

**La fleur :**

L'inflorescence est axillaire renfermant 7-11 (parfois jusqu'à 13) fleurs; les fleurs sont de couleur blanche, avec pédoncules minces, cylindriques ou quadrangulaires, de 6-15 mm de long; les pédicelles sont minces, de 5-12 mm de long; l'hypanthium est hémisphérique de 2-3 mm de long et 3-6 mm de large, l'opercule est globulaire-rostre (typique) ovoïde-conique,en forme de corne comme *E. tereticornis*, de 4-6 mm de long et 3-6 mm de large(Forest dieback).

**Le fruit :**

Les fruits sont hémisphériques ou ovoïdes, de 5-8 mm de long; renfermant des disques larges ascendants **( Forest dieback).**



Figure 03 : arbre adulte de l'*E.blakelyi*



Figure 04 : les bourgeons d'E.blakelyi



Figure 05 :l'écorce de l'*E blakelyi*




Figure 06 : les feuilles et fruits d'*E.blakely*

***-Eucalyptus cladocalyx***

Est un arbre à hauteur moyenne de 20 m, mais il peut atteindre jusqu'à 35 m. Le diamètre est environ 75cm. Typiquement, ces arbres sont classés comme étant de bonne forme **(Florabank. Retrieved , 2017).**

**La tige :**

Les tiges sont ramifiées et peuvent être claires aux deux tiers de la hauteur des arbres sur les sites les plus favorables, alors que sur les sites les plus pauvres, les tiges sont claires pour seulement un tiers à la moitié de la hauteur totale (**Florabank. Retrieved 2017).**

**L'écorce :**

Elle est lisse, l'excrétion dans les grandes taches irrégulières produisant un jaune marbré coloré à l'orange, surface gris et bleu-gris **( Florabank. Retrieved 2017).**

**Les feuilles :**

Les jeunes feuilles sont opposées pendant quelques paires, alternées, ensuite elliptiques puis orbiculaires de 5-6 x 7-9 cm, vert foncées.

Les feuilles adultes sont larges lancéolées, avec une surface supérieure vert foncée, brillante et une surface inférieure terne, plus pâle, 11-15 x 2-2,4cm.

**La fleur :**

Les inflorescences sont axillaires, renfermant 7ou plus de fleurs, ces dernières sont de couleur blanches.

**Le fruit :**

Les fruits sont sur des tiges, en forme de tonneau ou urcéolés, nervurés, 9-15 x 6-10 mm avec 3-4 valves qui sont profondément enfermés.

**La graine :**

La graine est gris-brun clair, ovoïde comprimée, souvent pointue à une extrémité, légèrement bridée et presque lisse, hémisphérique, souvent légèrement plus large que l'hypanthium (**Florabank. Retrieved 2017).**



**Figure 07 : arbre adulte de l'*E cladocalyx***



**Figure 08: les bourgeons *d'E.cladocalyx***

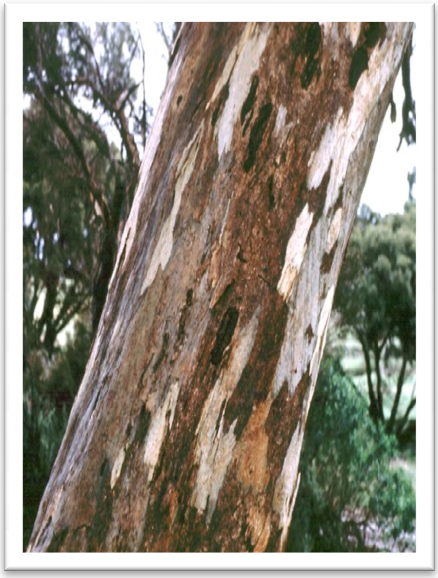


**Figure 09 : l'écorce de l'*E. cladocalyx***



**Figure 10 : le fruit d'*E.cladocalyx***

Chapitre III

# Etude biologique des huiles essentielles

# 1. Introduction

Les vertus des huiles essentielles sont connues et utilisées depuis longtemps, mais cette utilisation se basait sur des pratiques traditionnelles et des applications sans bases scientifiques précises. De nos jours, leur emploi se fait sur des bases scientifiques et rationnelles puisque de nombreux travaux de recherche ont porté sur les activités antimicrobiennes et antioxydantes des huiles essentielles des plantes aromatiques.

# 2. Activité antimicrobienne

## 2.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antimicrobienne

L'examen des données bibliographiques fait apparaître d'emblée la diversité des méthodologies utilisées pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne des huiles essentielles. Ces différentes techniques sont répertoriées et décrites dans des livres (**Ahmad *et al.,* 2006a;Baser & Buchbauer, 2010)**, des mémoires de Magister et thèses de Doctorat **(Rhayour, 2002; Benzeggouta, 2005; Pibiri, 2006; Traoré, 2006; Malecky, 2007; kechkar, 2008; Tepsorn, 2009)** ainsi que dans différentes publications **( Caldefie-Chezet *et al.,* 2003; Baydar *et al.,* 2004; Burt, 2004; Chang *et al.,* 2008a, b; Oussou *et al.,* 2008; Derwich *et al.,* 2009; Derwich *et al.,* 2010).**

Ces aperçus édités prouvent qu'il n'y a pas une seule méthode qui est employée par tous les chercheurs pour déterminer quelle est la meilleure méthode pour des analyses *in vitro.*

### 2.1.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

#### 2.1.1.1. Méthode de l'aromatogramme

En plus de l'appellation méthode de l'aromatogramme **(Abdesselam, 2006),** elle est appelée aussi technique de l'antibioaromatogramme **(Jacob, 1979),** méthode de VINCENT **(Pibiri, 2006),** méthode de diffusion dans la gélose (agar**) (Razakarivony *et al.,* 2009).** Elle est particulièrement adaptée à l'étude de l'action antibactérienne. Elle permet de déterminer lasensibilité des différentes espèces bactériennes vis à vis de l'huile essentielle donnée. Elle peut être aussi adaptée pour tester d'autres agents antimicrobiens **(Wilkinson, 2006).**

La méthode de l'aromatogramme consiste à utiliser des boites de Pétri contenant un milieu gélosé convenable **(10-25mL),** déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, papier buvard ou Wattman+ **(6-8mm)**, préalablement imprégnés de quantités connues d'HE (5-30µL), sont alors placés en surface de la gélose **(Wilkinson, 2006;**

**Traoré, 2006; kechkar, 2008).** Généralement, les micro-organismes seront classés susceptibles, intermédiaires ou résistants, selon le diamètre de la zone d'inhibition **(Wilkinson, 2006).**

Une autre technique de diffusion sans disque, elle consiste en l'aménagement d'une cavité dans la gélose. Cette cavité est ensuite remplie d'un volume donné d'huile essentielle qui va diffuser dans la gélose, et on procède, après incubation, à la mesure du diamètre d'inhibition comme dans la technique précédente **(Rhayour, 2002; Wilkinson, 2006).**

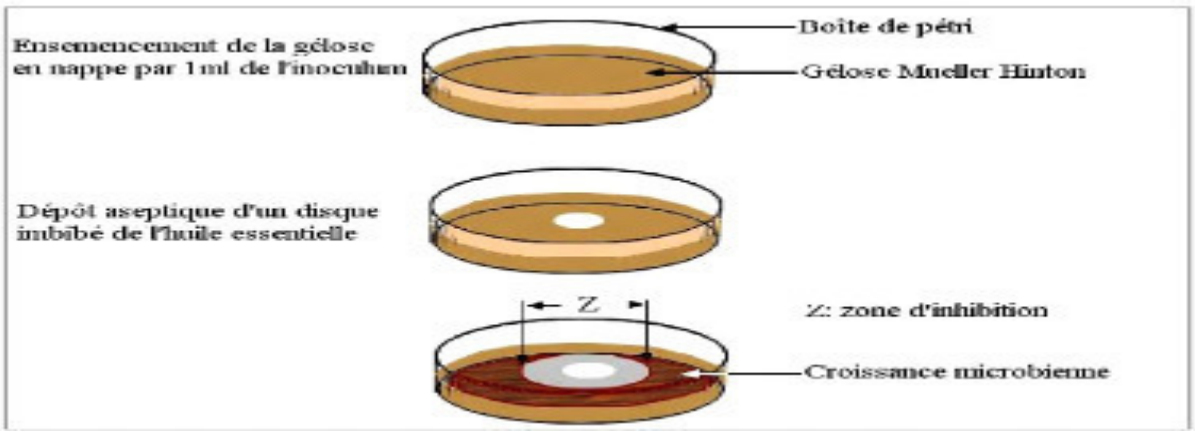



**Figure 11: Illustration de la méthode des aromatogrammes sur boîte de Petri (Wilkinson, 2006).**

### 2.1.1.2. Méthode de microatmosphères

Dans cette méthode, les disques imprégnés par l'huile essentielle sont déposés au centre du couvercle de la boîte de Pétri, renversée pendant la durée de l'expérience (couvercle en bas), cette méthode est appelée « Méthode de microatmosphères ». Le disque n'est donc plus en contact avec le milieu gélosé. Il se produit une évaporation des substances volatiles et on lit après incubation, la croissance des germes ou l'inhibition de leur croissance **(Beylier-Maurel, 1976; Inouye *et al.*, 2001; De Billerbeck *et al.*, 2002; Lahlou, 2004; Baser & Buchbauer, 2010).** Cette méthode est rarement citée car les auteurs qui se sont penchés spécifiquement sur l'activité de la phase vapeur sont encore peu nombreux.

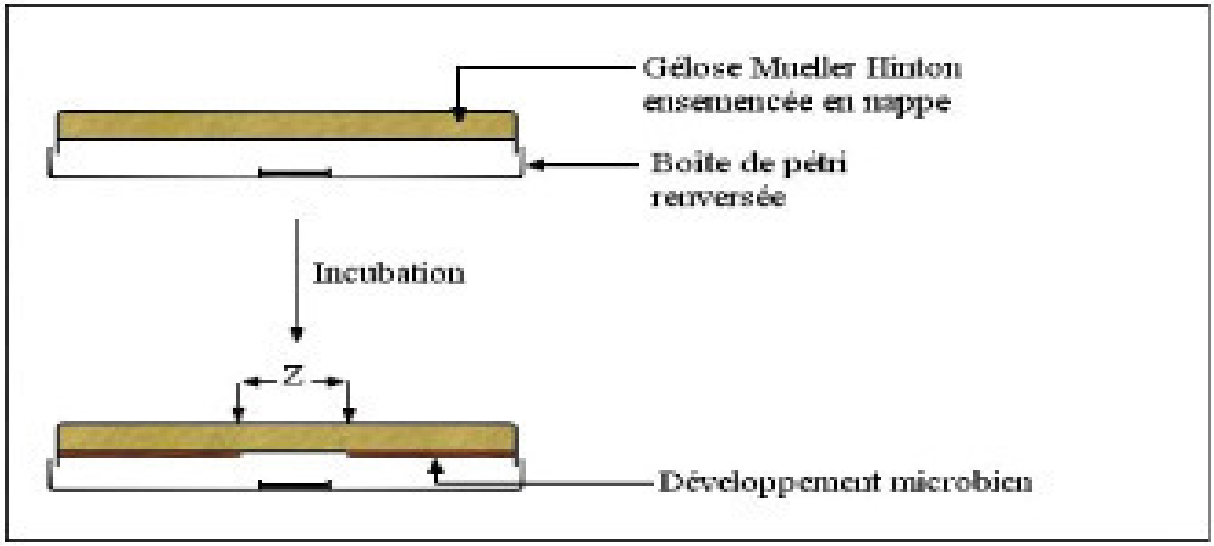



**Figure 12 : Illustration de la méthode des microatmosphères (Inouye *et al.,* 2001).**

### 2.1.1.3. Méthode de dilution

La méthode par dilution à pour but d'évaluer des concentrations minimales inhibitrice. Elle, consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme **(Oussou *et al.,* 2008; Derwich *et al.,* 2010).**

L'efficacité de l'huile essentielle testée est évaluée par la mesure de 2 concentrations : la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). Ces concentrations nous permettent de connaitre la nature de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle : bactériostatique ou bactéricide.

#### 2.1.1.3.1. Méthode de dilution d'agar

La méthode de dilution d'agar est plus économique que celle qui se pratique sur milieu liquide, parce qu'elle a beaucoup d'avantages : un grand nombre de souches peuvent être testées immédiatement, la contamination est facilement détectée et le milieu peut contenir des matériaux opaques. Elle consiste à réaliser des dilutions des huiles essentielles, et les incorporer dans le milieu gélosé fondu et refroidi à 45°C, et à tester sur ce milieu les souches bactériennes à étudier **(Benzeggouta, 2005; Wilkinson, 2006; Traoré, 2006; Tepsorn, 2009)**. Ces dernières sont ensemencées à la surface, soit en stries avec une anse calibrée **(Benzeggouta, 2005**), soit en point avec des micropipettes **(De Billerbeck *et al.,* 2002; Mayachiew & Devahastin, 2008).**

Cette méthode est utilisée comme un indicateur de l'activité antibactérienne, en plus de la recherche de la valeur réelle lorsque c'est possible. Dans la littérature, les études publiées sur la méthode de dilution d'agar pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits de plante

aromatiques ou de leurs huiles essentielles ont employé différents dissolvants pour incorporer les extraits dans le milieu **(Gachkar *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008).**

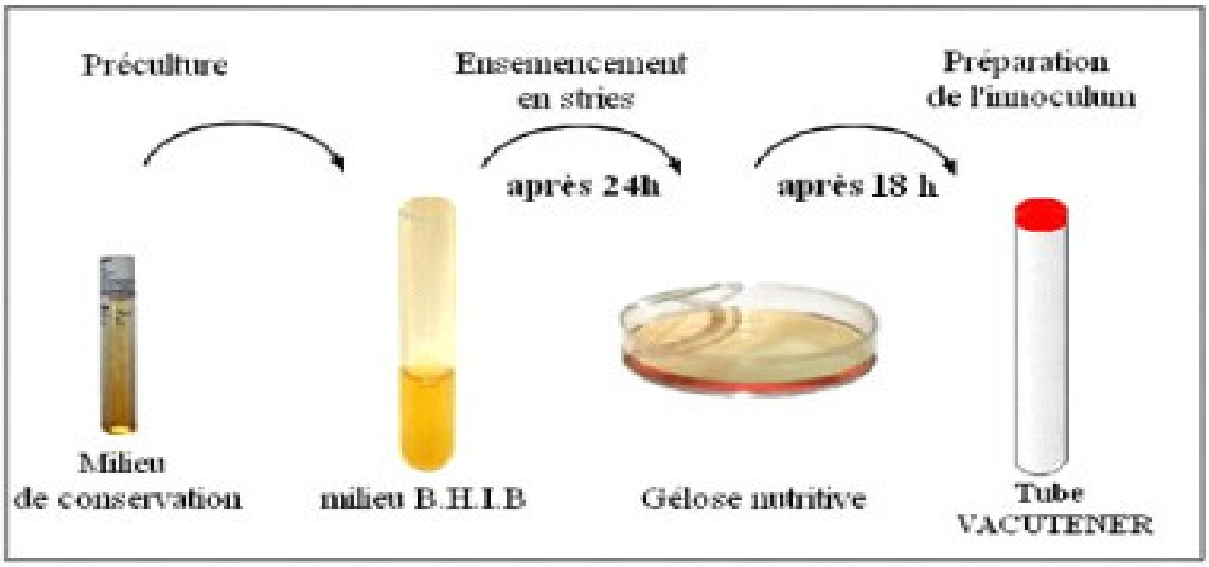



**Figure 13 : Illustration de la méthode de dilution d'agar(Benzeggouta, 2005**).

**2.1.1.3.2. Méthode de dilution de bouillon**

La méthode de dilution en bouillon est utilisée aussi pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices. Une gamme de dilution de l'huile essentielle est additionnée à une série

de tubes contenant un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions, la concentration minimale inhibitrice est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble n'est observé dans le milieu **(kechkar**, **2008).**

Des méthodes de micro-bouillon ont été également développées, utilisant des microplaques et de ce fait réduisant le volume de l'extrait requis **(Del-Vechio-Vieira *et al.*, 2009).**

Une mesure de turbidité ou une utilisation d'un indicateur de viabilité des microorganismes permettent la détermination des concentrations minimales inhibitrices « resazurine, methylthiazoldiphenyltetrazolium (MTT) » **(Kamatou *et al.*, 2006; Caplin *et al.*, 2009; Imelouane *et al.*, 2009, 2010; Hussain *et al.*, 2010)**. Les méthodes de microplaques nécessitent moins de temps et de moyens que d'autres méthodes (**Wilkinson, 2006**).

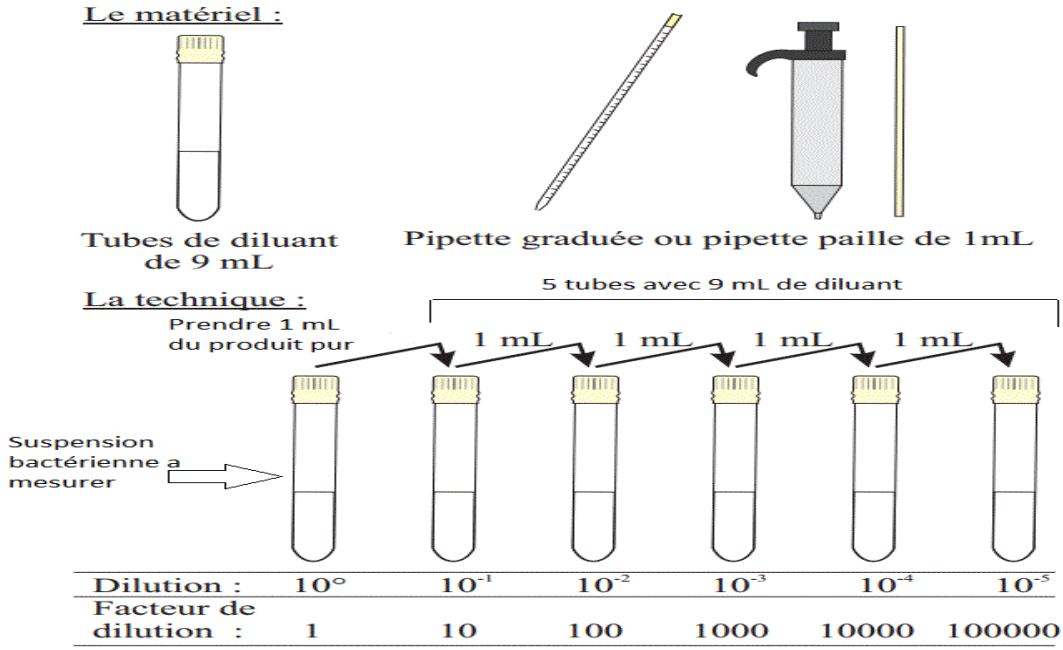



**Figure 14 : Illustration de la méthode de dilution bouillon(kechkar, 2008).**

### 2.1.2. Évaluation de l'activité antifongique

En général, les méthodes d'évaluation de l'activité antifongique sont rapides, moins coûteuses et facile à réaliser. L'activité contre les mycètes filamenteux peut être évaluée par la méthode de diffusion et de la dilution avec les mêmes inconvénients et avantages pour les analyses antibactériennes **(Wilkinson, 2006).** L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielles peut être effectuée par la méthode de microatmosphères **(De Billerbeck *et al.*, 2002; Mohammedi & Fouzia, 2007; Mohammedi *et al.*, 2010; Bajpai & Kang, 2010).**

Dans la méthode de dilution d'agar, l'huile essentielle à tester est incorporée à l'agar et alors un disque mycélien activement grandissant est placé au centre de la boite de Pétri. La croissance radiale du mycète après un temps approprié, selon les caractéristiques de croissance du mycète, est alors mesurée et comparée aux échantillons témoins **(Wilkinson, 2006).**

Alternativement une suspension fongique de cellules peut être inoculée sur le milieu de culture et les concentrations minimales sont déterminées **(Ponce *et al.*, 2003; Klaric *et al.*, 2006; Derwich *et al.*, 2010; Zarrin *et al.* 2010).**

## 3. Facteurs influençant l'activité antimicrobienne des huiles essentielles

Les résultats concordants des différentes études permettent de conclure à l'existence d'une activité antibactérienne et antifongique *in vitro* des huiles essentielles. Cette activité, qui

entraîne l'inhibition de la croissance, voire la destruction des cellules microbiennes, a été relativement bien étudiée par de nombreuses publications et les auteurs s'accordent sur les résultats obtenus. Enrevanche, ces résultats obtenus, que se soit au niveau antibactérien ou antifongique, dépendent de plusieurs facteurs. L'activité biologique d'une huile essentielle ne serait pas la même, ce qui rend l'évaluation des activités biologiques difficiles.

### 3.1. Dispersion et solubilité des huiles essentielles

Généralement, les huiles essentielles sont médiocrement solubles dans l'eau, et ceci pose beaucoup de problèmes pour étudier leurs propriétés biologiques. Ceci a été confirmé par **Griffin (2000) et Southwell *et al.* (1993)** qui ont démontré que beaucoup de terpénoïdes, ayant une solubilité médiocre dans l'eau, n'ont pas répandu dans les milieux aqueux et par conséquentles huiles essentielles riches en ces terpénoïdes ont donné des résultats « faux » dans cesn analyses. Afin de surmonter ces problèmes, beaucoup d'auteurs ont recommandé l'utilisation de divers dissolvants dans la dilution d'huiles essentielles telles que l'hexane (**Del-Vechio-Vieir *et al.,* 2009**), l'acétone, l'alcool, l'éthylène-glycol, l'éther isobutylique (**Su *et al.,* 2006)**, l'éthanol **(Chang *et al.,* 2008a, b),** le méthanol **(Armando & Rahma, 2009)** et le DMSO (**Ahmed & Abdelgaleil, 2005)** et l'emploi d'un émulsifiant comme le Tween 20 ou le Tween 80 dans des pourcentages différents (**Fu *et al.,* 2007; Caplin *et al.,* 2009).**

### 3.2. Effet du dissolvant et émulsifiant

Les dissolvants les plus utilisés dans le laboratoire sont toxiques aux microorganismes et par conséquent influencent les activités biologiques étudiées **(Hammer *et al.,* 2003)**. D'autre part les interactions entre les agents émulsifiants et le constituant des huiles essentielles représentent un facteur important pour la mesure de leur activité antimicrobienne car les agents utilisés pour la solubilisation et la dispersion des huiles essentielles dans le milieu de culture bactérien peuvent diminuer l'activité antimicrobienne. C'est le cas pour le Tween-80, solvant qui neutralise les groupes fonctionnels phénoliques et réduit leur activité antimicrobienne (**Inouye *et al.,* 2000; Malecky, 2007).** Le choix de dissolvant adéquate (ou du détergent) est indispensable avant d'envisager un essai biologique d'une huile essentielle.
D'autres auteurs ont proposé l'utilisation de 0.2% de l'agar (**Remmal *et al.,* 1993a; Satrani *et al.,* 2007)**. Dans ce cas, la CMI et la CMB trouvées pour différentes espèces bactériennes en présence de l'agar étaient sensiblement inférieures à ceux observées en présence du Tween 80 ou de l'éthanol.

## 4. Activité antioxydante

### 4.1. Méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante

Les méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des huiles essentielles sont relativement peu nombreuses et font intervenir en général la coloration ou la décoloration d'un réactif spécifique en présence d'agent antioxydant (huile essentielle). 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, de la chélation des métaux et de blanchiment du *β*-carotène dans l'acide linoléique.

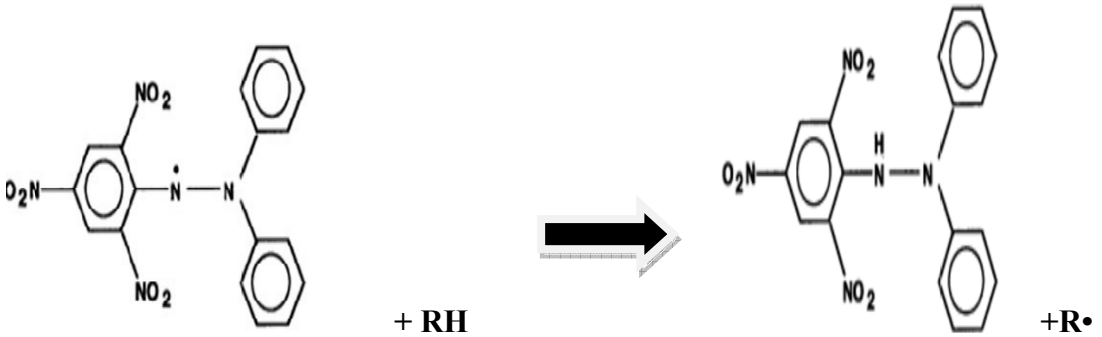
La mesure de l'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique est une méthode efficace pour l'évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles. Cette activité est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la peroxydation d'acide linoléique (**Hussain *et al.* 2008).** Cette méthode est utilisée par beaucoup des auteurs pour évaluer le potentiel antioxydant des huiles essentielles **(Iqbal *et al*. 2005; Yassa *et al.,* 2009; Hussain *et al.* 2008, 2010; Dongmo *et al.,* 2010).**

La méthode de chélation des métaux est employée pour déterminer la puissance de réduction des huiles essentielles où les réductants (huiles essentielles) ramènent le complexe de Fe3+/ferricyanide [FeCl3/K3Fe (NC)6] à la forme (Fe2+) ferreuse (**Oyaizu, 1986; Wang *et al.,* 2010).** Par conséquent, selon la puissance de réduction des huiles essentielles, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert ou en bleu **(Nikhat *et al.,* 2009).** Cette méthode a été utilisée par beaucoup d'auteurs pour déterminer la puissance de réduction des huiles essentielles (**Oyaizu, 1986; Faria *et al.,* 2006; Wangcharoen & Morasuk, 2007; Chairgulprasert *et al.,* 2008; Chua *et al.,* 2008; Nikhat *et al.,* 2009; Aiyegoro & Okoh, 2010; Wang *et al.,* 2010; Loganathan *et al.,* 2010; Ho *et al.,* 2010).**

Le blanchiment du *β*-carotène dans l'acide linoléique et de la réduction de DPPH• sont des méthodes efficaces, simples, reproductibles et rapides pour évaluer les propriétés antioxydantes des huiles essentielles **(Mayachiew & Devahastin, 2008; Hussain, 2009).** L'analyse de balayage de DPPH• est la fréquemment utilisée pour la détermination de l'activité antioxydante des huiles essentielles **(Cuendet *et al.,* 1997; Kirby & Schmidt, 1997; Burits et Bucar, 2000; Burits *et al.,* 2001; Gramza *et al.,* 2005; Gachkar *et al.,* 2006; Simionatto *et al.,*2007; Shin & Baek, 2007; Ho *et al.,* 2008; Yen & Chang, 2008; Hussain *et al.,* 2008; Chairgulprasert *et al.,* 2008; Ho *et al.,* 2009; Nikhat *et al.,* 2009; Fayed, 2009; Dongmo *et al.,* 2010; Džamić *et al.,* 2010; Hussain *et al.,*2010; Ho *et al.,* 2010; Imelouane *et al.,* 2010)**. Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH•) est un radical organique stable,

coloré et centré sur l'azote **(Blois, 1958)**. Le maximum de son absorption se situe vers 515 nm dans le méthanol et l'éthanol (**Portes, 2008).** Les antioxydants donneurs d'atome H (RH) sont capables de réduire DPPH•, ce qui conduit au 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH-H) et au radical R•.

Le DPPH• a une couleur violette ou rouge pourpre mais cette couleur disparaît lorsqu'il est réduit par un capteur de radicaux (figure x) (**Hubert, 2006; Prakash, 2001).**




**DPPH• (radical libre)** **DPPH (non radical)**

**RH** : antioxydant **; R•** : radical libre

**Figure 15 :** Réaction **du DPPH• avec un antioxydant (Prakash, 2001; Molyneux, 2004).**

Le rapport DPPH•/antioxydant doit être adapté à la stoechiométrie du composé (nombre de radicaux réduits par molécule d'antioxydant) et le DPPH• doit être en excès. Ce test, largement utilisé, est rapide et facile à réaliser ; il permet de comparer un grand nombre de composés ou un seul composé à plusieurs dilutions. De plus, contrairement aux autres tests, les conditions utilisées (solvants organiques et faible température) évitent l'autooxydation des molécules testées (Portes, 2008). Le test du DPPH• permet aussi de déterminer un paramètre cinétique : la constante de vitesse du premier transfert d'atome H, et un paramètre statique : la stoechiométrie. Ces paramètres définissent l'activité antioxydante intrinsèque des molécules testées (**Goupy *et al*., 2003; Roche *et al*., 2005).**

Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de réduction de DPPH•, pour une concentration en extrait donné et un temps donné. Le test de réduction du DPPH• permet aussi de calculer la CE50 (**Dongmo *et al.,* 2010**). La valeur CE50 est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la réduction de 50% du DPPH• (**Simionatto *et al.,* 2007).**

Ce test peut se faire sur Chromatographie sur couche mince ; les extraits à tester sont déposés sur des CCM de gel de silice GF254 en aluminium et développés dans des systèmes appropriés. Après le séchage, les CCM sont giclées avec une solution méthanolique à 2mg/ml de DPPH•. Les activités antiradicalaires apparaissent sous forme de spots de couleur jaune blanc sur fond violet **(Calvin, 2001; Braca *et al.* 2002; Raza *et al.,* 2009; Dramane *et al.,* 2010)**. Ce test a été utilisé par beaucoup d'auteurs pour évaluer le potentiel antioxydant d'huiles essentielles **(Simionatto *et al.,* 2007; Salazar-Aranda *et al.,* 2009; Paramapojn & Gritsanapan, 2009; Ho *et al.,* 2009, 2010).**

Cependant, le test de réduction au DPPH• peut poser des difficultés d'interprétation lorsque les composés testés possèdent une bande d'absorption dans le visible vers 515 nm, interférant avec celle du DPPH•. Le test avec l'ABTS+• est alors recommandé car on peut interpréter les résultats sur la bande à 734 ou 815 nm **(Schlesier *et al*., 2002)**, n'interférant plus avec celle du composé testé, tandis que le DPPH• ne possède pas d'autres bandes d'absorption à plus grande longueur d'onde. De plus, ce radical est instable à la lumière et son absorbance à 515 nm décroît sans l'intervention d'un quelconque antioxydant ; c'est pourquoi les tests réalisés avec le DPPH• doivent impérativement se faire à l'obscurité **(Portes, 2008).**

# Matériel et méthodes

## 1.-Matériel biologique

### 1. 1. Matériel végétal

#### 1.1.1. La récolte et séchage

Dans cette étude Nous avons utilisé les feuilles d'*Eucalyptus blakelyi et cladocalyx* pour extraire leurs huiles essentielles, et les testées sur quelques bactéries pathogènes et champignons.

La récole des feuilles a été effectue au cours de la floraison à l'**INRF** (Institue Nationale de la Recherche Forestière) Bainem située à 12 kilomètres à l'oust de la wilaya d'Alger en Algérie. Les feuilles adultes de deux plantes ont été récoltées dans la période allant de juin à juillet 2016.Les deux plantes sont séchées à l'ombre et à l'abri d'humidité dans un endroit sec et aéré pendant 2 semaines les feuilles sont ensuite l'aminées sans broyer pour servir à l'extraction des huiles essentielles. L'identification des plantes est basée sur l'aspect morphologique des feuilles (forme) et de la tige,...etc. En comparaison avec des ouvrages et des travaux; tels que **Benabid (2000) et (Soto et al.2006).**

### 1.1.2. Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) ont été extraites par distillation en utilisant un appareillage de type Clevenger **(Benchekroun et al. 2012).** L'extraction à duré 2 à 3 heures pour un mélange de 200 g de matériel végétal sécher et broyer « des feuilles *d'Eucalypltus blakelyi et cladocalyx* » avec 500 ml d'eau distillée, l'ensemble et ensuite porté a ébullition dans un ballon reliée avec une colonne de 60 cm de longueur reliée à un réfrigérant. Les vapeurs chargées d'huile et qui traversent le réfrigérant, se condensent et chutent dans une ampoule à décanter. L'eau et l'huile se séparent par différence densité (**Benchekroun et al., 2012 ; Mohammedi, 2006).** L'huile essentielle recueillie par décantation à la fin de la distillation a été filtrée en présence de sulfate de sodium (Na 2 SO 4) pour éliminer les traces d'eau résiduelles et les huiles essentielles d*'Eucalyptus blakelyi.L et cladocalyx.L* seront par la suite récupérées et stocker à 4° C à l'obscurité. La quantité d'essence obtenue est pesée pour le calcul du rendement **(Bouguerra, 2012; mawussi, 2008).**

### 1.1.3. Rendement des huiles essentielles

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poid de la matière sèche de la plante, il est exprimé en pourcentage est calculé par la formule suivante:

$$\mathbf{R = P\,B / P\,A \times 100 \quad ou \quad R = [\Sigma P\,B / \Sigma P\,A] \times 100}$$

**R**: Rendement en huile en %

**P A** : Poids de la matière sèche de la plante en g

**P B** : Poids de l'huile en g

## 2. Evaluation de l'activité antibactérienne

### 2.1. Origine et choix des souches

Les souches bactériennes choisies pour cette étude sont des bactéries hautement pathogènes .il s'agit de : *Escherichia coli (ATCC25922) Staphylococcus aureus (ATCC29213) ; Bacillus subtilis (ATCC26231) ;Listéria innocua(clip74915*) et *E.faecalis (ATCC29212*) Toutes ces souches sont aimablement fournies par le laboratoire de recherche de l'université de Boumerdes et 4 souches cliniques isolées des patients a partir des prélèvement urinaires (au niveau de l'EPSP du pole urbain à Médéa): *Escherichia coli ;Staphylococcus aureus, Kleibsilla oxycota ; Pseudomonas aeruginosa,* et, deux souche fongiques ; *Candida albicans* (ATCC10231)fournies par le laboratoire de recherche d'université hassiba ben boueli à chlef et *Rhizopus sp* isolée de pain.

### 2.2. Confirmation des souches

#### 2.2.1. Etude des caractères morphologiques

**a-Examen microscopique à l'état frais**

Pour vérifier la mobilité et la forme, une lame additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope à grossissement 100 .

**b- Examen microscopique après coloration de Gram**

L'examen microscopique est révélé par la coloration de Gram. Celle-ci permet de Faire la différentiation entre les bactéries Gram positives et Gram négatives et renseigne sur la forme et la disposition des bactéries. La coloration de Gram a été réalisée selon le protocole décrit par **Delarras (2007)**.

#### 2.2.2. Etude des caractères biochimiques

**a-Recherche de la catalase**

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} 2\ H_2O + O_2$$

La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de

verre sur laquelle on ajoute une goutte de H2O2 à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz **(Zinedine, 2004).**

**b-Identification par galerie api 20 E**

La galerie API 20E compote 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratées. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanées ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du tableau d'identification.

**Technique :**

Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide, ensuite Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation.
- Préparation de l'inoculum : Faire une suspension bactérienne, dans une ampoule de Suspension Medium ou dans un tube d'eau distillée stérile, d'opacité légère avec une seule colonie prélevée sur un milieu gélosé.

Inoculation de la galerie :

- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactrienne.
- Remplir uniquement les tubes des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H2S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- Refermer la boite d'incubation et la placer à 35-37°C pendant 18 à 24 heures.

Lecture : Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au Tableau de Lecture **(Annexe 2).**

**3. Les milieux de culture utilisés**

Pour obtenir une culture jeune des bactéries afin de mettre en évidence l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'eucalyptus, plusieurs milieux de culture ont été utilisés comme :

-La gélose nutritive pour l'isolement et l'entretien des souches bactériennes.

-le milieu Chapman pour isoler les *Staphylococcus aureus*; Héktoène pour les *Entérococcus.*

-Le milieu de culture utilisé pour étudier l'activité antibactérienne est l'Agar de Muller Hinton (AMH) parce que c'est le milieu le plus employé pour les tests de sensibilité aux agents antibactériens (**Gachkar et al, 2007; Mayachiew & Devahastin, 2008; Hussain et al, 2010).**

-le milieu PDA pour isoler les champignons.

## 4. Préparation des suspensions bactériennes

Les bactéries à tester sont ensemencées sur des boites de Pétri contenant la gélose nutritive (GN) ou autres milieux selon les souches et incubées pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune des bactéries et des colonies isolées. A partir de ces boites, à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont prélevées et mises dans 5ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique lue à 625 nm est justifiée à 0.08 à 0.10 nm. On admet que cette densité mesurée à 625 nm est équivalente à 108 CFU/ml **(Mohammedi, 2006).** L'inoculum est ajusté soit en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'ensemencement doit se faire en moins de 15 min après la préparation de l'inoculum.



**Figure 16 : préparation des suspensions bactériennes**

## 5. Test de l'activité antibactérienne :

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'eucalyptus est réalisée d'abord par la méthode de diffusion des disques, en raison de sa simplicité et son efficacité pour tester la sensibilité des bactéries.

## Méthode de diffusion ou des aromatogrammes

La méthode des aromatogrammes est la technique choisie pour déterminer l'activité antibactérienne de l'huile essentielle à tester. Cette méthode repose sur le pouvoir migratoire des huiles essentielles sur un milieu solide à l'intérieur d'une boîte de Pétri. Cette méthode nous a permet de mettre en évidence l'effet antibactérien de l'huile essentielle *E.cladocalyx et E.blakelyi* sur les bactéries, ainsi que la détermination de la résistance ou la sensibilité de ces bactéries vis-à-vis de cette huile essentielle. La méthode de diffusion des disques appliqués est celle décrite par **Mayachiew & Devahastin (2008); Gachkar et al. (2007) et Hussain et al. (2010).**

## Ensemencement

Vingt millilitres (20ml) de l'agar de Muller Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100µl de la suspension bactérienne à tester (108 UFC.ml-1) sont étalés en surface.

## Préparation des dilutions de l'huile essentielle

Pour pouvoir obtenir différentes concentrations de l'huile essentielle des feuilles d'Eucalyptus, nous l'avons diluée dans le DMSO (diméthylsulfoxide). Ce choix a été fait, parce que, le DMSO est le solvant préférable pour la majorité des auteurs, notamment**, Gachkar et al. (2007)** qui ont prouvé que le DMSO n'a aucun pouvoir antibactérien puissant.
8 mg de chaque huiles a été mis dans un tube stériles contenant 1 ml du DMSO, puis une agitation à l'aide du vortex a été faite pour obtenir un mélange homogène.

Une série de dilution en demi a été faite dans 4 tubes contenant 1ml de DMSO à l'aide d'une micropipette à partir de la solution mère jusqu'à 1/8, un 5eme tube coulé par le DMSO uniquement est considéré comme témoin négatif.

**Dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques stérile (6disques/boite) sont déposés sur l'agar, précédemment inoculé avec le microorganisme choisi, puis les imbibés par 5µL d'huile essentielle des deux espèces d'eucalyptus. Les boites sont maintenues 30 min sur la paillasse pour que l'huile essentielle puisse diffuser **(Rož man & Jeršek, 2009).**

-La gentamycine (25µg/disque) a été utilisée comme contrôle positif, ce choix est dû à la sensibilité des souches choisies pour cet antibiotique.

-DMSO a été utilisée comme un témoin négatif.

**Incubation**

-Les boites ont été incubées à l'étuve à 37ºC pendant 24 h.

**Expression des résultats**

A la sortie de l'étuve, l'absence de la croissance microbienne se traduit par un halo translucide autour du disque, identique à la gélose stérile, dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6mm). Dans la littérature relative aux huiles essentielles, les résultats de l'aromatogramme sont exprimés exclusivement à partir de la mesure du diamètre des halos d'inhibitions en mm (**Baser & Buchbauer, 2010**). D'après **Ponce et al. (2003),** la sensibilité à l'huile a été classée par le diamètre des halos d'inhibition : non sensible (-) pour les diamètres moins de 8mm ; sensible (+) pour des diamètres de 8 à 14mm ; très sensible (++) pour des diamètres de 15 à 19mm et extrêmement sensible (+++) pour les diamètres plus de 20mm. Les bactéries montrant une sensibilité à l'huile essentielle sont sélectionnées pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) **(Derwich et al. 2010)**

## 6. Evaluation de l'activité antifongique

L'essai antifongique de l'huile essentielle d'eucalyptus a été réalisé par la méthode de diffusion des disques pour tester la sensibilité des souches fongiques.

**Criblage de l'activité antifongique**

Pour mettre en évidence l'activité antifongique de l'huile essentielle d'eucalyptus, nous avons utilisé la méthode de diffusion comme rapportée par **Rasooli et al. (2008).**

**Ensemencement**

Vingt millilitres (20ml) du milieu PDA sont coulés dans des boîtes de Pétri. Après solidification du milieu de culture, 100µl de la suspension fongique ont été étalés en surface.

**Dépôt des disques**

Dans des conditions aseptiques et à l'aide d'une pince stérile, des disques (6isque/boite) ont été déposés sur l'agar, qui a été précédemment inoculé avec les souches fongiques à tester, puis ces disques sont imbibés par 5µL de l'huile essentielle des deux espèces d'eucalyptus. Pour que l'huile essentielle puisse diffuser, les boites ont été maintenues 30 min sur la paillasse. Ensuite, elles ont été incubées à l'étuve à 30ºC pendant 2 à 7 jour

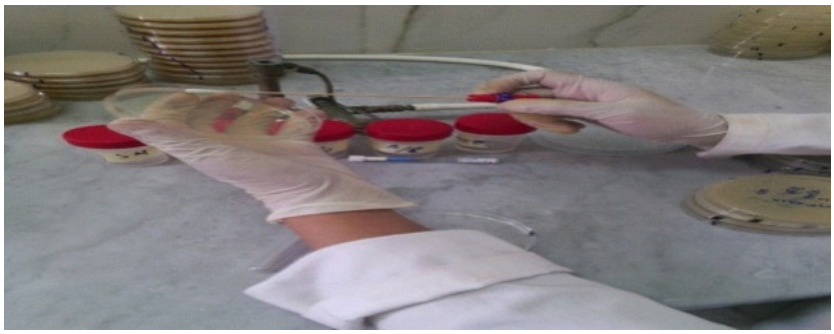


**Figure 17: ensemencement des suspensions fongiques**

**Sur milieu PDA**

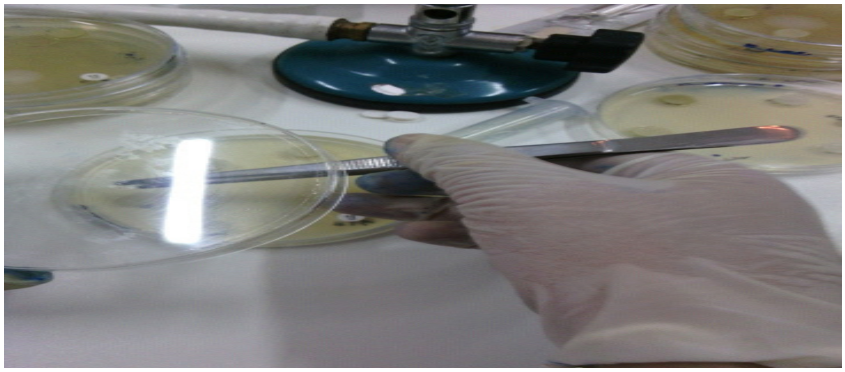


**Figure 18: Dépôt des disques imprégné d'huile essentielle**

**Contrôle positif**

kétoconazole A été utilisé comme un témoin positif

**Expression des résultats**

L'absence de la croissance mycélienne se traduit par un halo translucide autour du disque dont le diamètre est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse (y compris le diamètre de disque de 6mm). Les résultats sont exprimés en mm **(Rasooli et al, 2008).**

## 7. Concentration minimale inhibitrice

Les tests de sensibilité bactérienne les plus répandus ont pour but d'étudier l'effet bactériostatique ou bactéricide des antibiotiques **(Chengappa et al ., 1990; Eberlin et al., 1994;Jorgensen et al., 1999).** Pour chaque souche bactérienne, on peut définir une concentration minimale inhibitrice (CMI) qui correspond à la concentration minimale qui inhibe la croissance visible du germe. Elle est donc associée à un phénomène macroscopique, ce qui explique sa relative facilité d'obtention et son universalité.

## Protocole

Méthode par diffusion en milieu solide. Ce test consiste en l'application de disques imprégnés d'huile essentielle sur une gélose Préalablement ensemencée par des bactéries. L'huile essentielle va diffuser dans la gélose avec une concentration décroissante vers la périphérie. Dans la zone où la concentration est inhibitrice, on n'observera pas de croissance bactérienne **(cavenaghi, 1992).**

## 8. Evaluation de l'activité antioxydante

**Méthode de réduction du DPPH•**

Principe Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH•) est un radical organique stable de couleur rouge pourpre. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance **(Gachkar et al. 2007).**

**Protocole**

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des deux espèces *d'eucalyptus* a été mesurée par la méthode décrite par **Archana et al. (2005) et Dung et al. (2008).**

Cent microlitres (100µl) de différentes dilutions d'huiles essentielles ont été mélangés avec 2.9ml de la solution d'éthanol de DPPH• de 0.004% (p/v) dans des tubes à essai secs. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm. Le contrôle négatif est composé de 100µl d'éthanol et de 2.9ml de la solution de DPPH•. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'absorbance de l'acide ascorbique est mesurée dans les mêmes conditions que celle de l'huile essentielle

**Préparation des dilutions de la vitamine C**

Les dilutions de la vitamine C (M. 176.13 ; 99,7%) ont été préparées selon **Nikhat et al. (2009)** :

- Peser 16mg de la vitamine C par une balance analytique (précision de 0.0001g).
- Introduire ces 1mg dans un tube à essai contenant 10ml d'éthanol (solution A) (1600µg/ml).
- Introduire 0,1ml de la solution (A) dans un tube contenant 9,9ml d'éthanol (16µg/ml) (solution B).
- Introduire ensuite 5ml de la solution (B) dans un tube contenant 5 ml d'éthanol (8µg/ml).
- Procéder de la même manière pour obtenir 4, 2, 1 et 0,5µg/ml (**figure19).**

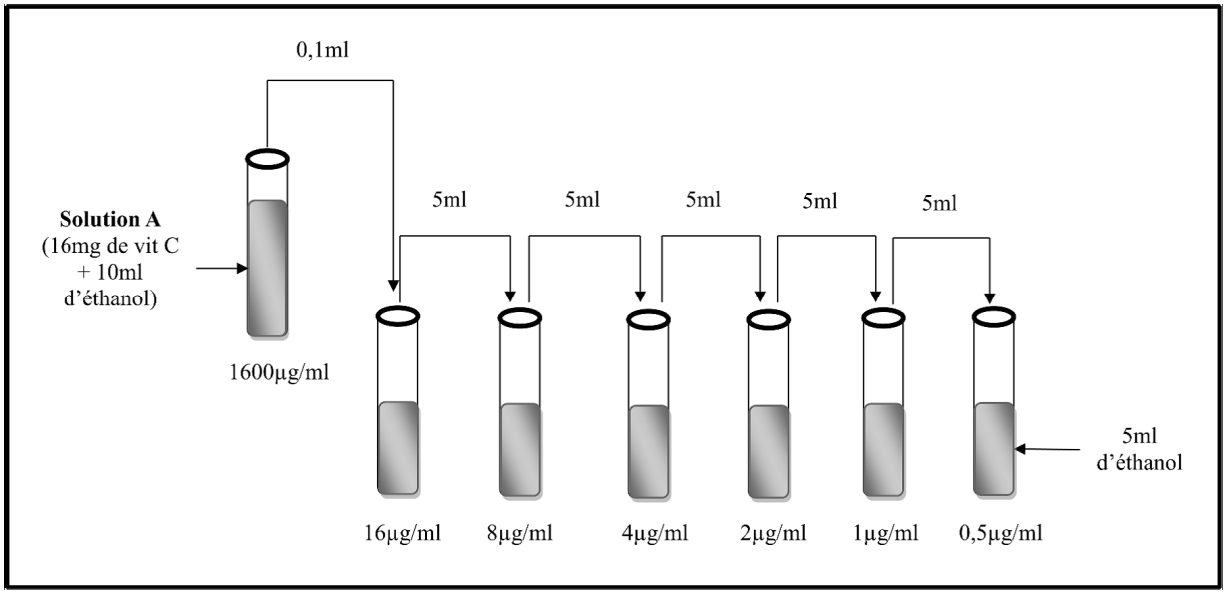



**Figure19 :** Préparation des dilutions de la vitamine C.

**Préparation des dilutions de l'huile essentielle d'eucalyptus**

En se basant sur des essais préalables, une gamme de dilutions de concentrations allant de 100µg/ml à 1000µg/ml a été préparée comme suite :

- Peser 100mg de l'huile essentielle d'*E.blakelyi* et *E.cladocalyx* par une balance analytique (précision de 0.0001g) ;
- Introduire ces 100mg dans un tube à essai contenant 10 ml d'éthanol (solution A) (10 000µg/ml) ;
- Introduire ensuite 1 ml de la solution (A) dans un tube contenant 9ml d'éthanol (solution B) (1 000µg/ml) ;
- Introduire 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, et 0.1ml de la solution (B) dans des tubes contenant 9.2, 9.4, 9.6, 9.8 et 9.9ml d'éthanol, respectivement pour avoir les concentrations 800, 600, 400, 200 et 100µg.ml-1 **(figure 20)**

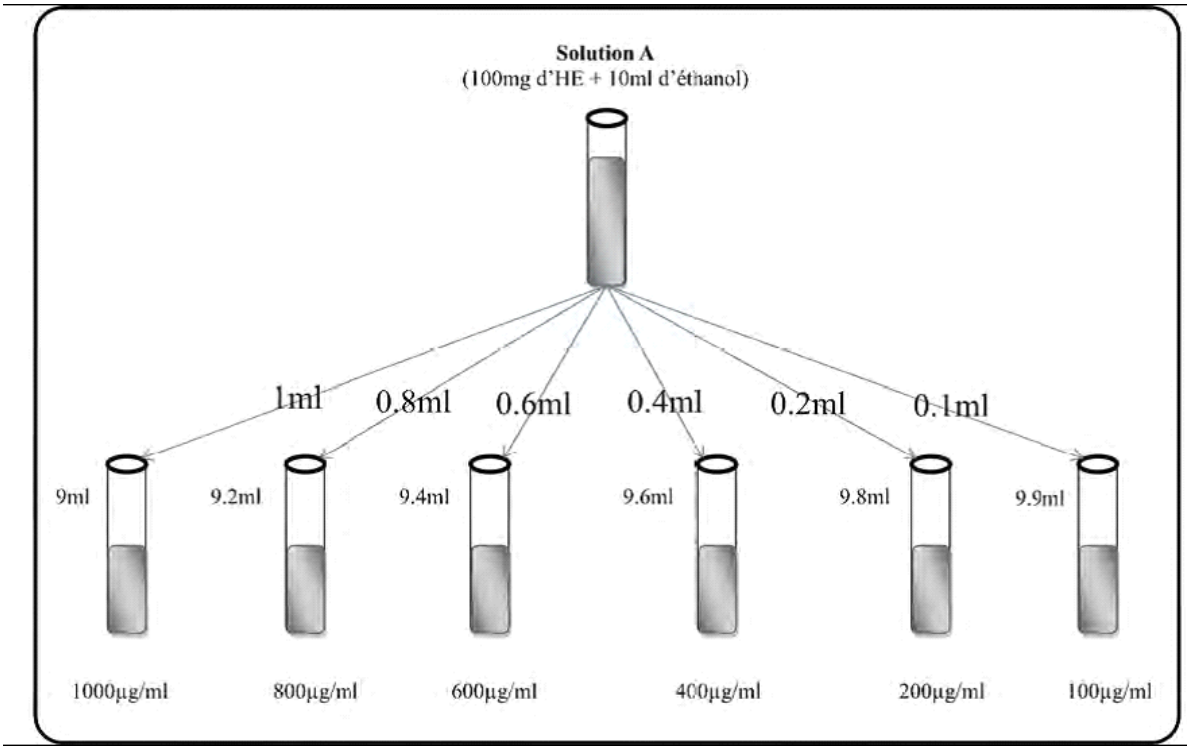



**Figure20.** Préparation des dilutions de l'huile essentielle d'eucalyptus.

**Expression des résultats**

L'activité antiradicalaire est exprimée par le pouvoir de réduction de la solution d'éthanol de DPPH• (**Rashid et al., 2010).** D'après **Dung et al. (2008) et Eyob et al. (2008)**, le pouvoir de réduction est déterminé en appliquant la formule suivante :

PR= Ac-Ae/Ac *100

**PR** : Pouvoir de la réduction en % ;

**AE**: absorbance de la solution de DPPH• en présence de l'huile essentielle ou de la vitamine C ;

**AC** : absorbance de la solution de DPPH• en absence de l'huile essentielle et de la vitamine C.

La variation du pouvoir de réduction en fonction de la concentration de l'huile essentielle et de la vitamine C, nous permet de calculer le paramètre CE50.

La CE50 « Concentration Efficace » est définie comme étant la concentration de l'huile essentielle (ou de la vitamine C) nécessaire pour réduire 50% des radicaux libres dans le

milieu réactionnel. Plus la valeur de CE50 est basse, plus l'activité antiradicalaire est élevée, et vice versa **(Qian & Nihorimbere, 2004; Gramza et al., 2005).**

# Résultats

## 1. Rendement en huile essentielle d'*Eucalyptus blakelyi L et cladocalyx L.*

Pour calculer le rendement on a fait une extraction de 200 g des feuilles d'*Eucalyptus blakelyi.L* et *cladocalyx.L* avec 500 ml d'eau distillé dans un hydrodistillateur de type Clevenger, après l'extraction on obtient 4g d'huile essentielle *E.blakelyi.L* et 1.16 g de d'huile essentielle *cladocalyx.L* , de couleur jaune claire avec une odeur agréable et un rendement de 2.5 % et 0.58 % respectivement.

## 2. Activité antibactérienne

### 2.1-Identification des bactéries

Les caractères morphologiques ; le type respiratoire et le test de catalase sont mentionnés dans le tableau suivent :

**Tableau II: Les caractères morphologiques ; le type respiratoire et le test de catalase**

| **Souches** | ***S.eureus*** | ***Escherichia. Coli*** | ***P.aeruginosa*** | ***Bacillus subtilus*** | ***Entérococcus faecalis*** | ***Kleibsilla oxycota*** | ***Listeria innocua*** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Forme** | Cocci | Bacille | bacille | Bacille | Cocci | Bacille | Bacille |
| **Mobilité** | immobile | Mobiles | très mobile | Mobile | Immobile | immobile | Mobile |
| **Gram** | Bactérie Gram positive | Bactérie Gram négative | bactérie Gram négative | bactérie Gram positive | bactérie Gram positive | bactérie Gram négative | bactérie Gram positive parfois négative |
| **type respiratoire** | aéro-anaerobie | aérobie stricte | aéro-anaerobie | aerobie stricte | aero-anaerobie | Anaerobie facultatif | aero-anaerobie |
| **Catalase** | Positive | Positive | positive | positive | Négative | positive | Positive |

### 2.2-identification par la galerie

Les caractéristiques biochimiques sont déterminées en utilisant des plaques d'identification des souches avec leur catalogue analytique.les résultats obtenus des plaques API20E pour *E.coli* et *E.feacalis* sont les suivants **(figure 21-22) :**



**Figure 21 : galerie API20E pour *E.faecalis***



**figure 22 : galerie API20E pour *E.coli***

**La lecture des galeries**

**Tableau III : Illustration du profil biochimique de la souche *E.coli* et *E.feacalis***

| **Tests** | ***E.faecalis*** | ***E.coli*** |
|---|---|---|
| ONPG | + | + |
| ADH | + | + |
| LDC | - | + |
| ODC | - | - |
| CIT | - | - |
| H2S | - | - |
| URE | + | - |
| TDA | - | - |
| IND | - | + |
| VP | + | - |
| GELA | + | - |
| GLU | - | + |
| MAN | - | + |
| INO | - | - |
| SOR | - | + |
| RHA | - | + |
| SACCH | - | - |

| | | |
|---|---|---|
| MEL | - | + |
| AMY | - | - |
| ARA | - | + |

+ Test positif - Test négatif

## 2.3. Evaluation de l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'Eucalyptus

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle de deux espèces d'euclyptus vis-à-vis de neuf bactéries. Pour l'espèce *E.blakelyi*.L Les zones d'inhibition sont indiquées dans **(le tableau4).** D'après la classification de **Ponce et al. (2003),** les zones d'inhibitions, variant entre 6 et 17 mm, indiquent que cinq souches sont sensibles à l'huile essentielle des feuilles sèches *d'E.blakelyi* et quatre sont résistants. (**Voir annexe 3 et 4)**

**Tableau IV : les zones d'inhibition (mm) de différentes dilutions d'*E.balkelyi***

| ***E.blakelyi*** | **SM-moy** | **1/2 moy** | **1/4moy** | **1/8moy** | **ATB** |
|---|---|---|---|---|---|
| **E.coli isolé** | 15.66 ± 1,699 | 11.66 ± 0,471 | 11± 0,816 | 10 | 25 |
| ***E.coli ATCC*** | 13.33± 4,784 | 10.33 ± 0,471 | 8.66 ± 0,471 | 8.66 ± 1,699 | 28 ± 2,160 |
| ***S.aureus ATCC*** | 12.33 ± 0,471 | 14.66 ± 3,091 | 17.66 ± 1,247 | 11.66 ± 0,471 | 30 |
| ***Kleibsilla oxycota*** | 10 ± 1 | 9.33 ± 0,471 | 8.66 ± 0,471 | 8 | 30 |
| ***Bacillus sublilis ATCC*** | 15.33 ± 3,399 | 12 ± 0,816 | 11.66 ± 0,471 | 10.66 ± 0,471 | 38 |
| ***S.aureus isolé*** | 6 | 6 | 6 | 6 | 29 |
| ***Listeria innocua ClIP*** | 6 | 6 | 6 | 6 | 30 |
| ***Efaecalis ATCC*** | 6 | 6 | 6 | 6 | 30 |
| ***P.aeruginosa*** | 6 | 6 | 6 | 6 | 30 |

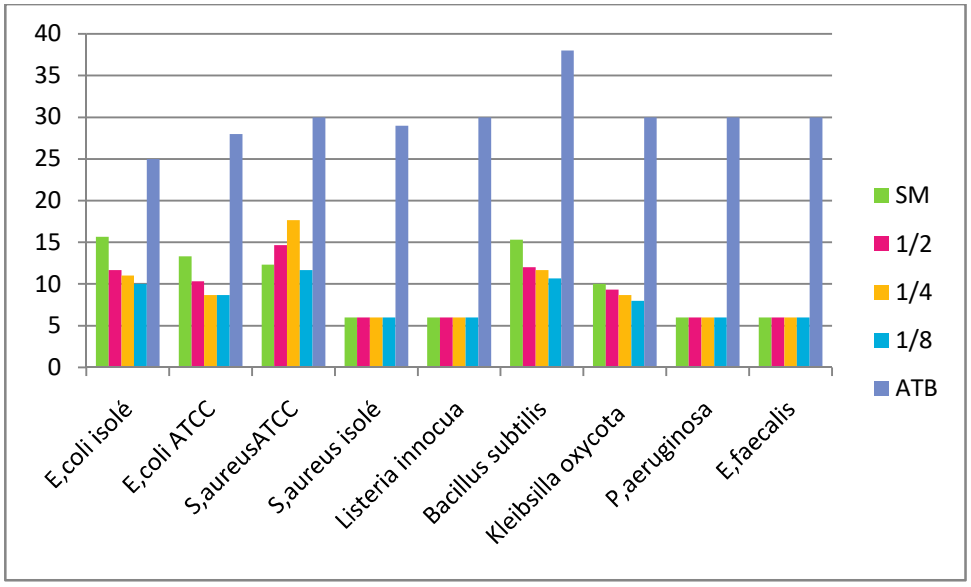



**Figure 23: représentation graphique des zones d'inhibition d'*E.blakylei L sur les souches bactériennes* .**

D'après nos résultats (**tableau4** et **la figure23**) nous constatons facilement que l'huile essentielle des feuilles sèches *d'E.blakelyi.L* n'a pas une très bonne activité si on la compare à l'antibiotique de contrôle. Nous constatons aussi que presque toutes les bactéries sensibles ont un même diamètre d'inhibition. **(Voir annexe 3 et 4)**

Malgré l'existence des zones d'inhibition, relativement moins faibles, nos résultats prouvent l'existence d'activité antibactérienne contre cinq souches testés. Donc, il est intéressant d'estimer les CMI.

Pour l'espèce *E.cladocalyx* Les zones d'inhibition sont indiquées dans le (**tableau5 ;figure 24).**

D'après la classification de Ponce **et *al.* (2003**), les zones d'inhibition, variant entre 6 et 32mm, indiquent que sept souches sont sensibles à l'huile essentielle des feuilles sèches d'*E.cladocalyx.L* et deux sont résistants (**voir annexe 3 et 4)**

| *E.cladocalyx* | SM-moy | 1/2-moy | 1/4-moy | 1/8-moy | ATB-moy |
|---|---|---|---|---|---|
| ***E.coli atcc*** | 28 ± 2,160 | 28 ± 1,414 | 24 ± 0,816 | 24 ± 0,816 | 34.33 ± 3,299 |
| ***S.aureus ATCC*** | 31.3 ± 1,247 | 29.66 ± 0,471 | 27 | 25.33 ± 0,471 | 28.66 ± 1,247 |
| ***Kleibsilla oxycota*** | 29 ± 2,160 | 26 ± 2,160 | 24.33 ± 2,357 | 25.66 ± 1,699 | 30.66 ± 3,299 |
| ***Bacillus subtilis ATCC*** | 32.33 ± 2,516 | 25 ± 2,449 | 25.66 ± 2,054 | 25 | 31.66 ±2,357 |
| ***P.aeruginosa*** | 15 ± 3,559 | 12.66 ± 0,471 | 11.66 ± 0,942 | 10 | 42.33 ± 2,624 |
| ***Listeria ennocua*** | 18 ± 1,732 | 20.33 ±0,471 | 19 ± 0,816 | 18.33 ± 1,247 | 33.66 ± 1,699 |
| ***E.faecalis*** | 28 ±2,828 | 25 ± 0,816 | 25 ± 1,414 | 24.66 ± 0,942 | 31.66 ± 2,357 |
| ***S.aureus isolé*** | 6 | 6 | 6 | 6 | 32.66 ± 2,054 |
| ***E.coli isolé*** | 6 | 6 | 6 | 6 | 29 ± 1 |

**Tableau V : Les zones d'inhibition de différentes dillutions d'*E.cladocalyx L* sur les souches bactériennes .**

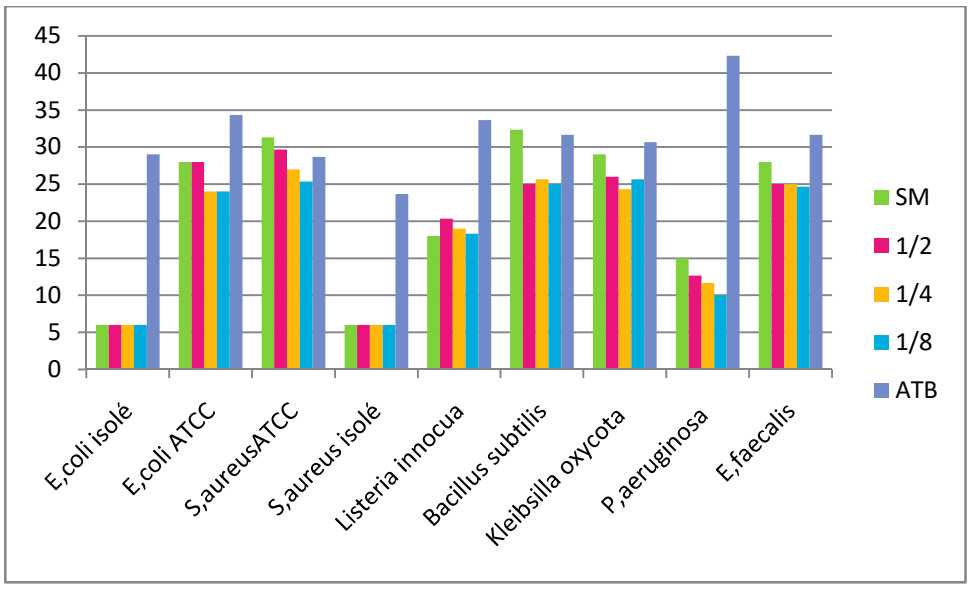



**Figure24 : Représentation graphique des zones d'inhibition *d'E.cladocalyx L* Sur les souches bactériennes.**

Comme un contrôle négatif, le DMSO n'a pas affecté la croissance des souches bactériennes dans cette étude. Ces résultats sont en similaires avec ceux obtenus par **Gachkar et al. (2006).**

## 3. Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le tableau suivant regroupe les CMI en H.E. correspondant à chaque souche bactérienne testée. **(Voir annexe 4)**

**Tableau VII: la concentration minimale inhibitrice d'*E.cladocalyx L,* et *E.blakelyi L* sur les souches bactériennes testées**

| | ***E.blakelyi*** | | | | ***E.cladocalyx*** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Souches** | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 |
| ***S.aureus ATCC*** | 10 | 9.5 | 9.5 | **9** | 10 | 9.5 | 9.5 | **9** |
| ***Kleibsilla oxycota*** | 10 | 10 | **9** | 9.5 | 9.5 | 10 | 9.5 | **9** |
| ***E.coli ATCC*** | 7 | 9 | 10 | 8 | 9.5 | 9.5 | 9.5 | **9** |
| ***Bacillus subtilus*** | 10 | 9.5 | **9** | 10 | 9.5 | 10 | 10 | **9** |
| ***E.coli isolé*** | 7 | **6.5** | 7 | 7 | / | / | / | / |
| ***P.aeruginosa*** | / | / | / | / | **8** | / | / | / |
| ***Listeria innocua*** | / | / | / | / | 9.5 | 9.5 | 9.5 | **9** |
| ***E.feacalis*** | / | / | / | / | 9.5 | 9.5 | **9** | 9.5 |

- **pour la première espèce *E. blakelyi* :**

La valeur de la CMI de l'H.E pour *S. aureus* ATCC est de 1/128 qui correspond à un diamètre de 9mm. (disque de 8 mm).

La valeur de la CMI de l'H.E pour *Kleibsilla oxycota* et *Bacillus subtilis* ATCC est de 1/64 qui correspond à un diametre de 9mm. (disque de 8mm).

La valeur de la CMI de l'H.E pour *E.coli* ATCC est de 1/16 qui correspond à un diametre de 7mm. (disque de 6mm).

La valeur de la CMI de l'H.E pour *E.coli* isolée est de 1/32 6. Qui correspond à un diametre de 5mm. (disque de 6mm).

- **Pour le deuxième espèce E.*cladocalyx***

La valeur de la CMI de l'H.E pour *E.coli* isolée, *S. aureusATCC*, *Kleibsilla oxycota et bacillus subtilis ATCC* est de 1/128 qui correspond à un diamètre de 9mm. (Disque de 8mm).
La valeur de la CMI de l'H.E pour *Pseudomonas aeruginosa*, *Listéria innocua* ATCC et *E.faecalis* ATCC est de 1/16 ; 1/128 et 1/164 qui correspond a un diamètre de 8 mm, 9mm respectivement (disque de 8mm).

## 4.Évaluation de l'activité Activité antifongique des huiles essentielles

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle des feuilles sèches *d'E.balkelyi et E.cladocalyx* .vis-à-vis de deux souches fongiques testées. L'activité antifongique est révélée par l'absence ou la présence de la croissance mycélienne. Elle se traduit par un halo translucide autour du disque identique à la gélose stérile **(Mironescua et Georgescub, 2008**).
Nos résultats indiquent que l'huile essentielle d'Eucalyptus de deux espèces a une capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de deux souches fongique. Les zones d'inhibition sont résumées dans **le tableau 7**. Elles varient entre et 12 et 7mm (y compris le diamètre de disque de 6mm). **(Voir annexe 3et 4)**

**Tableau 7 : Les zones d'inhibition de différentes dilutions *d'E.cladocalyx* et *E.blakelyii* sur les souches fongiques**

| ***E.blakelyi*** | **SM-moy** | **½-moy** | **¼-moy** | **1/8-moy** | **ATF-moy** |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Candida albicans*** | 10.33 ± 2,867 | 8.66 ± 1,699 | 8.66 ± 2,357 | 12 ± 5,715 | 13 ± 4,966 |
| ***Rhizopus sp*** | 9 ± 0,816 | 10.66 ± 0,942 | 10 ± 0,816 | 9.66 ± 1,247 | 22 ± 2,828 |
| ***E.cladocalyx*** | SM | ½ | ¼ | 1/8 | ATF |
| ***Candida albicans*** | 10.33 ± 2,867 | 10.33 ± 2,867 | 7 | 7 | 7.66 ± 0,471 |
| ***Rhizopus sp*** | 9 ± 0,816 | 8.66 ± 0,942 | 9.33 ± 0,942 | 10 ±1,632 | 24.66 ± 1,247 |

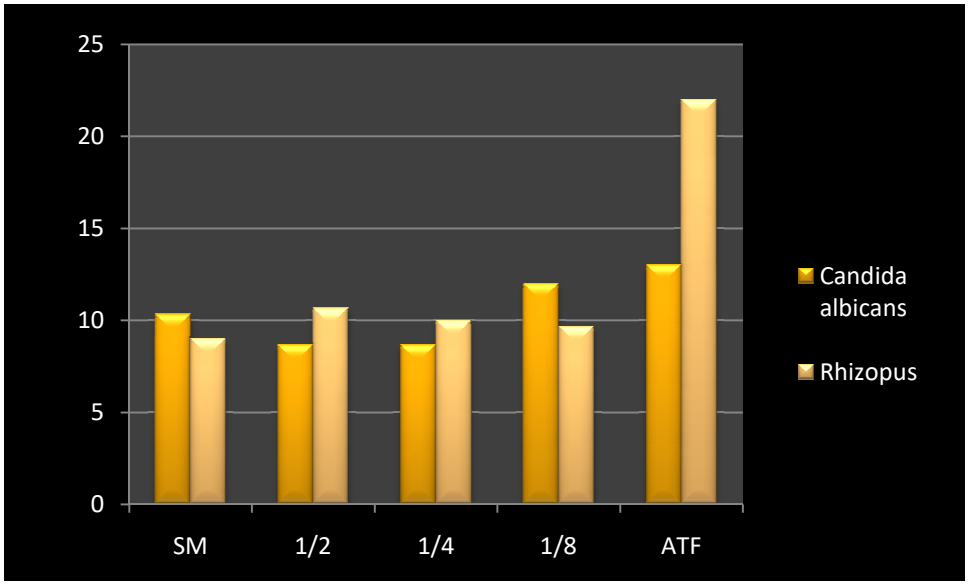



**Figure25 : Représentation graphique des zones d'inhibition d'*E.blakelyi L***

**Sur les souches fongiques**

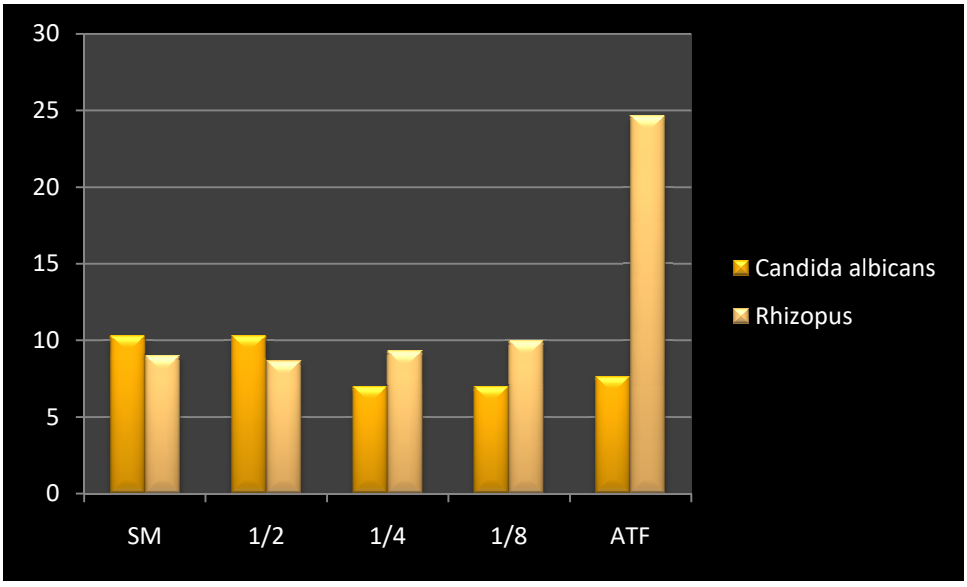



**Figure26 : Représentation graphique des zones d'inhibition d'*E.cladocalyx L***

**Sur des souches fongiques**

## 5. Evaluation de l'activité antiradicalaire

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des feuilles sèches d'*Eucalyptus balkelyi* et *E.cladocalyx* est évaluée par la méthode de DPPH* en la comparant à l'acide ascorbique. Les valeurs de CE50 sont calculées, en vue de déterminer les concentrations qui réduisent 50%

des radicaux libres. Les CE50 moyennes sont obtenues par la moyenne des CE50 évaluées graphiquement et séparément à partir des régressions des trois tests. Dans la présente étude, l'huile essentielle de première espèce étudie *d'Eucalyptus balkelyi L* et la vitamine C ont pu réduire le radical DPPH* avec des valeurs de CE50 de **141.17µg.ml-1** et de **0.61µg.ml-1**, respectivement. L'huile essentielle d'*E.blakelyi L* a montré une activité de balayage du DPPH* moins élevée par comparaison à la vitamine C.

**Tableau VIII : Pourcentage de réduction du DPPH par l'acide ascorbique**

| **concentration (vitamine c)** | 16000µg.ml-1 | 16µg.ml-1 | 8µg.ml-1 | 4µg.ml-1 | 2µg.ml-1 | 1µg.ml-1 | 0.5µg.ml-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Pouvoir de réduction%** | 98 | 81 | 77 | 69 | 64 | 56 | 48 |




**Figure 27 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.**

**Calcul du CE50:**

1 – 0.5 ⟶ 17mm **X1=0.61µg.ml-1**

X1 – 0.5⟶ 4mm

**Tableau IX: Pourcentage de réduction du DPPH par *E.blakelyi L.***

| **concentration *E.balkelyi*** | SM µg.ml-1 | 1000µg.ml-1 | 800µg.ml-1 | 600µg.ml-1 | 400µg.ml-1 | 200µg.ml-1 | 100µg.ml-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Pouvoir de réduction%** | 80 | 70 | 64 | 65 | 58 | 56 | 45 |

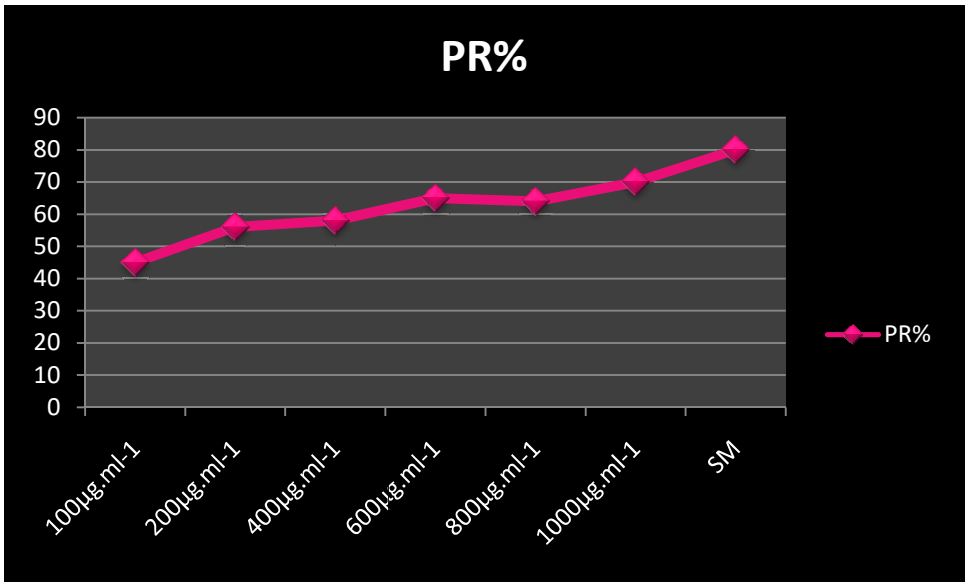



**Figure 28 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'*Eucalyptus blakelyi L* .**

**Calcul de CE50**

200 – 100 ⟶ 17mm **X2=141.17µg.ml-1**

X2 – 100 ⟶ 7mm

Pour la 2ème espèce étudie d'*Eucalyptus cladocalyx L* on trouve que la valeur de CE50 est de **470.58µg.ml-1**. L'huile essentielle d'*E.cladocalyx L* a montré une activité de balayage du DPPH faible par comparaison à la vitamine C et *E.blakelyi L*.

**Tableau X : Pourcentage de réduction du DPPH par *E.cladocalyx L.***

| **concentration *E.cladocalyx*** | SM µg.ml-1 | 1000µg.ml-1 | 800µg.ml-1 | 600µg.ml-1 | 400µg.ml-1 | 200µg.ml-1 | 100µg.ml-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **pouvoir de réduction%** | 69 | 64 | 62 | 57 | 47 | 44 | 43 |

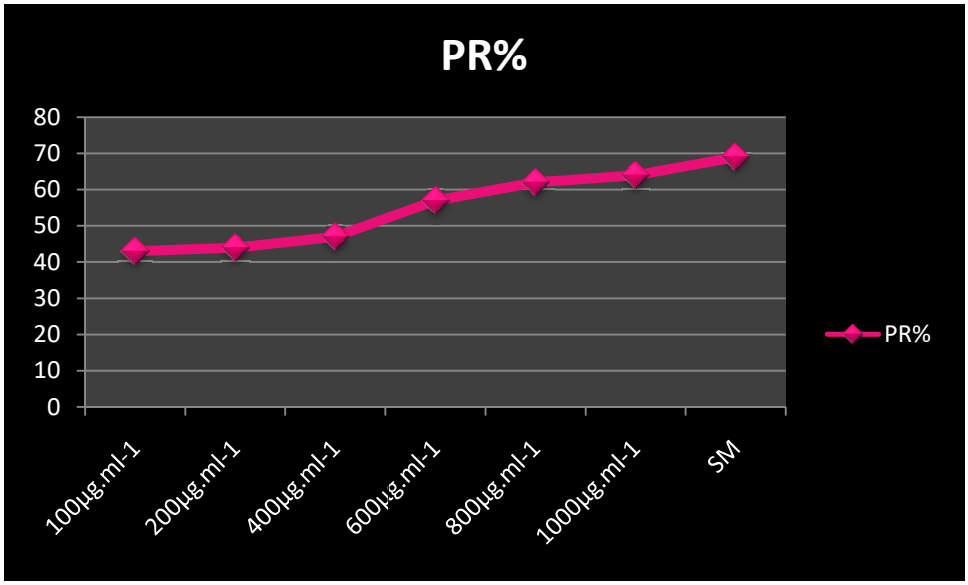



**Figure 29 : Pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH en fonction des différentes concentrations d'*Eucalyptus cladocalyx.L***

## Calcul d'EC50:

400 – 600 ⟶ 17mm **X3=470.58µg.ml-1**

X2 – 600 ⟶ 6mm

# Discussion

## 1. Extraction et calcul des rendements :

L'extraction des huiles essentielles des deux espèces *Eucalyptus blakelyi.L* et *Eucalyptus cladocalyx.L* a été effectuée par distillation à l'aide d'un appareil de type Clevenger

Nous pouvons remarquer une différence significative entre les rendements d'extraction des espèces étudiées dans ce travail.

*E cladocalyx.L* possède un rendement faible (o.58%) par rapport à celui de l'*E blakelyi.L* ou on a enregistré un rendement important (2 .5%) ; cette espèce peut constituer une source importante pour l'extraction de l'huile essentielle.

**(Abdallah Farah, 2001)** a montré que l'*Eucalyptus camaldulensis.L* poussant au Maroc possède un rendement de 0.84%, **Taleb- Toudert Karima** a obtenu un rendement de 0.48% et 1.19% respectivement pour les espèces *E globulus.L* et *E radiata.L*

Les différences existances entre les rendements d'extraction obtenus pour les espèces étudiées sont probablement liées aux facteurs climatiques (froid, chaleur, stress hydrique), géographiques (nature du sol, porosité) et génétiques (croisements naturels).

## 2. Activité antimicrobienne

La méthode de diffusion des disques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des feuilles sèches d'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx.L* vis-à-vis des bactéries testées.

Selon la classification de **Ponce et *al*. (2003),** cinq souches sont sensibles à l'huile essentielle d'*Eucalyptus blakelyi.L* et quatre sont résistantes, alors que pour *Eucalyptus cladocalyx.L* sept sont sensibles et deux sont résistantes.

La méthode de l'aromatogramme est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne ensuite viennent des méthodes plus détaillées. Dans cette méthode, les paramètres tels que le volume de l'huile essentielle placé sur les disques de papier, l'épaisseur de la couche d'agar et si un dissolvant est employé varient considérablement entre les études (**Manou et *al*. 1998; Burt, 2004**). Ceci signifie que cette méthode est utile pour le choix des huiles essentielles actives et pour la mise en évidence de leur activité antibactérienne, mais la comparaison des données éditées n'est pas faisable à concentration, et par la suite son activité antibactérienne.

Dans cette étude, Nous constatons que *S.aureus* ATCC et *Bacillus subtilus* ATCC sont les bactéries les plus sensibles pour l'espèce *E.blakylei L* qui a montré des effets inhibiteurs à des concentrations plus faibles avec une CMI enregistrée pour le diamètre de 9mm. En outre, *Escherichia.coli* (ATCC, isolé) et *kleibsilla oxycota* sont des souches moyennement sensibles avec une CMI égale à de7,6.5 et 9 respectivement . Les zones d'inhibition sont presque identiques avec une activité antibactérienne intermédiaire. L'huile a montré des effets inhibiteurs de plus jusqu'aux faible concentrations.

. Des résultats similaires ont été rapportés par **Alitonou et *al.*** Ils ont montré que l'huile essentielle d'*Eucalyptus tereticornis.L* a un pouvoir inhibiteur à l'égard des micro-organismes étudiés ; aussi **Sohounhloué et *al*.**ont montré que les huiles essentielles de *Eucalyptus camadulensis* a une activité biologique sur les microorganismes.
*Psodomonas aeroginosa* ; *E. feacalis* et *Listeria innocua* apparaissent résistantes vis-à-vis l'huile essentielle de *E.blakelyi.L* dans cette étude.

Pour *E.Cladocalyx.L ; S aureus , Bacillus subtilis; klebsiella oxycota* ;*E.coli* (ATCC ) et *E.faecalis* présentent une forte activité antibactérienne avec des zone d'inhibition qui dépassent 23 mm pour toutes les dilutions d'huile avec une CMI pour le diamètre de 9 mm pour toutes les souches suivies par *Listeria innocua* et *pseudomonas aeruginosa* qui ont présenté une activité moins intéressante par rapport les autres souches avec une zone d'inhibition moins faible inférieure à 20mm et CMI pour les diamètres de 8 et 9 mm respectivement .

L'activité la plus élevée a été démontrée par l'antibiotique standard gentamicine (témoin). C'est parce que l'antibiotique est à l'état pur et raffiné les processus qui l'ont établi comme un antibiotique standard (**Prescott et *al*. 2002).**
Toutes les souches se sont révélées sensibles à la gentamicine avec des diamètres variés. Le plus grand a été enregistré sur *E. feacalis* ATCC 29212 avec une zone de 25 mm, et le plus petit est de 12 mm enregistré pour *Escherichia coli.*
Nos résultats sont similaires à ceux rapportés par **Farah et *al*. 10, Babayi et *al*. 11, Gamal et Sabrin12 et Nair et *al*,**qui ont également rapporté l'activité inhibitrice de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* et *globulus* contre *S. aureus* et *E. coli.* Ceci pourrait être expliqué par le fait que les bactéries à G+ possèdent des dispositifs structuraux qui sont plus susceptibles aux huiles essentielles **(Abdul Rahman et *al*. 2010).** En revanche, **DORMAN**

**et DEANS (2000),** ont observé une tendance semblable quant à la sensibilité de *S. aureus* en présence de l'extrait d'Eucalyptus.

Dans la présente étude, les bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ;*E.feacalis* ;*Listéria innocua*; ) se sont avérées les plus résistantes. Plusieurs travaux notamment ceux de **Ouattara et *al.* (1997); Hammer et *al.* (1999) ; Souza et *al.* (2006a); Ahmad et *al.* (2006b); Ağaoğlu et *al.* (2007); Derwich et *al.* (2010) et Bari et *al.* (2010)** ont confirmé la grande résistante des bactéries G- par rapport aux G+. Ce constat peut être dû à l'action de certains composés volatiles de l''huile essentielle étudiés d'une part et à la présence d'une couche de lipopolysaccharide (LPS) chez les bactéries G- qui pourrait fonctionner comme barrière efficace contre n'importe quelle biomolécule entrant d'autre part **(Inouye et *al.*, 2001; Bagamboula et *al.*, 2004 ; Upadhyay et *al.*, 2010) .**

Concernant le *Pseudomonas aeruginosa*, cette bactérie est connue pour sa résistance à n'importe quel genre d'agents antimicrobiens. En réalité, ce comportement n'est pas étonnant parce que le Pseudomonas aeruginosa a une capacité de former un biofilm (une organisation complexe composée de différentes strates dans lesquelles les bactéries se retrouvent en conditions physiologiques spécifiques à leur situation) **(Abi-Ayad et *al.*, 2011).**

*E. coli* ATCC 25922 s'est avérée sensible dans cette étude, malgré qu'elle est Gram négatif. ce qui a été également observé par Beylier (Beylier, 1979).

Il est postulé que les différents composants des huiles essentielles montrent différents degrés d'activité contre des bactéries G- et G+ (**Dorman et Deans, 2000)** et que la composition chimique des huiles essentielles peut varier selon plusieurs facteurs intrinsèque et extrinsèque **(Lahlou, 2004).**

**(Oyedeji et *al,* 1999)** ont démontré des activités antibactériennes considérables sur les bactéries à gram positif et négatif, et antifongiques sur Candida albicans des huiles essentielles de cinq variétés de Eucalyptus du Nigéria

**Elaissi et *al.* (2011)** ont décrit que l'huile essentielle de *Eucalyptus odorata* est la plus active contre *Staphylococcus aureus*. Selon Bachir et al. (2012) l'huile essentielle de *Eucalyptus globulus* a un effet sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*.

L'huile essentielle d'*E.blakelyi L* a montré une activité antibactérienne intermédiaire par rapport à *E.cladocalyx L* qui a une activité antibactérienne très forte. Cette faible efficacité d'*E.blakelyi L* est due probablement aux pertes des composés volatils de l'huile essentielle durant le stockage et/ou l'extraction. Donc, il serait rentable d'utiliser des feuilles récemment récoltées et d'essayer un autre procédé d'extraction pour obtenir des huiles essentielles efficaces du point de vue activité antibactérienne. Cette faible efficacité pourrait être aussi due au fait qu'au cours de la période d'incubation quelques composants volatils de l'huile peuvent s'évaporer des milieux de culture, ce qui diminuerait dans la présente étude,

Il est connu aussi que les espèces bactériennes n'ont pas également la même sensibilité vis-à-vis d'un agent antibactérien. De même dans une population bactérienne, il peut exister des différences individuelles de sensibilité. Ainsi, l'action antibactérienne est parfois partielle et après une diminution du nombre de bactéries, il y'a une reprise de la croissance bactérienne.

La matière organique du milieu de culture est susceptible de réduire l'efficacité d'un agent antibactérien en se combinant avec lui pour former des composés inactifs, en l'adsorbant et en diminuant sa concentration, ou en le précipitant et en l'éliminant purement. Ainsi, l'activité antibactérienne peut dépendre de la composition du milieu de culture.

Plusieurs travaux ont déjà démontré l'activité antimicrobienne des composés d'Eucalyptus dans différents domaines des sciences de la vie (**OSAWA et al. 1998; MURATA et al. 1990, 1992).**

En conclusion, il peut suggérer que l'huile de feuilles d'*Eucalyptus cladokalyx* et *blakelyi* - in vitro - possède une capacité antimicrobienne considérable par rapport aux souches étudiées. De plus, d'autres études sont nécessaires, en situation, pour identifier la dose efficace des huiles sur les micro-organismes et finalement introduire les huiles comme antimicrobien naturel et nouveau composé. Par conséquent, l'utilisation de l'Eucalyptus en tant que composé antimicrobien naturel in vitro nécessite des recherches supplémentaires sur le mécanisme de la plante de la pharmacie sur les micro-organismes

## 3. Activité antifongique

Les agents antifongiques synthétiques sont appliqués à grande échelle pour empêcher la croissance mycélienne. Ces produits chimiques sont également connus pour posséder des

propriétés cancérogènes, tératogéniques, oncogènes et génotoxiques **(Nagendra et *al.*, 2010**). La difficulté de développer une molécule antifongique est liée, d'une part à l'ultrastructure de la cellule fongique qui présente trois barrières : la paroi cellulaire chitineuse, les ergostérols membranaires et le noyau eucaryote **(Chami, 2005**) et d'autre part, les molécules antifongiques elles-mêmes qui peuvent engendrer des résistances (**Nagendra et *al*, 2010; Prasad et Kapoor, 2004**). Les huiles essentielles peuvent être utiles en tant qu'agents antifongiques parce qu'elles affectent plusieurs cibles simultanément et il n'y a aucun rapport de résistance ou d'adaptation des microorganismes à cause de la diversité des composés chimiques **(Bakkali et *al*., 2008).** Beaucoup de chercheurs ont confirmé la présence de l'activité antifongique de l'huile essentielle des feuilles d'Eucalyptus. De même, nos résultats prouvent l'existence de cette activité et indiquent que les huiles essentielles d'eucalyptus ont une activité antifongique. Plusieurs méthodes d'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles sont disponibles, mais puisqu'elles ne se basent pas sur le même principe, les résultats peuvent être profondément influencés par la méthode **(Mesa-Arango et *al*. 2009).**

Dans cette étude les deux souches fongiques testées sont faiblement sensibles aux huiles d'Eucalyptus.

*Rhizopus sp* apparait plus sensible aux deux huiles testés par rapport au *C. albicans albican* qui était moins sessible aux huiles testées et au kétoconazole qui était utilisé comme antifongique positif. Les résultats sont conformes à ceux obtenus par **Pelletier et *al.*** qui ont signalé que l'utilisation généralisée des azoles a conduit à l'apparition d'isolats de Candida résistants.

La méthode de diffusion des disques est intensivement employée pour étudier l'activité antifongique des substances naturelles et des extraits des plantes.**(Mohammedi, 2006).** Elle nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle des feuilles sèches d'Eucalyptus vis-à-vis des souches fongiques.

Nos résultats indiquent que l'huile essentielle a une faible capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de toutes les souches testées.

Le test des disques est limité seulement au criblage de l'activité antifongique, parce que, la capacité des disques est limitée et les zones d'inhibition, dans la présente étude, ne nous permettent pas de faire une comparaison entre les souches testées et elles ne sont pas représentatives et par conséquent le calcul des diamètres d'inhibition n'est pas exact.

**Sharma et Tripathi (2007)** ont prouvé que l'activité antifongique des huiles essentielles peut être évaluée par la méthode de dilution mieux que par la méthode de diffusion, puisque dans cette dernière, la taille de la zone d'inhibition dépend de la diffusion des composés insolubles dans le milieu de culture. Les mêmes résultats ont été rapportés par **Hammer et *al*. (2003).** En conséquent, l'évaluation de l'activité antifongique avec cette méthode est insuffisante, il fallait donc utiliser d'autres techniques telle que l'incorporation de l'huile essentielle directement dans le milieu de culture. Dans la méthode de dilution, le seul inconvénient est qu'elle exige une grande quantité de l'HE (**Mesa-Arango et *al*., 2009).**

Le mécanisme d'action des huiles essentielles contre des mycètes, jusqu'à maintenant, n'est pas totalement compris, mais quelques auteurs ont donné plusieurs suppositions selon leurs observations.

## 4. Activité antioxydante

L'activité antiradicalaire de l'huile essentielle des feuilles d'*E blakelyi L et cladocalyx L* a été évaluée suivant la méthode de DPPH•. Cette méthode peut être employée pour évaluer l'activité antiradicalaire dans une durée relativement brève. Presque 90% des études sur l'activité antioxydante utilisent la méthode du DPPH• **(Kulisic et *al*, 2004 ; Moon & Shibamoto, 2009)**. Cette méthode est simple mais fortement sensible **(Moon & Shibamoto, 2009)**. Dans ce test, on s'intéresse à mesurer l'activité de balayage d'un radical libre (DPPH•) par les fractions antioxydantes (huile essentielle) **(Ho et *al*, 2010).** L'effet antiradicalaire de l'huile essentielle sur le DPPH• est dû à leur capacité donatrice d'un atome d'hydrogène **(Conforti et *al,* 2006).**

Dans la présente étude La méthode a été utilisée pour évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres des huiles de feuilles d'*E.blakelyi L* et *E cladocalyx L*. Les activités de piégeage des radicaux DPPH (% d'inhibition) de diverses concentrations d'huiles de feuilles de deux huiles ont montrées la présence d'acivité antiradicalaire. Les huiles de feuilles de d'*E.blakelyi L* avaient des activités de piégeage des radicaux superieures à celles d'*E.cladocalyx L* avec une valeur dEC50 égale à **141.17**µg.ml-1 et **470.58µg.ml-1** pour *Eucalyptus cladocalyx L* respectivement la vitamine c a montré une activité plus élevées avec valeur d'EC50 égale à 0.61µg.ml-1, en comparant avec les échantillons d'huile d'eucalyptus par cette méthode. Cela peut être dû aux teneurs relativement élevées en composés phénoliques.

Nous résultats sont similaires a d'autres études faites avant par plusieurs chercheurs.

Les études les plus récentes démontrant leur activité antioxydante font largement défaut. Néanmoins, quelques études ont été menées pour étudier le potentiel antioxydant de l'huile essentielle de diverses espèces d'Eucalyptus telles que *Eucalyptus globulus* (Sacchetti et *al*., 2005), *Eucalyptus polyanthemos* et *Eucalyptus perriniana* (Lee & Shibamoto, 2001), *Eucalyptus camaldulensis (*Barra, Coroneo, Dessi , Cabras et Angioni, 2010, Fadel, Marx, El-Sawy et El-Ghorab, 1999), et *Eucalyptus tereticornis* (Singh et *al*., 2009). L'huile essentielle hydrodistillée des feuilles en décomposition et fraîches *d'E. Tereticornis* présentait une forte activité de piégeage contre les radicaux DPPH, OH et O2 (Singhetal., 2009). En contraste, l'huile des parties aériennes de *E. camaldulensis* et *Eucalyptus radiata* a été rapportée pour exposer l'activité de piégeage du DPPH (Barra etal., 2010, Bendaoud, Bouajila, Rhouma, Savagnacd et Romdhanea, 2009). Au meilleur de notre connaissance, c'est la première fois que l'on rapporte l'activité antioxydante d'une substance essentielle *d'E.blakelyi et E.cladocalyx L* contre une gamme de radicaux libres.

# Conclusion

# Conclusion

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les huiles essentielles extraites de ces plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Cependant, les travaux de recherche sur les propriétés antioxydantes, antibactériennes et antifongiques de certaines plantes sont rares. Par conséquent, l'évaluation de telles propriétés demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agent antioxydant et antimicrobien naturel. Dans ce contexte, nous avons essayé d'évaluer in vitro des activités antioxydantes, antibactériennes et antifongiques de l'huile essentielle extraite des feuille sèches d'*E.blakelyi.L* et *E.cladocalyx.L*. L'extraction de l'huile essentielle des feuilles

d'*E. blakelyi.L* et *E.cladocalyx.L* a été réalisée par hydrodistillation. Le rendement a été voisin de 0.58 pour *E.cladocalyx.L* et 2.5 pour *E.blakelyi.L.*

Pour l'activité antibactérienne, la méthode de l'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien de l'huile essentielle des d'*Eucalyptus blakelyi.L* et *E.cladocalyx*.L vis-à-vis de neuf bactéries. Ce pouvoir est relativement très fort et intéressant pour *E.cladocalyx.L* avec des zones d'inhibition variant entre 10 et 32mm et intermédiaire pour *E.blakelyi.L* avec des zones d'inhibition variant entre 10 et 15mm. Les CMI obtenues sont comprises entre 8et 10 mm pour *E.blakelyi.L et E.cladocalyx.L*

La méthode de diffusion des disques nous a permis aussi de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'huile essentielle des feuilles *d'E.blakelyi.L* et *E.cladocalyx.L* vis-à-vis des souches fongiques. Nos résultats indiquent que l'huile essentielle des feuilles d'eucalyptus des deux espèces a une faible capacité inhibitrice de la croissance mycélienne de toutes les souches testées. Les zones d'inhibition varient entre 8 et 12 mm.

En fin, nos résultats indiquent que l'huile essentielle des feuilles d'Eucalyptus n'a pas une activité antifongique intéressante. En revanche, elle a montré des bonnes activités antioxydantes et antibactériennes.

# Références bibliographiques

# Références bibliographiques

**Abdesselam Z., (2006).** Les huiles essentielles, un pouvoir antimicrobien avéré. *Nutra News.*, pp.6-16.

**Abdul Rahman M.S., Thangaraj S., Salique S.M., khan K.F. and Natheer S.E., (2010).** Antimicrobial and biochemical analysis of some spices extract against food spoilage pathogens. Internet Journal of Food Safety, Vol.12, pp. 71-75.

**Abi-Ayad M., Abi-Ayad F.Z., Lazzouni H.A. and Rebiahi S.A., (2011).** Antibacterial activity of Pinus halepensis essential oil from Algeria (Tlemcen). J. Nat. Prod. Plant Resour.,1 (1): pp. 33-36.

**AFNOR.,(2000).**Huiles essentielles. Echantillonnage et méthodes d'analyse Monographiesrelatives aux huiles essentielles(Tome2) .

**AFNOR,( 2000)**, Huiles essentielles, Monographies relatives aux huiles essentielles, Tome 2, 6ème édition, AFNOR, Paris.

**Agbaka A., Sohounhloué D. K., Dockoïmo E. B**., **Djossou L. et Fouad K.** ; **J. Soc(1999)..** Ouest Afr. Chim. 8-87**.**

**Ahmad A.M., Khokhar I., Ahmad I., Kashmiri M.A., Adnan A. and Ahmad M., (2006)b**. Study of antimicrobial activity and composition by GC/MS spectroscopic analysis of the essential oil of Thymus serphyllum. Internet Journal of Food Safety, Vol. 5, pp.56-60

**Ahmad I., Aqil F. and Owais M., (2006)a**. Modern phytomedicine : Turning medicinal plants into drugs. Ed. *WILEY-VCH* Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405pAhmed S.M. and

**Abdelgaleil S.A.M., (2005)**. Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. (Magnoliaceae). *Int. J. Agri. Biol.,* Vol. 7, №4, pp.638-642.

**Aiyegoro O.A. and Okoh A., (2010).** Preliminary phytochemical screening and *in vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 10 : 21; pp. 1-8.

**Ağaoğlu S., Dostbil N. and Alemdar S., (2007).** Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bull Vet Inst Pulawy 51, pp.53-57.

**Alais C., Linden G. et Miclo L.,( 2008).** Biochimie alimentaire, DUNOD. 6ème édition, paris. pp. 67-71

**Anton R. & Lobstein A., (2005),** Plantes aromatiques, Epices, aromates, condiments et Huiles essentielles, Tec & Doc, Paris, p.522.

**Archana B., Dasgupta N. and De B., (2005)**. In vitro study of antioxidant activity of Syzygium cumini fruit. Food Chem. 90, pp. 727-733

**Armando C.C. and Rahma H.Y., (2009).** Evaluation of the yield and the antimicrobial activity of the essential oils From: *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus* and *Rosmarinus officinalis* (Uganda). *Rev. Colombiana cienc. Anim*. 1 (2), pp. 240-250.

**Atta, AH., Alkofahi, A.,( 1998)**. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. J Ethnopharmacol, Mar; 60 (2):117-24.

**Babayi H, Kolo I, Okogun JI, Ijah UJJ (2004).** The antimicrobial activities of methanolic extracts of Eucalyptus camaldulensis and Terminalia catappa against some pathogenic microorganisms. Biokemistri, 16(2), 106-111.

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

**Bagamboula C.F., Uyttendaele M. and Debevere J., (2004)**. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards Shigella sonnei and S. flexneri. Food Microbiology 21: pp. 33-42.

**Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. and Idaomar M., (2008)**. Biological effects of essential oils - a review. Food Chem Toxicol 46 : pp. 446-475.

**Bari M.A., Islam W., Khan A.R. and Mandal A., (2010).** Antibacterial and antifungal activity of Solanum torvum (Solanaceae). Int. J. Agric. Biol., 12: pp. 386-390

**Barra, A., Coroneo, V., Dessi, S., Cabras, P., & Angioni, A. (2010).** Chemical variability, antifungal and antioxidant activity of Eucalyptus camaldulensis essential oil from Sardinia. Natural Product Communications, 5, 329 et 335.

**Bassereau M., Chaintreau A, Duperrex S, Joulain D, Leijs H, Loesing G, OWEN N, Sherlock A, Schippa C, Thorel PJ, VEY M( 2007).**GC-MSQuantification of suspected volatile allergens in fragrances.Data treatment strategies and method performances. J Agric Food Chem;.55: 25-31

**Bassole H.N., Kabore Z. and Traore A.S., (2002).** É tude des profils bactériostatiques et bactéricides d'extraits végétaux vis-à-vis de germes pathogènes impliques dans la contamination des denrées alimentaires d'origine animale. *Pharm. Med.trad.afr,* Vol.11, pp. 113-122.

**Bajpai V.K. and Kang S.C., (2010).** Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of Metasequoia glyptostroboides Miki ex Hu. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 87: pp. 327-336.

**BAUDOUX, D. 2007,** Le formulaire d'aromathérapie pratique pour le prescripteur et le conseil pharmaceutique Edition Inspir,

**BencheqrounH K., Ghanmi M., Satrani B., Aafi A. & Chaouch A. (2012).** Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'Artemisiamesaltantica, plante endémique du Maroc. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège.81:4-21.

**Bendaoud, H., Bouajila, J., Rhouma, A., Savagnacd, A., & Romdhanea, M. (2009).** GC/ MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of Eucalyptus radiata. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89,1292e1297.

**Benjilali B. et Zrira S., (2004).**Plantes Aromatiques et Médicinales. Atouts du secteur et perspectives de développement durable. Actes Editions (Rabat)

**Benzeggouta N., (2005)**. Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de quatre plantes médicinales connues comme aliments. *Mémoire de magister*, Université de Constantine, Algérie, 110p.

**BERNARD T., PERIAU F., BRAV O., DELMAS M. et GASET A., (1988).** Extraction des huiles essentielles. Chimie et Technologie. Information chimie. Brewing Microbiology, 3rd Edition. Priest and Campbell, ISBN 0-306-47288-0

**Beylier-Maurel M.F., (1976).** Activité bactériostatique des matières premières de parfumerie. *Rivista Italiana*. *E.P.P.O.S.,* 58: pp. 283-286.

**Blois M.S., (1958).** Antioxidant determination by the use of a stable radical. *Nature*, 4617, pp. 1199-1200

**Bouguerra A(.2012)**.Etude des activités biologiques de l'huile essentielle extraite des graines de Foeniculumvulgare Mill, en vue de son utilisation comme conservateur alimentaire. Mémoire de magister. Université Mantouri Constantine.120p.

**BOUDY P. (1955).** Économie forestière nord-africaine. Ed Masson et cie, Paris, Tome IV .p826.

**Bouzouita N., Kachouri F., Ben Halima M., Chaabouni MM.,( 2008),** Composition chimique et activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide de l'huile essentielle de *Juniperus phoenicea, Société Chimique de Tunisie,* p. 119 - 125.

**Bruneton J., (2009),** *Pharmacognosie : phytochimie, plantes médicinales*, 4e Ed, Lavoisier, Paris,p.1269.

**BRUNETON J.,(1993)**.Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales. 2emeédition, Lavoisier, Paris. p 41-54 et 915 2emeédition, Lavoisier, Paris.

**Bruneton, J.,(1999)**. Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 4 eme éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales, p 1288.

**Bruneton, J.,(2008)**.Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales, 2Eme éd., Paris, Tec & Doc –Éditions médicales internationales, p1188.

**Bruneton J.,( 1999).** pharmacognosy Phytochemistry medical plants Lavoisie publishing, USA, New York 2:a upplagan s. 555-558

**Burits M., and Bucar F., (2000).** Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res*. 14 (5): pp. 323-328.

**Burits M., Asres K. and Bucar F., (2001).** The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. *Phytotherapy Res.* 15: pp. 103-108.

**Calvin A., (2001).** Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Ménispermacée), *Merremia emarginata* (Convolvulacée) et *Oropea enneandra* (Annonacée), *Thèse de Doctorat*, Lausanne. 241p.

**Chami F., (2005).** Evaluation in vitro de l'action antifongique des huiles essentielles d'origan et de girofle et de leurs composes majoritaires in vivo application dans la prophylaxie et le traitement de la Candidose Vaginale sur des modeles de rat et de souris immunodeprimes. Thèse de doctorat, Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès, Maroc, 266p

**Canillac N. and Mourey A.,( 2001).** Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiol*. 18: pp. 261-268.

**Caplin J.L., Allan I. & Hanlon G.W., (2009).** Enhancing the in vitro activity of *Thymus* essential oils against *Staphylococcus aureus* by blending oils from specific cultivars. *International Journal of Essential Oil Therapeutics* 3, pp. 35-39.

**CavenaghiLA,biganzolie,danese A(1992)** , parentif-diffusion of teicoplaninand voncomycin in agar . diagn microbiol infect dis ;15(3) :253-8

**Chaintreau A., Joulain D, Marin C, Schmidt CO, VEY M. GC-MS,(2003)**.quantitation of fragrance compounds suspected to cause skin reactions. J Agric Food Chem;,vol 51p 398-403.

**Chairgulprasert V., Prasertsongskun S., Junpra-ob S. and Sangjun M., (2008).** Chemical constituents of the essential oil, antioxidant and antibacterial activities from *Elettariopsis curtisii* Baker. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 30 (5): pp. 591-596.

**Chang C.W., Chang W.L., Chang S.T. & Cheng S.S., (2008)a.** Antibacterial activities of plant essential oils against *Legionella pneumophila*. *Water Research* 42 : pp.78-286.

**Chua M.T., Tung Y.T. and Chang S.T., (2008)**. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology* 99: pp. 1918-1925.

**CISOWSKI W.,( 1985)**. Flavonoid compounds in Myrrhis odorata (L.) Scop." Herba Polonica, 31: 13-19

**Cordero C, Bicchi C, Joulain D, Rubiolo P., (2007).**Identification, quantitation and method validation for the analysis of suspected allergens in fragrances by comprehensive two dimensional GC coupled with quadrupole MS and with FID. J Chromatographie A. ,1150: 37-49.

**Cowan M-M, (1999),** Plant Products As Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*. 12 (4), p. 564 582.

**Cuendet M., Hostettmann K. and Potterat O., (1997)**. Iridoid glucosides with free radicalscavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta.* 80: pp.1144-1152.

**Cox S.D., Mann C.M., Markham J.L., Bell H.C., Gustafson J.E., Warmington J.R. & Wyllie S.G.,( 2000).** The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology* 88: pp. 170-175.

**DAVIS, P2006**.. L'aromathérapie de A à Z Edition Vigot.

**De Billerbeck V.G., Roques C., Vanière P. & Marquier P.,( 2002).** Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Revue hygiène. Vol. X - N°3, pp. 248-254.

**Del-Vechio-Vieira G., Sousa O.V., Yamamoto C.H. and Maria Kaplan A.C.,( 2009)**. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Ageratum fastigiatum* (Asteraceae). *Rec. Nat. Prod*. 3:1 pp. 52-57.

**Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.

**Derwich E., Benziane Z. & Boukir A., (2009)**. Chemical composition and antibacterial activity of leaves essential oil of *Laurus nobilis* from Morocco. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.,* 3 (4): pp.3818-3824.

**Derwich E., Benziane Z. & Boukir A.,( 2010).** GC/MS Analysis and antibacterial activity of the essential oil of *Mentha pulegium* grown in Morocco. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.,* 6 (3):pp. 191-198.

**Dongmo P.M.J., Tchoumbougnang F., Ndongson B., Agwanande W., Sandjon B., Zollo P.H.A.& Menut C.,( 2010).** Chemical characterization, antiradical, antioxidant and antiinflammatory potential of the essential oils of *Canarium schweinfurthii* and *Aucoumea klaineana* (Burseraceae) growing in Cameroon. *Agric. Biol. J. N. Am.,* 1 (4): pp. 606-611.

**DORMAN H. J. D. et DEANS S. G. (2000).** Antimicrobial agents fro m plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology. 88, 308-316

**Dramane S., Witabouna K.M. & Kagoyire K.,( 2010)**. Evaluation des activites Antimicrobiennes et anti-radicaux libres de quelques taxons bioactifs de Côte D'ivoire. *European Journal of Scientific Research*. Vol. 40 N° 2, pp. 307-317.

**Dung N.T., Kim J.M. and Kang S.C., (2008).** Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr and Perry buds. Food and Chemical Toxicology 46: pp.3632-3639.

**Džamić A.M., Soković M.D., Ristić M.S., Novaković M., Grujić-Jovanović S., Tešević V. and Marin P.D., (2010).** Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (Lamiaceae) essential oil. *Botanica serbica vol.* 34 (1): pp. 57-61

**Essawi, T. et Srour, M., (2000).** Screeningof some palestinian medicinal plants for antibacterial activity. Journal Of Ethnopharmacology, ,70: 343-349.

**Eyob S., Martinsen B.K., Tsegaye A., Appelgren M. and Skrede G., (2008).** Antioxidant and antimicrobial activities of extract and essential oil of korarima (Aframomum corrorima (Braun) P.C.M. Jansen). African Journal of Biotechnology Vol. 7 (15), pp.2585-2592.

**Elaissi A, Salah KH, Mabrouk S, Larbi KM, Chemli R, Harzallah-Skhiri F. (2011).** Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species' essential oils. Food Chemistry, 129(4): 1427–1434.

**Fadel, H., Marx, F., El-Sawy, A., & El-Ghorab, A. (1999).** Effect of extraction techniques on the chemical composition and antioxidant activity of Eucalyptus camaldulensis var. brevirostris leaf oils. European Food Research and Technology, 208, 212e216.

**Faria T.D.J., Ferreira R.S., Yassumoto L., De Souza J.R.P., Ishikawa N.K. and Barbosa A.D.M.,(2006).** Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology* Vol.49, N° 6: pp. 867-871.

**Farah A, Satrani B, Fechtal M, Chaouch A, Talbi M (2001),**. Composition ch essentielles extraites des feuilles d'Eucalyptus camaldulensis et de imique et activités antibactérienne et antifongique des huiles son hybride naturel (clone 583). Acta Bot. Gallica., 148 (3), 2001, 183-190.

**Fayed S.A., (2009).** Antioxidant and anticancer activities of *Citrus reticulate* (Petitgrain Mandarin) and *Pelargonium graveolens* (Geranium) essential Oils. *Res. J. Agric. & Biol. Sci.,* 5 (5): pp.740-747.

**Florabank. Retrieved 30 July (2017).** *Atlas of Living Australia*. Global Biodiversity Information Facility. Retrieved .

**Forest dieback** (also "*Waldsterben*", a German loan word) is a condition in trees or woody plants in which peripheral parts are killed, either by pathogens, parasites or due to conditions like acid rain and drought.[1] Two of the nine tipping points for major climate changes, forecast for the next century, are directly related to forest diebacks.[2] *Phomopsis azadirachtae* is a fungus of the genus *Phomopsis* that has been identified as the fungus responsible for dieback of *Azadirachta indica* (Neem) in India.

**FOUDI C Y.(1991)** - Etude comparative des huiles essentielles algériennes d'Eucalyptus globuluslabill. etcamaldulensis.These magister. U.S.T.H.B., Alger, 159p.

**Fu Y., Zu Y., Chen L., Efferth T., Liang H., Liu Z. and Liu W., (2007).** Investigation of antibacterial activity of rosemary essential oil against *Propionibacterium acnes* with atomic force microscopy. *Planta medica* pp.1-20.

**Gachkar L., Yadegari D., Rezaei M.B., Taghizadeh M., Astaneh S.A. and Rasooli I., (2007).** Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*., 102: pp.898-904.

**Gamal AM, Sabrin RMI. Eucalyptone G( 2007),,** a new phloroglucinol derivative and other constituents from Eucalyptus globulus Labill ARKIVOC. Int. J. Org. Chem. October, 281-291.

**Goldestein, H.B., Epstein, B.J., (2000)**. La dentisterie non conventionnelle : Parais 4, les pratiques et les produits dentaires conventionnels. J Can. Dent. Assoc.; 66: 564- 568.

**Gerhard K. H. Przemeck, Jim Mattsson, Christian S. Hardtke, Z. Renee Sung and Thomas Berleth ,(1993).**Studies on the role of the Arabidopsis gene monopteros in vascular development and plant cell axialization .journal of physiological plant .vol 11p165-170

**Goldestein, H.B., Epstein, B.J., (2000)**. La dentisterie non conventionnelle : Parais 4, les pratiques et les produits dentaires conventionnels. J Can. Dent. Assoc.; 66: 564- 568.

**Goupy P., Dufour C., Loonis M. and Dangles O., (2003)**. Quantitative kinetic analysis of hydrogentransfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultureand Food Chemistry*, 51, pp. 615-622.

**Gramza A., Pawlak-Lema ◌ͦ◌́ska K., Korczak J., sowicz E.W. and Rudzinska M., (2005).**

Tea extracts as free radical scavengers. *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 14, N° 6 pp. 861-867.

**Grassmann, J., Hippeli, S., (2000** ). Antioxidant properties of essential oils. Possible explanations for their anti-inflammatory effects. Arzneimittelforschung Feb; 50 (2):135-139.

**Griffin S., (2000).** Aspects of antimicrobial activity of terpenoids and the relationship to their molecular structure. *Doctorante thesis*, University of Western Sydney, Sydney,Australia.

**GUINARD J.L., Cosson L., et Henry L., (1985).** Abrégé de phytochimie. Masson, Paris, 224 p.

**Guiraut J. P.**, **(2003).** Microbiologie alimentaire. Ed. DUNOD, Paris. pp. 110-112.

**Guiraud JP(1998).** Techniques d'analyse microbiologique. In:« Microbiologie alimentaire ». Dunod éd., Paris. France. pp. 171-246.

**Guy Alitonou G., Félicien Avlessi, Wotto D., Edwige Ahoussi, Dangou, Dominique J(2004)** . et Sohounhloué C. K. ; Composition chimique, proprieties antimicrobiennes et activités Sur les tiques de l'huile essentielles d'Eucalyptustereticornis Sm. C. R. Chimie 7 .

**Hammer K. A., Carson C. F., & Riley T. V.,( 1999).** Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology Vol. 86, Issue 6: pp.985-990.

**HEINRICH G., SCHULTZE W., PFAB I., ET BOETTGER M., (1983).** The site of essential oil biosynthesis in Poncirus trifoliata and Monarda fistulosa." Physiologie Vegetale, 21 : 257-268.

**Ho C.L., Wang E.I.C., and Su Y.C.,( 2009).** Essential oil compositions and bioactivities of the various parts of *Cinnamomum camphora* Sieb. var. *linaloolifera* Fujuta. 林業研究季刊31 (2) ：pp. 77-96.

**Ho C.L., Wang E.I.C., Yu H.T., Yu H.M. and Su Y.C., (2010).** Compositions and antioxidant activities of essential oils of different tissues from *Cryptomeria japonica* D. Don. 林業研 究季刊32 (1) : pp.63-76.

**Ho C.L., Wang E.I.C., Wei X.T., Lu S.Y. and Su Y.C.,( 2008).** Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. from Taiwan. *J. Essent. Oil Res.* 20: pp. 328-34.

**Hubert J., (2006).** Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments dugerme de soja – Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines. *Thèse de doctorat*. № 2435. Institut National Polytechnique de Toulouse, 64p.

**Hussain A.I., Anwar F., T.HS. Sherazi and Przybylski R., (2008)**. Chemical composition. antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*. 108: pp.986-995.

**Hussain A.I., (2009).** Characterization and biological activities of essential oils of some species of lamiaceae. *Doctorale thesis*, Pakistan ; 257p.

**Hussain A.I., Anwar F., Chatha S.A.S., Jabbar A., Mahboob S. and Nigam P.S.,( 2010).** Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology 41: pp.1070-1078.

**Imelouane B., Tahri M., Ankit M., khdid K., Amhamdi H. Dubois J. & Elbachiri A., (2010).** The essential oil of eastern moroccan *Rosmarinus Officinalis:* chemical composition, *in vitro* antimicrobial and antioxydant activities. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* Vol 4, N°2, pp. 120-141.

**Inouye, S., Tsuruoka, T., Uchida, K., Yamaguchi, H.,( 2001)**. *Microbiol. Immunol.*, *43*, pp.201– 208. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. *WILEY-VCH* Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.

**Iqbal S., Bhanger M.I. and Anwar F., (2005).** Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*. 93: pp. 265-272.

**Jacob M., Pellecuer J. & Tomei R.,( 1979).** Centre régional d'étude et de développement des plantes à usage pharmaceutique. *Rivista Italiana* E.P.P.O.S. 11: pp. 26-30.

**Juergens, UR., Dethlefsen, U.,( 2003)**. Anti-inflammatory activity of a 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. Respir. Med. 97: 250, 256.

**Kamal, M., Tantaaoui, El.A., Ismaili, A.M., (1997)**. Etude du pouvoir anti- fongique des fumées de feuilles d'Eucalyptus camaldulensis. Plantes médicinales et aromatiques et leurs huiles essentielles. Actes Editions.

**Kamatou G.P.P., Viljoen A.M. and Steenkamp P., (2009)**. Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, pp. 1-5.

**Kechkar M., (2008).** Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne. *Mémoire de magister*. Université Mentouri Constantine, Algérie. 99p.

**Kirby A.J. and Schmidt R.J., (1997)**. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. *J. Ethnopharmacol*. 56: pp.103-108.

**Klaric M.S., Kosalec I., Mastelic J., Pieckova E. & Pepeljnak S., (2006).** Antifungal activity of thyme(*Thymus vulgaris L.*) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44 (1): pp. 36-42.

**Kothe H.W., (2007),** 1000 plantes aromatiques et médicinales, Terres Editions.

**Kulisic T., Radonic A., katalinic V. and Milos M., (2004).** Use of different methods for the testing activity of oregano essential oil. Food Chemistry. 85: pp.633-640.

**Lahlou M., (2004)**. Methods to study phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research* 18 : pp. 435-448.

**Lee, K.-G., & Shibamoto, T. (2001).** Antioxidant activities of volatile components isolated from Eucalyptus species. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 1573e1579.

**Loganathan J.K., Gunasundari D., Hemalatha M., Shenbhagaraman R. and Kaviyarasan V.,(2010).** Antioxidant and phytochemical potential of wild edible mushroom *Termitomyces reticulatus*: individual cap and stipe collected from south eastern part of india. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* Vol. 1, Issue 7; pp. 62-73.

**Macrocarpal A**, a novel antibacterial compound from Eucalyptus globulus. Agricultural and Biological Chemistry. 54, 3221-3226.

**Macrocarpals,** antibacterial co mpounds from Eucalyptus, i nhibit aldose reductase. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 56, 2062-2063.

**Malecky M.,( 2007).** Métabolisme des terpénoïdes chez les caprins. *Thèse de doctorat*, INRA, UMR 791 Physiologie de la Nutrition et Alimentation, F-75231 Paris, pp. 30-35.

**Manou I., Bouillard L., Devleeschouwer M.J. and Barel A.O.,( 1998).** Evaluation of the preservative properties of Thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test. J. Appl. Microbiol. 84, pp. 368-376.

**Mautrait C. et Raoult R., (2009).,** *la* préparation : mode d'emploi (officine, sous-traitance et BP), 2éme édition, Porphyre France,p. 468.

**Maurice N., (1997),** De *l'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle*, Ed : Lavoisier, Paris,p. 12- 14

**Mayachiew P. & Devahastin S.(2008).**Antimicrobial and antioxidant activities of Indian gooseberry and galangal extracts. Food Science and Technology 41; pp. 1153-1159

**MAZEN K., EL TAMER.,( 2002).** Molecular Regulation of plant monoterpene biosynthesis in relation to frangrance. Prof Schirift wageningen university. ISBN. 90-5808-752-2.

**Mazza, G. P Delaquis S. M. Ward, R. A. olley, M. C. Cliff , (1992)**.Microbiological, Chemical and Sensory Properties of Pre-cooked Roast Beef Preserved with Horseradish .Essential Oil journal .vol 8p56-60.

**Meister, R., Wittig, T.,( 1999).** Efficacy and tolerability of myrtol standardized in long-term treatment of chronic bronchitis. A double-blind, placebo-controlled study. Study Group Investigators. Arzneimittel forschung Apr; 49 (4):351-8.

**Merah M., Bensaci B. M. et Bouderhem A(2010) .** ; Annales des Sciences et Technologie ; Vol. 2, N°2, 115-126.

**Mesa-Arango A.C., Montiel-Ramos J., Zapata B., Durán C., Betancur-Galvis L. and Stashenko E., (2009)**. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian

Lippia alba (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104 (6): pp.878-884.

**METRO A(.1970)**. Les eucalyptus dans le monde méditerranéen. Ed.masson et cie.Paris. p513.

**Molyneux P.,( 2004).** Use of DPPH to estimate antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* Vol. 26 № 2. 212p.

**MOHAMDI Z., (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, magistère Université Abou Bakar Bel Kaid Tlemcen, p105.

**Mohammedi Z. & Fouzia A.( 2007)**. Pouvoir fongistatique de l'huile essentielle d'une plante aromatique sur la croissance des champignons. Université Abou Bakr Belkaïd – Tlemcen, Algérie. 3p.

**Mohammedi Z., Bachik S. & Belkaroube N., (2010).** Potentiel antifongique et antiaflatoxinogène des huiles essentielles d'une plante endémique *Thymus fontanesii* Boiss. et Reut*. Les Technologies De Laboratoire*.Vol. 5, N°19, pp.10-15.

**Mohammedi Z., (2006).** Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse magistère, Université Abou Bakr Belkaïd Tlemcen, 155.

**Moon J-K. and Shibamoto T., (2009)**. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. J. Agric. Food Chem., 57 (5), pp.1655-1666.

**MURATA M., YAMAKOSHI Y., HOMMA S., AIDA K., HORI K., OHASHI Y. (1990).**

**MURATA M., YAMAKOSHI Y., HOMMA S., ARAI K., NAKAMURA Y. (1992).**

**Nair R, Vaghasiya Y, Chanda S. (2008** ). Antibacterial activity of Eucalpytus citriodora Hk. oil on few clinically important bacteria. Afric. J. Biotechnol. 7 ,1, 025-027.

**Nagendra P.M.N., Shankara B.S. and Sreenivasa M.Y., (2010).** Antifungal activity of essential oils against Phomopsis azadirachtae- the causative agent of die-back disease of neem. Journal of Agricultural Technology, Vol.6 (1): pp.127-133

**Nikhat F., Satynarayana D. and Subhramanyam E.V.S., (2009).** Isolation, charectrisation and screening of antioxidant activity of the roots of Syzygiumcuminii (L) Skeel. Asian J. Research Chem. 2(2): pp. 218-221.

**OSAWA K., SAEKI T., YASUDA H., MORITA H., TAKEYA K., ITOKAWA H. (1998).** Antibacterial activity of Eucalyptus g lobulus o n cariogenic bacteria and its <inhibitor y effect on glucosyltransferase. Natural Medicines (Tokyo). 52, 32-37.

**Ouattara B., Simard R.E., Holley R.A., Piette G.J.P. and Begin A., (1997)**. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. Int. J. Food Microbiol, 37, pp.155-162

**Ouamba J.M., (1991)**, Valorisation chimique des plantes aromatiques du Congo,Extraction et analyse des huiles essentielles Oximation des aldéhydes naturels, Mémoire de magister. Université Montpellier II, p. 342

**Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessennd K.N., Kanko C., Ahibo C. & Casanovad J., (2008).** Etude chimique et activite antdiarrheique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopee ivoirienne. *European Journal of Scientific Research*. Vol.24, №1, pp. 94-103.

**Oyaizu M., (1986)**. Antioxidative activities of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin-layer chromatography. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*. 35: pp.771-775.

**Oyedeji AO, Ekunday O, Olawore ON, Adeniyi BA, Koenig WA(1999).** Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Eucalyptus Species Growing in Nigeria. Fitoterapaia,.70:526-528.

**Paramapojn S. and Gritsanapan W., (2009)**. Free radical scavenging activity determination and quantitative analysis of curcuminoids in *Curcuma zedoaria* rhizome extracts by HPLC

method. *Current science, vol.* 97, N° 7, 10 : pp. 1069-1073

**Pavel M., Ristić M. and Stević T., (2009).** Essential oils of *Thymus pulegioides* and *Thymus glabrescens* from Romania: chemical composition and antimicrobial activity. *J. Serb. Chem. Soc. 75* (1) pp. 27-34.

**Petitjean A., (1974),** These de doctorat d'Etat, Montpellier, p.118.

**Pelletier R, Peter J, Antin C, Ganzalez C, Wood L, Walsh TJ (2000)**. Emergence of resistance of Candida albicans to clotrimazole in Human Immunodeficiency Virus infected children- In vitro and clinical correlations. J. Clin. Microbiol. 38, 1563-1568

**Perfumer et Flavorist, (2009)**, A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries, Vol. 34, In Baser K.H.C. and Buchbauer G., 2010, Handbook of essential oils: science, technology, and applications, Ed. Taylor and Francis Group, LLC. United States of America, p. 994

**Phattayakorn K. and Wanchaitanawong P.,( 2009).** Antimicrobial activity of thai herb extracts against coconut milk spoilage microorganisms. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 43 : pp.752-759.

**Pibiri M.C.,( 2006)**. Assainissement de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles. *Thèse de doctorat*. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, pp. 28-52

**Pierangeli, G., Vital, G. and Windell, R., (2009),** Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f). King and Robinson and*Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. Extracts. *J. Medicinal Plants Res*. **3(7**), p. 511-518

**Pollien,P.OH ,afay.L .B.Maignial ;chanitereau ,Simutaneous , (1998).**distillation – Extraction ,preparatice recovery of volatiles under mild condition bach or continous operations .Flavour and fragrance journal .vol7p50.

**Ponce A.G., Fritz R., del Valle C. & Roura S.I., (2003)**. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*.36, pp.679-684.

**Portes E., (2008)**. Synthèse et Etudes de étrahydrocurcuminoïdes : Propriétés photochimiques et antioxydantes, applications à la préservation de matériaux d'origine naturelle. *Thèse de doctorat*. № 3695. Université Bordeaux I, 244p.

**Prakash A., (2001)**. Antioxidant activity. *Medallion Laboratories analytical progress.* Vol. 19, №2. 2p.

**Prescott MI, Harley PS, Klein AD (2002)**. Microbiology. 5th Edition, McGraw Hill Inc., p. 39.

**Qian H. and Nihorimbere V.,( 2004).** Antioxidant power of phytochemicals from Psidium guajava leaf. J. Zhejiang Univ. SCI 5(6): pp.676-683.

**Rao, VS., 2000.** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8- cinéole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytother. Res Jun; 14(4): 240-244.

**Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., (2008).** Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *Food Chemistry* ; pp.135-140

**Razakarivony A.A., Andriamihaja B. & Razanamahefa B., (2009).** Etude chimique de l'huile essentielle des feuilles de *Callistemon rigidium*. *Actes du symposium biomad.* Université d'Antananarivo. 28p.

**Rashid ch A., Qureshi M.Z., Raza S.A., William J. and Arshad M., (2010).** Quantitative determination of antioxidant potential of *Artemisia persica. Analele UniversităŃii din Bucureşti – Chimie (serie nouă),* vol. 19 №1, pp. 23-30.

**Roche, M., Dufour C., Mora, N. and Dangles O., (2005).** Antioxidant activity of olive phenols: mechanistic investigation and characterization of oxidation products by mass spectrometry.*Organic Biomolecular Chemistry*, 3, pp. 423-430.

**Remmal A., Tantaoui-Elaraki A., Bouchikhi T. & Ettayebi M., (1993)a.** Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar Medium. *J. Essent. Oil Res.* 5: pp.1179-1184.

**Rasooli I., Fakoor M.H., Yadegarinia D., Gachkar L., Allameh A. and Rezaei M.B., (2008).** Antimycotoxigenic characteristics of Rosmarinus officinalis and Trachyspermum copticum L. essential oils. Food Chemistry ; pp.135-140.

**Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., et al. (2005).** Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry, 91, 621e632.

**Salazar-Aranda R., Perez-Lopez L.A., Lopez-Arroyo J., Alanis-Garza B.A. and De Torres N.W.,( 2009).** Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *ECAM* ; pp.1-6.

**Salle J.L., (1987)**, Les huiles essentielles : Sythèse d'aromathérapie et introduction à la

**Santos, F.A., Rao, VS., (2000).** Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8- cinéole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. Phytother. Res Jun; 14(4): 240-244

**Satrani B., Ghanmi M., Farah A., Aafi A., Fougrach H., Bourkhiss B., Bousta D. & Talbi M.,(2007).** Composition chimique et activité antimicrobienne de l'huile essentielle de *Cladanthus mixtus. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 146, pp. 85-96.

**Schauenberg P. et Paris F.,( 2010),** Guide des plantes médicinale : Analyse, description et utilisation de 400 plantes, Ed. Delachaux et Niestlé, p.396.

**Schlesier K., Harwat M., B ○̧hm V. & Bitsch R. A.,( 2002).** Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radical Research*, 36, pp. 177-187.

**Simionatto E., Bonani V.F.L., Morel A.F., Poppi N.R., Jú nior J.L.R., Stuker C.Z.,**

**Peruzzo G.M., Peres M.T. and Hess S.C., 2007.** Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) Stem Bark. *J. Braz. Chem. Soc.,* Vol. 18, №5, pp. 879-885.

**Singh, H. P., Mittal, S., Kaur, S., Batish, D. R., & Kohli, R. K. (2009).** Characterization and antioxidant activity of essential oils from fresh and decaying leaves of Eucalyptus tereticornis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 6962e6966.

**Sharma N. and Tripath A, (2007).** Effects of Citrus (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of Aspergillus niger (L.) Van Tieghem. Microbiol. Res. In press.

**Shin J.M. and Baek S.H., (2007)**. Antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Pterostoechas lavandula* and *Rosmarius officinalis. Journal of Cosmetics and Public Health* 3(1): pp. 1-4.

**Soto-Mendivil E A; Morenno-Rodrigez J F; Estarron-Espinoza M; Garcia Fajardorj A; Obleilo-Vazquez N.(2006).** Chemical composition and fungicidal activityof the essential oïl of thymus vulgaris against alternaria citri-E-Gnosis .

**Souza E.L., Stamford T.L.M. and Lima E.O.,( 2006)a**. Sensitivity of spoiling and pathogen foodrelated bacteria to *Origanum vulgare* L. (lamiaceae) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: pp.527-532.

**Souza E.L., Guerr N.B., Stamford T.L.M. and Lima E.O., (2006)b**, Spices: alternative sources of antimicrobial compounds to use in food conservation. Rev. Bras. Farm., p. 22-25.

**Smith-Palmer A., Stewart J. and Fyfe L., (1998)**. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol*. 26: pp.118-122

**Su Y.C., Lu S.Y., Ho C.L., Wang E.I-C. and Wei X.T.,( 2008)**. Composition and bioactivities of the leaf essential oils of *Cinnamomum subavenium* Miq. from Taiwan. *Journal of Essential Oil Research* Vol. 20; pp. 328-335.

**Taleb-Toudert Karima (2017)**,extraction et caractérisation des huiles essentiellesvde dix plantes aromatiques proveant de la région de la kabylie .

**Tepsorn R., (2009)**. Antimicrobial activity of thai traditional medicinal plants extract incorporated alginate-tapioca starch based edible films against food related bacteria including foodborne pathogens. *Doctorate Theses*. Thailand, 370p.

**Tesche, S., Metternich, F.,( 2008).** The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis. Results of a double-blind, randomised, controlled trial. Eur. Arch. Otorhinolaryngol.Nov; 265(11):1355-1359

**Traoré M. C., (2006).** É tude de la phytochimie et des activités biologiques de quelques plantes utilisées dans le traitement traditionnel de la dysménorrhée au Mali. *Thèse de doctorat*. Université de Bamako, Mali, pp. 175p.

**Upadhyay R.K., Dwivedi P. and Ahmad S.,( 2010).** Screening of antibacterial activity of six plant essential oils against pathogenic bacterial strains. Asian Journal of Medical Sciences 2 (3) : pp.152-158.

**Wangcharoen W. and Morasuk W.,( 2007).** Antioxidant capacity and phenolic content of holy basil. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 29 (5): pp.1407-1415

**Wang H.F., Yih K.H. and Huang K.F.,( 2010)**. Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potential active components. *Journal of Food and Drug Analysis,* Vol. 18, №1, pp. 24-33.

**Wan J., Wilcock A. and Coventry M.J., (1998)**. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol*. 84: pp. 152-158.

**Wichtl Max, Anton Robert,(2003) .**Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale science thérapeutique. Ed Tec. Doc.p29.

**Wilkinson J.M., (2006)**. Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. Chapiter VIII. pp.157-165. *In* Ahmad I., Aqil F. and Owais M. Modern Phytomedicine : Turning Medicinal Plants into Drugs. Ed. *WILEY-VCH* Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 405p.

**Wendakoon C. N. & Sakaguchi M., (1995).** Inhibition of amino acid decarboxylase activity of *Enterobacter aerogenes* by active components in spices. *Journal of Food Protection* 58:

pp. 280-283.

**Yang E.-J., Kim S.-S., Oh T.-H., Baik J.S., Lee N.H. and Hyun C.-G., (2009)**. Essential oil of citrus fruit waste attenuates LPS-induced nitric oxide production and inhibits the growth of skin pathogens *Int. J. Agric. Biol.*, 11: pp. 791–794.

**Yassa N., Masoomi F., Rohani Rankouhi S.E. and Hadjiakhoondi A.,( 2009)**. Chemical composition and antioxidant activity of the extract and essential oil of *Rosa damascena* from Iran, population of Guilan. *DARU* Vol. 17, N° 3 pp. 175-181.

**Yen T-B., and Chang S-T., (2008).** Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 99: pp. 232-236.

**Zarrin M., Amirrajab N. and Nejad B.S.,( 2010).** *In vitro* antifungal activity of satureja khuzestanica jamzad against *Cryptococcus neoformans*. *Pak. J. Med. Sci.*; 26 (4): pp.880-882..

**Zinedine, A. (2004).** Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Maroc. 162p

# Annexes

# Annexe 1

## Protocol de coloration de Gram

- Déposer une goutte d‘eau physiologique stérile sur une lame bien propre;
- Prélever un ose d’une colonie et mélanger avec la goutte d‘eau physiologique, strier et fixer à la chaleur par passage rapide sur la flamme d‘un bec benzène;
- Ajouter le Violet de Gentiane pendant 1mn, jeté le colorant ;
- Ajouter le Lugol pendant 1mn ;
- Décolorer avec de l’alcool pendant 30 secondes;
- Ajouter le deuxième colorant, la Fushine et laisser 1 mn puis laver à l’eau;
- Sécher la lame et mettre une goutte d’huile à immersion puis passer à l’observation microscopique au grossissement X100.

# Annexe 2

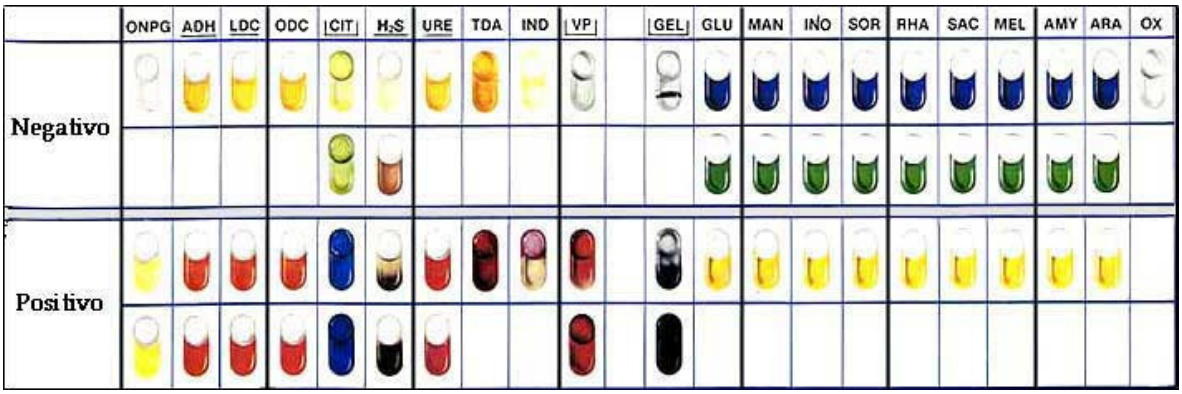



Tableau1 : Tableau de référence pour la lecture de galerie API20E

| Tests | Définition |
|---|---|
| ONPG | L'orthonitrophényl-B-glactoside |
| ADH | Arginine dihydrolase |
| LDC | Lysine décarboxylase |
| ODC | ornithinedécarboxylase |
| CIT | Citrate de simmons |
| H2S | Sulfure d'hydrogène |
| URE | Uréase |
| TDA | Tryptophane-désaminase |
| IND | Indole |
| VP | Voges-proskuer |
| GELA | Gélatinase |
| GLU | Fermentation de Glucose |
| MAN | Fermentation de Mannose |
| INO | Fermentation d'inositol |
| SOR | Sorbitol |
| RHA | Fermentation de rhamnose |
| SACCH | saccharose |
| MEL | Melibiose |
| AMY | Amylase |
| ARA | arabinose |

Tableau2 : Les tests microbiologiques d'API20

# Annexe 3

| ***E.blakylei.L*** | **SM** | **½** | **¼** | **1/8** | **ATB** |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Staphylococcus aureus ATCC*** | 12<br>13<br>12 | 19<br>13<br>12 | 18<br>19<br>16 | 12<br>12<br>11 | 30<br>30<br>30 |
| ***Escherichia coli ATCC*** | 20<br>11<br>09 | 10<br>10<br>11 | 09<br>08<br>09 | 11<br>08<br>07 | 29<br>25<br>30 |
| ***Escherichia coli isolé*** | 18<br>15<br>14 | 12<br>11<br>12 | 12<br>11<br>10 | 10<br>10<br>10 | 25<br>25<br>25 |
| ***Pseudomonas aeruginosa*** | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 30<br>30<br>30 |
| ***Enterococcus .feacalis*** | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 30<br>30<br>30 |
| ***Kleibsilla oxycota*** | 10<br>11<br>09 | 09<br>09<br>10 | 09<br>09<br>08 | 08<br>08<br>08 | 30<br>30<br>30 |
| ***Baccilus subtilis*** | 12<br>20<br>14 | 13<br>11<br>12 | 12<br>12<br>11 | 11<br>10<br>11 | 38<br>38<br>38 |
| ***Staphylococcus aureus isolé*** | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 29<br>29<br>29 |
| ***Listeria innocua*** | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 06<br>06<br>06 | 30<br>30<br>30 |

Tableau 3 : les zones d'inhibitions d'E.S d'*E.blakelyi*

| ***E.cladocalyx*** | **SM** | **½** | **¼** | **1/8** | **ATB** |
|---|---|---|---|---|---|
| ***e coli atcc*** | **SM** | **½** | **¼** | **1/8** | **ATB** |
| ***S.aureus atcc*** | 33<br>31<br>30 | 30<br>30<br>29 | 27<br>27<br>27 | 26<br>25<br>25 | 27<br>30<br>29 |
| ***Kleibsilla oxycota*** | 26<br>31<br>30 | 24<br>29<br>25 | 26<br>21<br>26 | 24<br>28<br>25 | 33<br>33<br>26 |
| ***Bacillus subtilis*** | 35<br>32<br>30 | 25<br>28<br>22 | 26<br>28<br>23 | 25<br>25<br>25 | 30<br>30<br>35 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ***P.aeruginosa*** | 20<br>13<br>12 | 10<br>13<br>12 | 11<br>13<br>11 | 10<br>10<br>10 | 46<br>41<br>40 |
| ***Listeria innocua*** | 20<br>17<br>17 | 21<br>20<br>20 | 20<br>19<br>18 | 20<br>17<br>18 | 33<br>32<br>36 |
| ***E.faecalis*** | 32<br>26<br>26 | 26<br>24<br>25 | 26<br>23<br>26 | 26<br>24<br>24 | 30<br>35<br>30 |
| ***S.aureus isolé*** | 6<br>6<br>6 | 6<br>6<br>6 | 6<br>6<br>6 | 6<br>6<br>6 | 35<br>33<br>30 |
| ***E.coli isolé*** | 6<br>6<br>6 | 6<br>6<br>6 | 6<br>6<br>6 | 6<br>6<br>6 | 28<br>30<br>29 |

Tableau 4 : les zones d'inhibitions d'E.S d'*E.cladocalyx sur les souches bactériennes*

| ***E.blakylei*** | **SM** | **½** | **¼** | **1/8** | **ATF** |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Candida albicans*** | 14<br>7<br>10 | 7<br>8<br>11 | 12<br>7<br>7 | 20<br>7<br>9 | 20<br>10<br>9 |
| ***Rhizopus sp*** | 8<br>9<br>10 | 12<br>10<br>10 | 11<br>10<br>9 | 11<br>10<br>8 | 26<br>20<br>20 |
| ***e.clado*** | SM | ½ | ¼ | 1/8 | ATF |
| ***Candida albicans*** | 7<br>14<br>10 | 14<br>10<br>7 | 7<br>7<br>7 | 7<br>7<br>7 | 8<br>8<br>7 |
| ***Rhizopus sp*** | 8<br>10<br>9 | 8<br>8<br>10 | 8<br>10<br>10 | 12<br>8<br>10 | 25<br>23<br>26 |

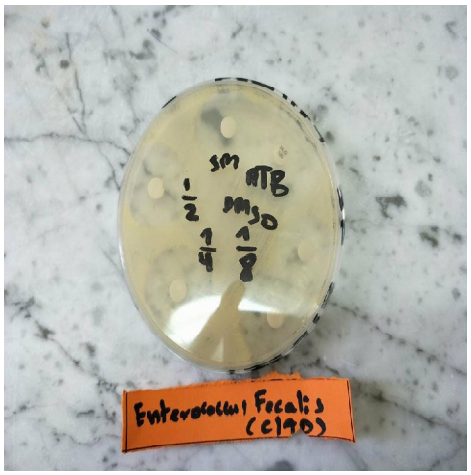
Tableau 5 : le diamètre d'inhibition d'*E.blakelyi et E.cladocalyx* sur les souches fongiques

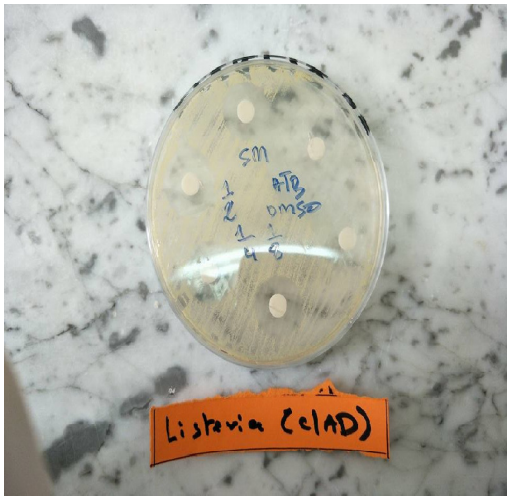
| | ***E.blakylei*** | | | | ***E.cladocalyx*** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Souches** | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 | 1/16 | 1/32 | 1/64 | 1/128 |
| ***S.aureus ATCC*** | 10 | 9.5 | 9.5 | **9** | 10 | 9.5 | 9.5 | **9** |
| ***Kleibsilla*** | 10 | 10 | **9** | 9.5 | 9.5 | 10 | 9.5 | **9** |
| ***E.coliATCC*** | **7** | 9 | 10 | 8 | 9.5 | 9.5 | 9.5 | **9** |
| ***Bacilllus*** | 10 | 9.5 | **9** | 10 | 9.5 | 10 | 10 | **9** |

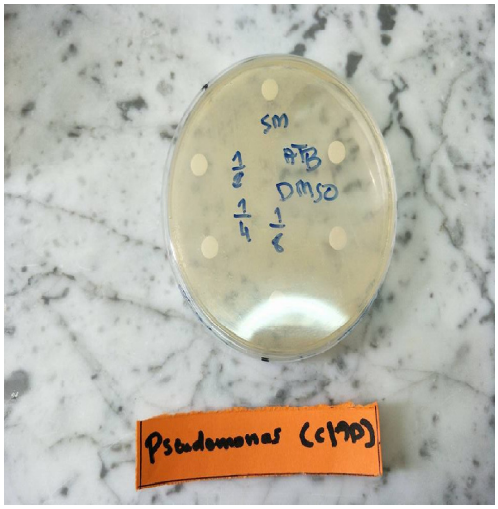
| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***subtilis*** | | | | | | | | |
| ***E.coli isolé*** | 7 | **6.5** | 7 | 7 | / | / | / | / |
| ***p.aeruginosa*** | / | / | / | / | **8** | / | / | / |
| ***Listeria oxycota*** | / | / | / | / | 9.5 | 9.5 | 9.5 | **9** |
| ***E.faecalis*** | / | / | / | / | 9.5 | 9.5 | **9** | 9.5 |

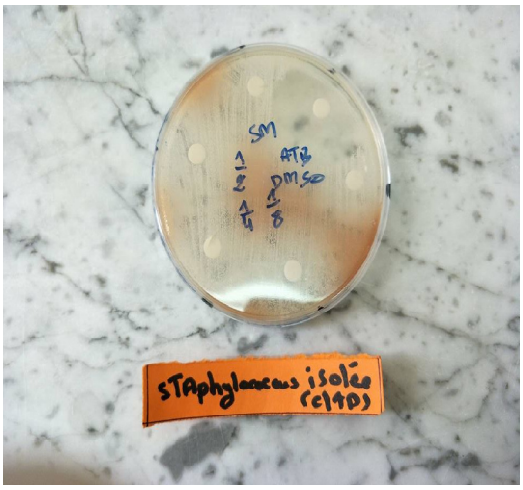
Tableau 6 : la concentration minimale inhibitrice d'*E.cladocalyx* et *E.blakelyi sur* de souches bactériennes testées

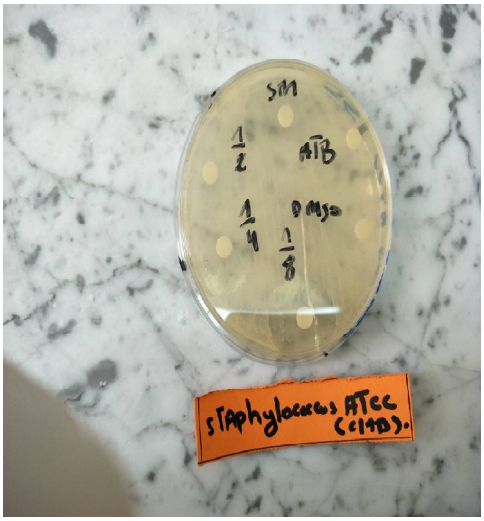
# Annexe 4

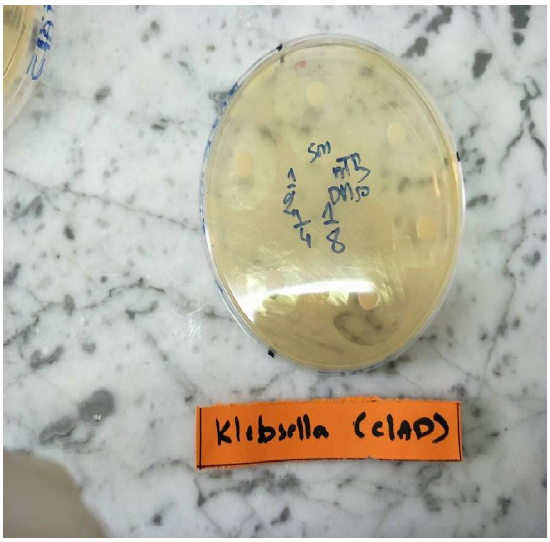


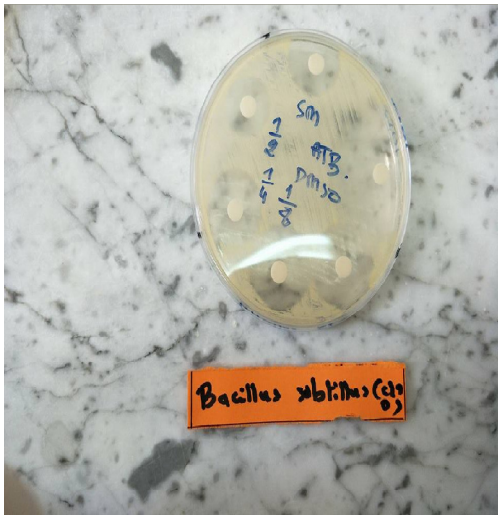



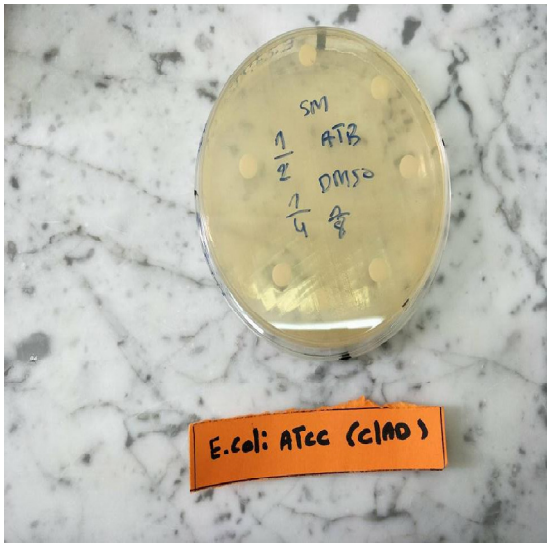





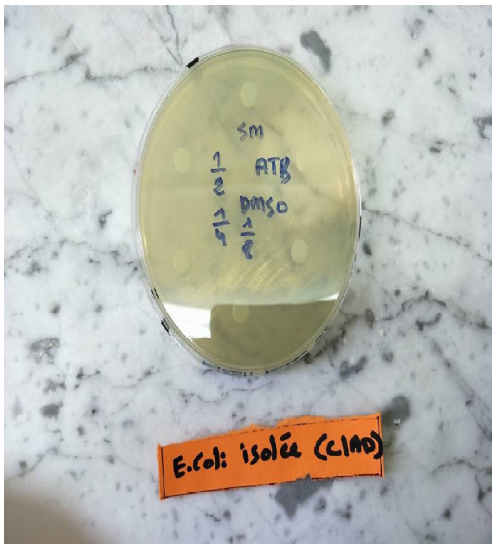
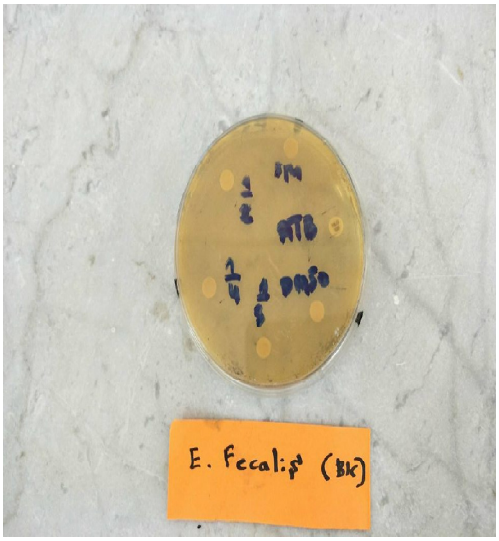
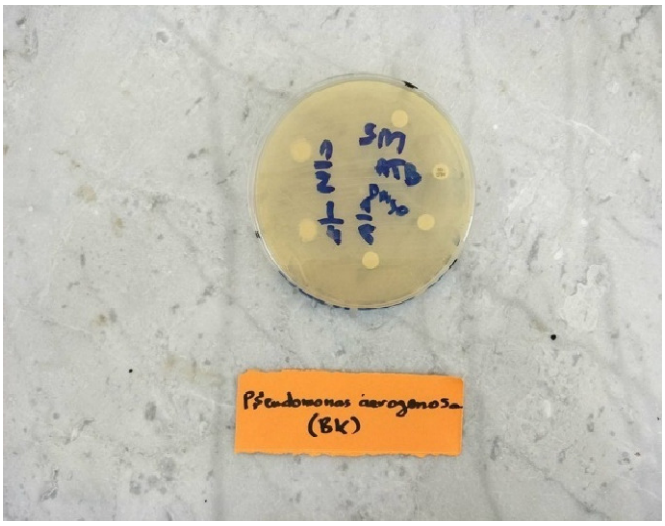
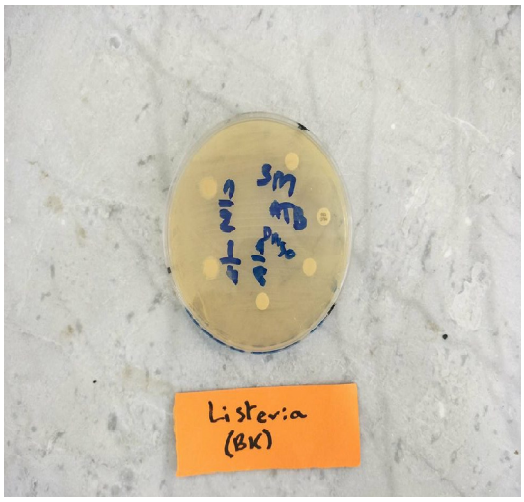



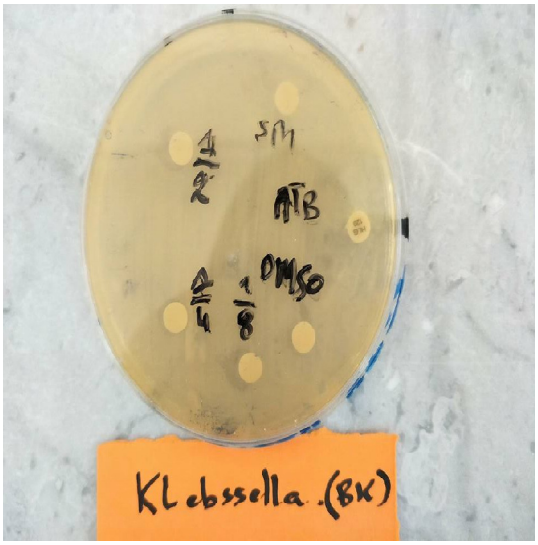

Fig 1 : Evaluation de l'activité antimicobienne de l'huile essentielle d'*E.cladocalyx par la méthode d'antibiogrammme*

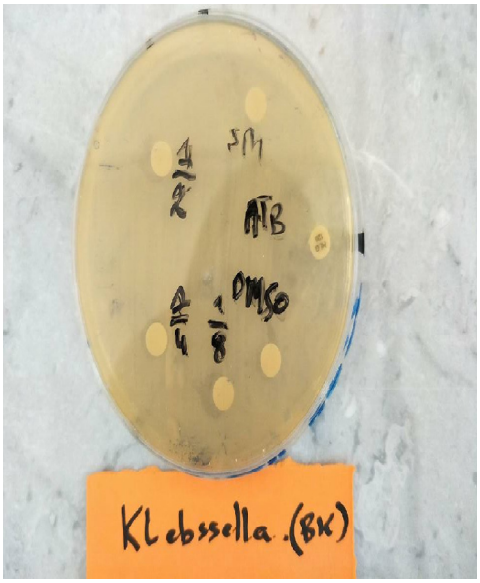

E. Fecalis (BK)

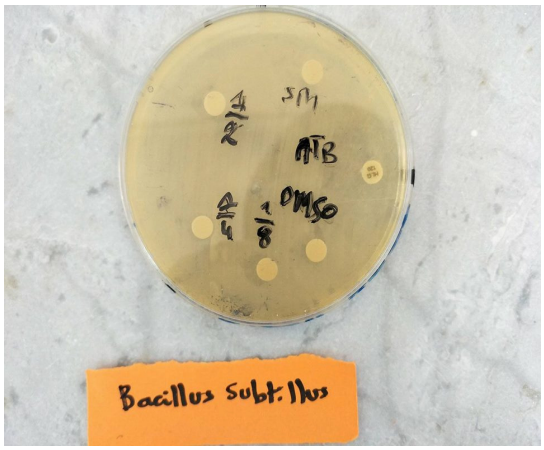

Pseudomonas aeruginosa
(BK)


Listeria
(BK)


staphylococcus isolée
(BK)


Klebssella (BK)


Klebssella (BK)



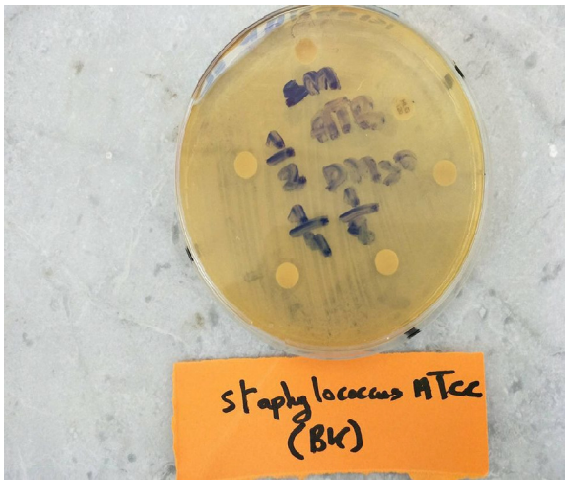
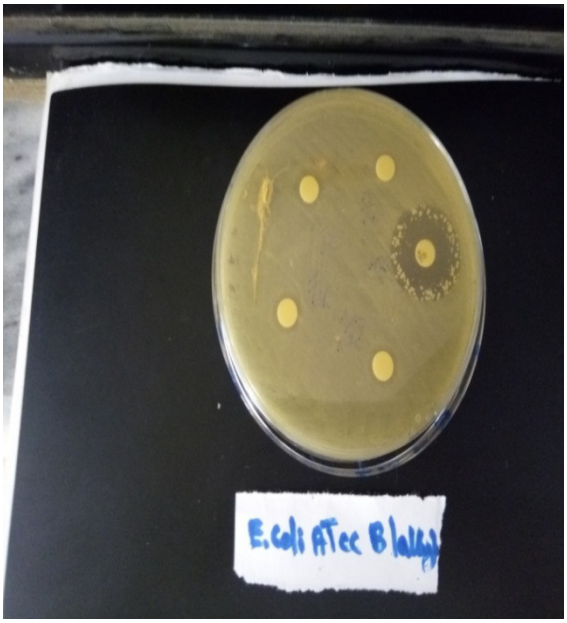







Fig 2 : Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle d'*E.blakelyi par la* méthode d'antibiogramme

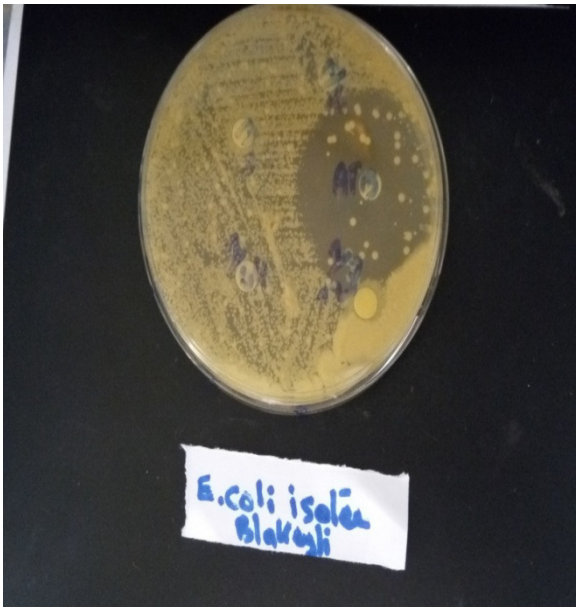
Fig3 : Evaluation de la concentration minimale inhibitrice inhibitrice CMI d'*E blakelyi* par méthode d'antibiogramme









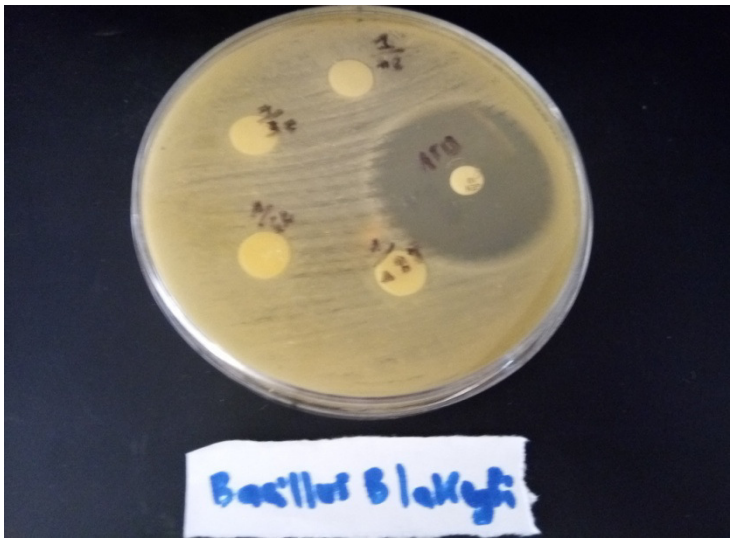
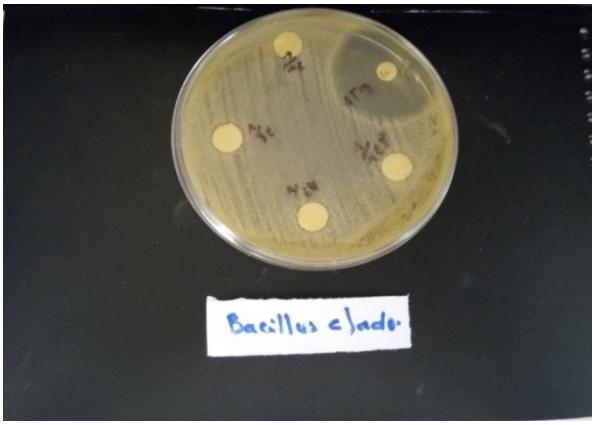
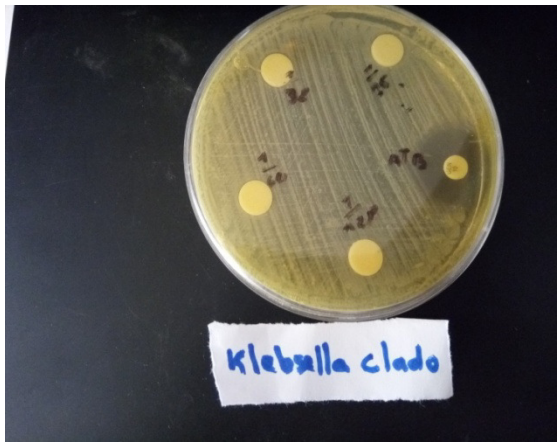
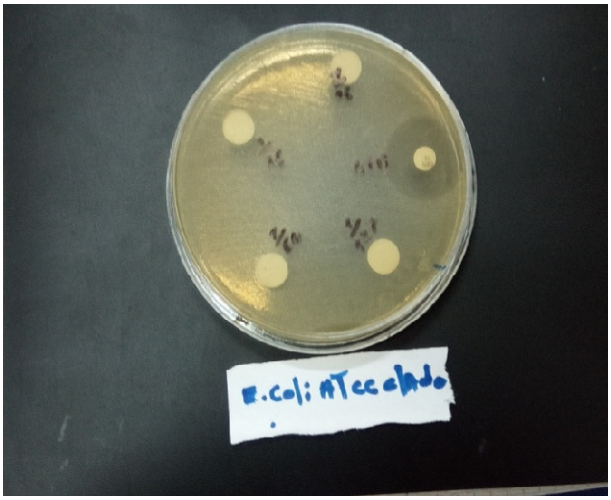
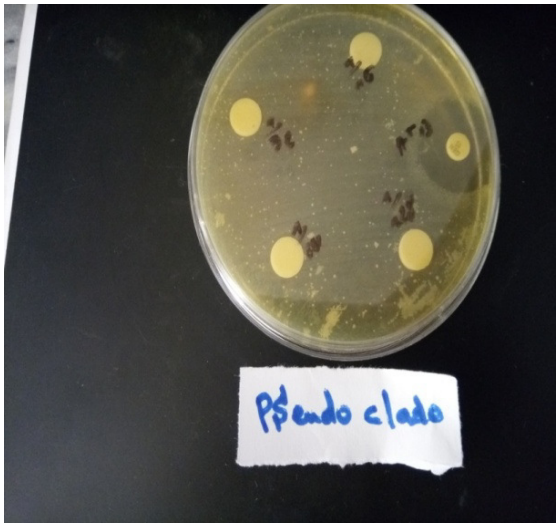



Fig 4 : Evaluation de la concentration minimale inhibitrice inhibitrice CMI d'*E cladocalyx* par méthode d'antibiogramme

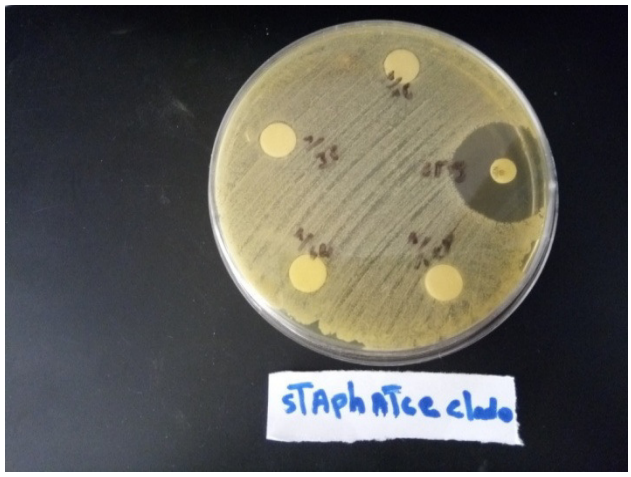




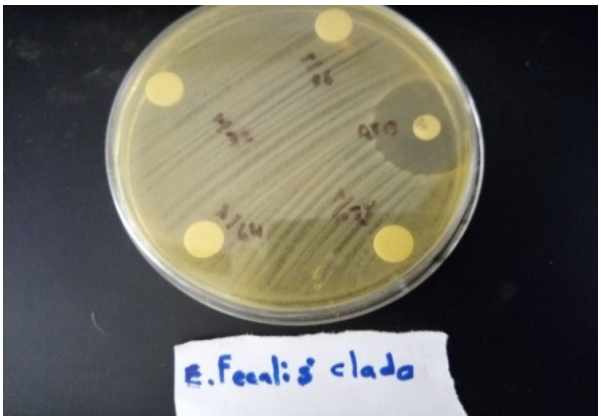
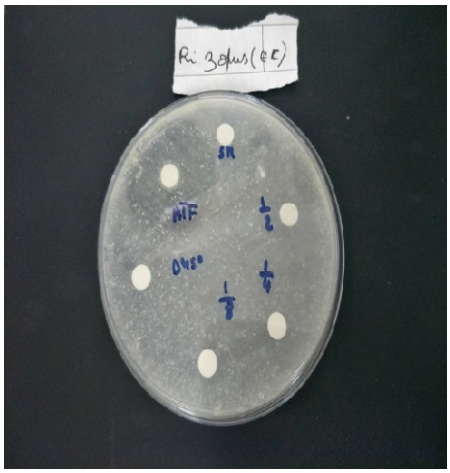




Fig 5 : Evaluation de l'activité antifongique d'*E.blakelyi* par la méthode d'antibiogramme

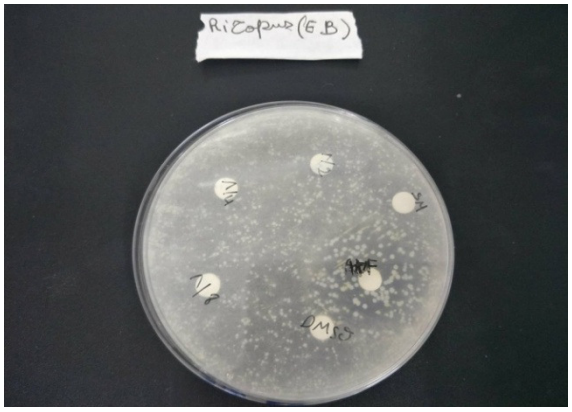



*Candida albicans ATCC*

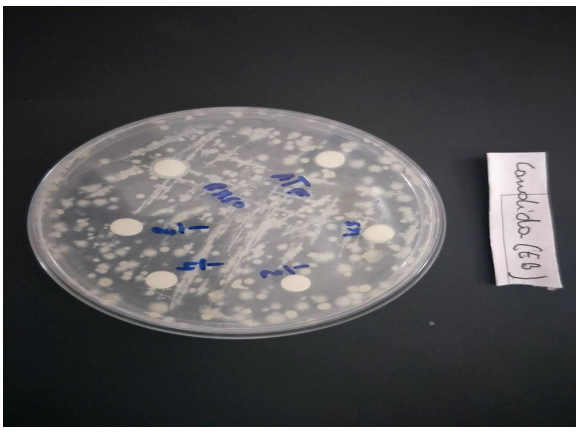



*Rhizopus sp*

Fig 6 : Evaluation de l'activité antifongique d'*E.blakely par la méthode d'antibiogramme*



Candida albicans



Rhizopus sp

# Annexe 5

| **concentration (vitamine c)** | 16000µg.ml-1 | 16µg.ml-1 | 8µg.ml-1 | 4µg.ml-1 | 2µg.ml-1 | 1µg.ml-1 | 0.5µg.ml-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Absorbance** | 0.03 | 0.313 | 0.395 | 0.535 | 0.62 | 0.75 | 0.89 |

Tableau 7 : absorbance à 517 nm

| **concentration *E.blakelyi.L*** | SM µg.ml-1 | 1000µg.ml-1 | 800µg.ml-1 | 600µg.ml-1 | 400µg.ml-1 | 200µg.ml-1 | 100µg.ml-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **absorbance** | 0.17<br>0.27<br>0.27 | 0.34<br>0.58<br>0.58 | 0.49<br>0.52<br>0.56 | 0.56<br>0.56<br>0.68 | 0.70<br>0.77<br>0.70 | 0.75<br>0.78<br>0.72 | 0.89<br>0.92<br>0.92 |
| **Moyenne** | 0.230,047 | 0.5<br>0,113 | 0.52<br>0,028 | 0.6<br>0,056 | 0.72<br>0,032 | 0.75<br>0,0141 | 0.91<br>0,0141 |

Tableau 8: absorbance à 517 nm

| **concentration *E.cladocalyx.L*** | 100 µg.ml-1 | 200µg.ml-1 | 400µg.ml-1 | 600µg.ml-1 | 800µg.ml-1 | 1000µg.ml-1 | SM µg.ml-1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **absorbance** | 0.58<br>0.54<br>0.47 | 0.6<br>0.56<br>0.67 | 0.65<br>0.63<br>0.64 | 0.75<br>0.74<br>0.72 | 0.92<br>0.91<br>0.90 | 0.96<br>0.94<br>0.95 | 0.97<br>0.99<br>97 |
| **Moyenne** | 0.53 | 0.61 | 0.64 | 0.73 | 0.91 | 0.95 | 0.98 |

Tableau 9 : absorbance à 517 nm

# Annexe 6

**Gélose Héktoen** (en grammes par litre d'eau purifiée filtrée)

Peptone de viande .....12,0 ;

Extrait de levure .....……3,0 ;
Lactose.....12,0 ;

Sucrose .....12,0 ;
Salicine.....2,0 ;

Sels biliaires .....9,0 ;

Chlorure de sodium .....5,0 ;

Citrate ferrique d'ammonium .....1,5 ;

Thiosulfate de sodium .....5,0 ;

Fuchsine acide .....0,1 ;

Bleu de bromothymol .....0,065 ;

Gélose .....14,0.

pH 7.6 +/- 0,2 à 25º C.

**Gélose Nutritive**

Extrait de viande de bœuf……1g ;

Extrait de levure…….. 2g ;
Peptone…….5g ;

Chlorure de sodium……..…5g ;
Agar…….....15g.

PH= 7,2 à 7,4.

**Agar Mueller Hinton**

Eau distillée…….1000ml ;

Infusion de viande de bœuf…….02.0g ;

Hydrolysat de Caseine…….17.5g ;
Amidon…….1, 5g ;
Agar…….....10g.

pH= 7.4.

**Potatoes Dextrose Agar (PDA)**

Eau distillée……..……1000ml ;

Filtrat de pomme de terre…….200g ;
Glucose…….20g;
Agar……15g.

pH= 4.5.