

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

Université « Dr. Moulay Tahar » de Saida

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire présenté en vue de l'obtention
Du diplôme de Master en : **Biotechnologie**
Option : **Master Biotechnologies végétale**

Présenté Par :

- GUETAF Yacine
- BOUANANI Amine

Thème :

**VALORISATION BIOLOGIQUE *IN-VITRO* DES HUILES
ESSENTIEL D'*EUCALYPTUS GLOBULUS***

Soutenu devant le jury composé de :

Président :	CHIKHI A.	MAA	Université de Saida
Examineur :	BENABDESLEM Y.	MCB	Université de Saida
Promoteur :	HACHEM K.	MCA	Université de Saida

2018-2019

Remerciements

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

*Je voudrais commencer par remercier très chaleureusement mon encadrant de fin de travail, **Mr HACHEM Kada**, pour son aide, et sa disponibilité. Ses conseils avisés ont toujours été très constructifs et m'ont permis de toujours bien avancer dans le projet, je tiens à lui remercier pour la confiance qu'il m'a accordée ce qui m'a permis de pleinement m'épanouir au sein du laboratoire et de développer mes recherches sereinement de façon encadrée mais autonome.*

*Je remercie très sincèrement **Melle CHIKHI A**, ingénieur à l'université Dr Moulay Taher Saïda, d'avoir accepté de présider le jury, **Melle BENABDESLAM Y**, maitres de conférences à l'université Dr Moulay Taher Saïda, d'avoir l'amabilité d'accepter d'examiner mon travail.*

*J'exprime ma reconnaissance envers **Mr BENKADDOUR N**, **Melle AMARI A**, **Melle BELAKREDAR A**, ingénieurs à l'université Dr Moulay Taher Saïda, **Mr BOUDDOU F**, **Melle HELALI C**, de m'avoir aidé a réalisé ce projet.*

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

Merci à tous !

Dédicaces

*Je voudrais dédier et remercier **Mes Parent**, mes frères et sœurs qui m'ont toujours encouragé et soutenu dès le début de réalisation de mon travail. L'achèvement de cette étude n'aurait pas été possible sans leur amour inconditionnel, leur soutien et leur patience.*

Que Dieu vous garde pour moi !

Sommaire

Remerciements.....	2
Dédicaces.....	3
Liste des tableaux.....	6
Liste des figures.....	7
Liste des photos.....	8
Liste des abréviations.....	9
Résumé.....	11
Introduction.....	12
Objectif.....	12
Chapitre I : Eucalyptus Globulus.....	15
I.1 Historique.....	15
I. 2 Étymologie.....	15
I. 3 Origine d'Eucalyptus.....	15
I. 4 Les noms vernaculaires.....	15
I. 5 Le Nom commun.....	16
I. 6 Répartition géographique des eucalyptus en Algérie.....	16
II. Classification dans la systématique botanique.....	17
III. Description du l'Eucalyptus globulus.....	17
IV. Caractéristiques morphologiques.....	19
V. Mode de reproduction.....	24
VI. Intérêt et utilisation.....	25
VII. Ennemis et maladies des Eucalyptus.....	26
VIII. Les plantations forestières de l'Eucalyptus dans le monde.....	26
Chapitre II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction.....	29
I. Généralité.....	29
II. Historique des huiles essentielles.....	29
III. Chronologie historique des huiles essentielles.....	29
IV. Définition des Huiles essentielles.....	30
V. Répartition et localisation des huiles essentielles.....	30
VI. Classification des huiles essentielles.....	31
VII. Les pays producteurs des huiles essentielles.....	31
VIII. Techniques d'extraction des huiles essentielles.....	32
VIII. 1 Les techniques conventionnelles.....	32
VIII. 2 Les techniques nouvelles ou innovantes.....	34

IX.	Composition chimique des huiles essentielles	35
IX.1	Groupe des terpénoïdes	35
IX.2	Groupe des composés aromatiques	35
IX.3	Composés d'origines diverses.....	36
X.	Huile essentielle d' <i>Eucalyptus Globulus</i>	36
XI.	Composition chimique des Huiles essentielles d' <i>Eucalyptus</i>	36
XII.	Propriétés médicinales	37
XIII.	Utilisation des huiles essentielles d' <i>Eucalyptus globulus</i>	38
XIII.1	Utilisation interne	38
XIII.2	Utilisation externe	38
XIV.	Activités biologiques des huiles essentielles d' <i>E. globulus</i>	39
XIV. 1	Activité antibactérienne et antifotngique	39
Chapitre III : Matériels et méthodes.....		42
I.	Matériel biologique utilisé.....	42
II.	Etude de l'activité antibactérienne de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i>	45
II.1	Préparation des dilutions par DMSO	45
II.2	Préparation de la suspension bactérienne.....	46
III.	Méthode de diffusion sur le milieu gélose	47
III.1	Ensemencement	48
IV.	Préparation des disques	48
V.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide	50
V.1	Activité antibactérienne	50
V.2	Activité antifongique	51
VI.	Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF).....	52
VI.1	Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)	52
VI.2	Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF).....	52
Chapitre IV : Résultats et discussion.....		54
I.	Résultats de l'extraction de l'huile essentielle	54
II.	Comparaison de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle avec celle des antibiotiques	59
III.	L'effet de l'huile essentiel sur les souches fongiques.....	60
IV.	Evaluation de l'activité antimicrobienne	63
Chapitre V : Discussion générale		66
I.	Discussion	66
Conclusion		70
Liste des références.....		71

Liste des tableaux

Tableau 1 : La répartition géographique de l'Eucalyptus globulus en Algérie	16
Tableau 2 : Classification de l'Eucalyptus Globulus	17
Tableau 3 : Produits préparés à base des huiles essentielles d'E. globulus	36
Tableau 4 : Principaux composés des HEs de E. globulus	37
Tableau 5 : Origine et caractéristique du matériel végétal.....	43
Tableau 6 : Souches utilisées.....	45
Tableau 7 : Les concentrations de l'HE utilisée.....	46
Tableau 8 : les composants majoritaires de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus	55
Tableau 9 : Les diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle sur les bactéries	56
Tableau 10 : Les diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielles sur les souches fongiques....	60

Liste des figures

Figure 1 : les parties aériennes de l'Eucalyptus Globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019).....	19
Figure 2 : Histogramme de la plantation du l'Eucalyptus (statistics from FAO, FRA 2010)	27
Figure 3 : Répartition du l'Eucalyptus cultivé dans le monde (FAO Map 2008)	27
Figure 4 : Schéma1 du dispositif d'hydrodistillation (Penchev, 2010).....	32
Figure 5 : Schéma de l'appareil d'entraînement à la vapeur d'eau (Bousbia,2011)	33
Figure 6 : Extraction des huiles essentielles par microondes	34
Figure 7 : la zone de la forêt d'el Ogbane (vieux Saïda), Saïda Algérie	42
Figure 8 : Hydrodistillation type Cleavenger.....	44
Figure 9 : Préparation de la suspension bactérienne	47
Figure 10 : Préparation des disques.....	49
Figure 11 : Les zones d'inhibition de L'HE sur S.a, Pseudomonas aerugina , E.coli et Klebsiella pneumoniae.....	58
Figure 12 : La sensibilité et la résistance des souches Staphylococcus aureus, Pseudomonas aerugina, E.coli et Klebsiella pneumoniae aux antibiotiques k, kz, cas, et lev.....	59
Figure 13 : Les zones d'inhibition de L'HE sur. Candida albicans ATCC 26790, Candida albicans (IPP444) et Candida albicans ATCC 10231	62
Figure 14 : Les résultats des CMI et des CMB de l'huile essentielle Eucalyptus globulus vis-à-vis des souches bactériennes	63
Figure 15 : Résultats des CMI et des CMF des huiles Eucalyptus globulus, vis-à-vis de trois souches fongiques.....	64

Liste des photos

Photo 1 : Accumulation de feuilles mortes au pied de l'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)	19
Photo 2 : L'écorce d'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)	20
Photo 3 : les feuilles juvéniles de l'Eucalyptus globulus à la Station de Saida 2019 (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)	21
Photo 4 : les feuilles adultes de l'Eucalyptus globulus à la Station de Saida 2019(Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)	21
Photo 5 : La fleur de l'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019).....	22
Photo 6 : Les Fruits et les graines de l'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019).....	23
Photo 7 : Les racines de l'Eucalyptus globulus. (Google image).....	24
Photo 8: Spectrophotomètre.....	46

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
AFNOR	L'Association Française de Normalisation.
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
APG	Angiospères Phylogeny Group.
E	Eucalyptus
E.g	<i>Eucalyptus globulus</i>
HEs	Huile essentiel.
M	Metres.
n	Nombre de chromosome.
°C	Degre celsius
Tc	Temperature
Pc	Pression
%	Pourcentage
mg	Milligramme
Kg	Kilogramme
g	Gramme
ml	Millilitre
μl	Microlitre
L	Litre
TR	Temps de rétention
GN	Gélose nutritif
UFC	Unité formant colonie
mm	Millimètre

MH	Muller-Hinton
pH	Potentiel hydrogène
S.a / B1	<i>Staphylococcus aureus</i>
P.a / B2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
E. Coli / B4	<i>Escherichia coli</i>
K.p / B7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice.
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMF	Concentrations minimales fongicides
BS	Bouillon Sabouraud
CPG/MS	Chromatographie en phase gazeuse /Spectrométrie de masse
DMSO	Diméthylsulfoxyde
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
D.O	Densité optique
RPMI	Roswell Park Memorial Institut

الملخص

الزيوت الأساسية معروفة باستعمالاتها في صناعات مستحضرات التجميل، الصيدلانية والغذائية. الهدف من هذا العمل هو دراسة التركيبة الكيميائية للزيوت الأساسية المستخرجة من اوراق الأوكالبتوس الكروي المتواجدة في منطقة سعيدة عن طريق كروماتوغرافيا الغاز الى جانب مطيافية الكتلة وتقييم نشاطها المضاد للبكتيريا. مع مردود من 0,43%، 97 مركب تم تحديده مع غالبية ثلاثة مركبات (Cymene, Spathulenol, Eucalyptole). كشف التحليل أيضًا عن فعالية كبيرة مضادة للميكروبات.

الكلمات الأساسية: الأوكالبتوس الكروي، الزيوت الأساسية، التوصيف الكيميائي، نشاط مضادات الميكروبات.

Résumé

Les huiles essentielles sont connues pour leur utilisation dans les industries cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires. L'objectif de ce travail est d'étudier la composition chimique des huiles essentielles de feuilles d'Eucalyptus globulus de la région de Saida par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) et d'évaluer leur activité antimicrobienne. Avec un rendement de 0,43 %, 97 composés étaient identifiés avec la prédominance de trois composants : Cymene, Spathulenol, Eucalyptole. L'analyse révèle aussi un pouvoir antimicrobien important.

Mots clés : Eucalyptus globulus, huile essentielle, caractérisation chimique, activité antimicrobienne.

Abstract

Essential oils are known for their use in the cosmetic, pharmaceutical and food industries. The objective of this work is to study the chemical composition of essential oils of Eucalyptus globulus of the Saida region by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS) and to evaluate their antimicrobial activity. With a yield of 0.43%, 97 compounds were identified with the predominance of three components: Cymene, Spathulenol, Eucalyptole. The analysis also reveals significant antimicrobial potency.

Key words: Eucalyptus globulus, essential oil, chemical characterization, antimicrobial activity.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Introduction

Objectif

Notre objectif consiste à l'évaluation de quelques activités biologiques des huiles essentielles de la plante *Eucalyptus globulus*. Nous avons évalué les activités biologiques suivantes :

Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide et les concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF) vis-à-vis quatre souches bactériennes ainsi que trois souches fongiques de références.

De très nombreuses Myrtacées ont été introduites en Algérie comme arbres d'ornement ou reboisement. Tel est le cas en particulier pour les *Eucalyptus* (Quézel et Santa, 1963). Le genre *Eucalyptus* en regroupe au moins 600 disséminées un peu partout dans le monde (Hurtel, 2001).

Le genre *Eucalyptus* est vaste, de l'arbuste au très grand arbre 55m environ pour *E globulus* (sont parmi les plus grands arbres du monde c'est le cas de l'*Eucalyptus régna* atteint 100 mètres ! Il atteint des records à 130 m dans son aire d'origine).

Les *eucalyptus* composent 95% des forêts australiennes (Mariani et al, 1981), ils sont indissociables de l'image de ce pays continent. Ce sont des arbres très adaptables, de croissance souvent rapide, qui présentent une grande diversité au niveau de la taille adulte, de la couleur de l'écorce, de la couleur des fleurs, de la forme et de la couleur des feuilles, de la résistance aux basses températures.

Aussi appelé gommier, rapport à la gomme résineuse rouge qui s'écoule de ses blessures, L'*Eucalyptus* est un très bel arbre au tronc droit, lisse, grisâtre, qui porte des rameaux dressés. Sa croissance rapide, son odeur aromatique qui éloigne les insectes et son pouvoir absorbant de l'humidité l'ont fait introduire dans la région méditerranéenne pour assainir certaines étendues marécageuses.

Les *Eucalyptus* ont été introduits dans de nombreux pays, pour la production de bois ou pour assécher les sols. Les feuilles éloignent les insectes, d'où des plantations en Afrique pour diminuer la propagation de la malaria.

Il a été introduit en 1857 en Algérie pour drainer les terrains de régions touchées par la malaria (Treiner, 2000). En 1995, 80 espèces d'*Eucalyptus* ont été transférées dans un nouveau genre : *Corymbia*. D'autres genres ont été créés : *Symphiomirtus*, *Eudesmia*, *Monocalyptus*. La classification botanique est donc devenue beaucoup plus complexe et il est difficile de s'y retrouver. L'*Eucalyptus globulus* fournit un excellent bois pour la fabrication de papier, il est également valorisable en bois énergie. Les gommiers bleus sont aussi extrêmement intéressants pour leurs tanins,

INTRODUCTION

résines et huiles essentielles que renferment les feuilles, les tiges et mêmes l'écorce et qui ont des applications très importantes en médecine (Anonyme, 1953 ; Kajangwe et Mukarusine, 2001 ; Rodolfo, 2003 ; Bigendako, 2004).

C'est pourquoi nous choisissons à parler tout simplement D'Eucalyptus globulus pour décrire une plante qui a beaucoup de caractères. Dont cette espèce se trouve en Algérie du Nord, les mêmes conditions de milieu écologique qu'en Australie.

CHAPITRE I

Chapitre I : Eucalyptus Globulus

I.1 Historique

L'Eucalyptus, comme exotique, a déjà une longue histoire. C'est à partir de 1850 que les Eucalyptus ont été introduits par les Français en Algérie, avec l'Ecamal du lensis Dehn, comme espèce pionnière. Mais, la plantation massive de ces arbres a eu lieu, entre 1865 et 1963, au début. Les Eucalyptus ont été plantés à titre exceptionnel pour l'assèchement des marais (AbdelM in Mehani, 2006).

L'Eucalyptus globulus Labill. (Dunom de La billardier le voyageur français qui le découvrit en 1800 lors d'un voyage en Australie) est une espèce très cultivée, prit rapidement une grande extension en Algérie entre 1860 et 1870 (Boudy, 1952).

C'est vers les années 1960 et 1970 qu'ont commencé le reboisement à base d'Eucalyptus à l'Est du pays (EL-Kala, Annaba, Skikda) au centre (Tizi-Ouzou et Bai nem) et à l'Ouest (Mostaganem) dans le but de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et avec un capital d'environ 130 espèces. La plantation d'Eucalyptus a continué jusqu'en 1982 où il a été mis fin à la production des plantes en pépinière et par conséquent à leur plantation (Meziane, 1996 in Mehani, 2006).

I. 2 Étymologie

« Eu » est un préfixe d'origine grecque et signifiant « bien » et « Kalyptos » veut dire « couverture ». Le nom générique signifie donc : « bien couvert », car les pétales et sépales sont soudés.

I. 3 Origine d'Eucalyptus

- Australie où il compose 95% des forêts naturelles.
- Tasmanie.
- Malaisie.
- Iles Indonésiennes.

I. 4 Les noms vernaculaires

- Calitouss « le nom le plus connue en Algérie ».
- Calibtus, Kafor. Ces noms sont les plus populaires en Algérie qui sont appelés dans plusieurs différentes régions.

CHAPITRE I : *Eucalyptus globulus*

I. 5 Le Nom commun

- Gommier Bleu fait allusion à la gomme résineuse qu'ils exsudent quand ils sont blessés.
- Arbre à la fièvre dans les régions où ils sont plantés en prévention du paludisme. Bel arbre des Angiospermes, dicotylédones. *L'Eucalyptus globulus* appartient aux Myrtacées qui constituent la famille la plus importante de l'ordre des Myrtales. Elle est très ancienne et peut être suivie jusque dans le crétacé inférieur.

I. 6 Répartition géographique des 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). La répartition géographique de *L'Eucalyptus globulus* en Algérie est représentée sur le Tableau 1.

Wilaya	BLIDA	BOUMERDES	RELIZANE	S. BELABAS	SETIF
Nom local	Kafour	Kafour	Calatous	Ouerg el Kafour	Calatous
Superficie	41Ares	93HA 70Ares	1000 HA	342 HA	10 A

Tableau 1 : La répartition géographique de l'Eucalyptus globulus en Algérie

CHAPITRE I : Eucalyptus globulus

II. Classification dans la systématique botanique

D'après la classification scientifique APG (Angiospères Phylogeny Group) (Guignard, 2001), le gommier bleu appartient à (Tableau 2):

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotes
Sous –classe	Rosidés
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtacées
Genre	Eucalyptus
Espèce	Eucalyptus globulus

Tableau 2 : Classification de l'Eucalyptus Globulus

III. Description du l'Eucalyptus globulus

L'Eucalyptus est très varié, pour une même espèce les formes peuvent aller du buisson si les conditions édaphiques et climatiques sont défavorables, au peuplement forestier avec des arbres de hauteur de 30 à 50 mètres en conditions favorables. Certains individus peuvent atteindre 130 mètres de haut et ils constituent également les angiospermes les plus grands du monde. Certaines espèces existent également sous forme de « malle », terme australien qui désigne un arbre présentant plusieurs tiges partant d'un même lignotuber ou organe souterrain lignifié.

La croissance des Eucalyptus est continue car ils n'ont pas d'endormance contrairement à la plupart des espèces ligneuses. Ils sont opportunistes, c'est-à-dire que leur croissance dépend essentiellement de la température moyenne. Elle est maximale en condition favorable mais ralentie voire nulle en condition de stress abiotique tel que le froid ou la sécheresse. Par contre les Eucalyptus sont très réactifs après les stress. D'une part, les bourgeons végétatifs activés très rapidement après blessure donnent de nouvelles tiges. Dans le cas des incendies, la très forte température de l'incendie favorise la germination des graines enfouies dans le sol, permettant une reprise de végétation beaucoup plus rapide que la plupart des autres plantes. Cette réactivité explique la compétitivité des Eucalyptus pour

CHAPITRE I : Eucalyptus globulus

l'occupation de l'espace, en particulier après les incendies, qui ont toujours été très fréquents en Australie. On peut retenir la classification suivante par rapport à la taille adulte :

- Petits Eucalyptus si moins de 10 mètres.
- Moyens Eucalyptus entre 10 et 30 mètres.
- Grands Eucalyptus entre 30 et 60 mètres.
- Très grands Eucalyptus de plus de 100 mètres.

- Les Eucalyptus occupent une place très importante dans la ligniculture à l'échelle mondiale en raison de leur rapidité de croissance (plusieurs mètres par an) et de la qualité de leur fibre (Melun et Nguyen, 2012). Les Eucalyptus ont des capacités de survie et de croissance exceptionnelles, ce qui leur permet de coloniser des terrains nus dévastés par les feux, les inondations, l'activité volcanique, grâce notamment aux graines petites et nombreuses.

- Arbre dont la longévité se situe entre 400 et 700 ans dans son aire naturelle et capable de vivre jusqu'à 150 ans lorsqu'il a été introduit.

- La plupart des Eucalyptus ont des feuilles persistantes. (Jacob, 1936) insiste sur la durée de vie de ces feuilles qu'il estime remarquablement courte comparée à celle des aiguilles de pins ou de sapins qui peuvent rester actives pendant huit années. Comme les autres membres de la famille des myrtacées, les feuilles d'Eucalyptus sont couvertes de glandes à huile. L'abondante production d'huile est une caractéristique importante de ce genre.

- Une autre caractéristique des Eucalyptus réside dans le fait qu'aux divers stades du cycle de développement, les feuilles ont des formes différentes. (Penfold et Willis 1961) notent cinq types morphologiques :

- Feuilles cotylédonées.
- Feuilles de pépinières (5 à 10 paires).
- Feuilles juvéniles.
- Feuilles intermédiaires.
- Feuilles adultes.

Il semble que l'accumulation de feuilles mortes au pied des arbres soit toxique à toute autre forme de végétation, mais cela serait aussi le résultat d'un assèchement de la surface du sol autour de ces grands arbres gros consommateurs d'eau.



Photo 1 : Accumulation de feuilles mortes au pied de l'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)

IV. Caractéristiques morphologiques

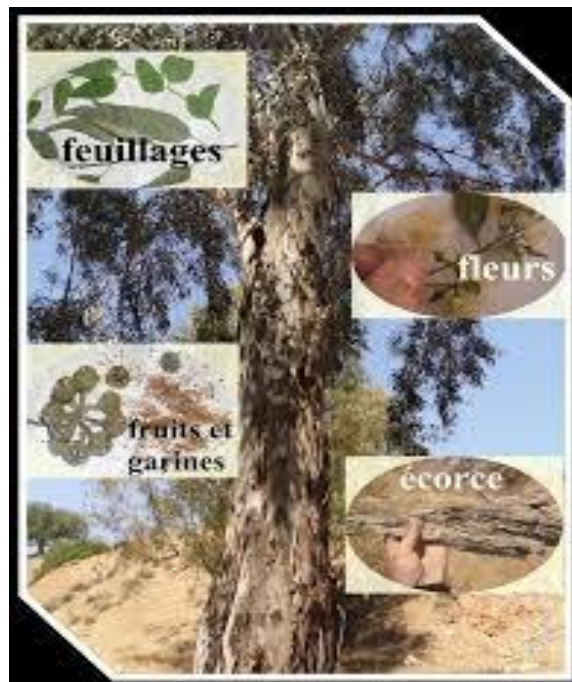


Figure 1 : les parties aériennes de l'Eucalyptus Globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)

CHAPITRE I : *Eucalyptus globulus*

- **L'écorce**

L'écorce est de couleur et de texture variable selon les espèces. Souvent elle présente plusieurs couleurs, comme un platane, et se détache en lambeaux qui tombent au sol, mais l'écorce peut être aussi dure, fibreuse, floconneuse, lisse (Photo 2).



**Un exemple d'écorce lisse
Qui se détache par lambeaux.**

Un exemple d'écorce fibreuse.

Photo 2 : L'écorce d'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)

- **Feuillage**

Les *Eucalyptus globulus* ont en majorité des feuilles persistantes et falciformes, couvertes de glandes à huile, dont le parfum caractéristique se répand après une pluie. La plupart des espèces ont la particularité d'avoir deux formes de feuilles selon leur âge : sur l'arbre jeune elles sont ovales, glauques à bleutées et opposées sur la tige, puis elles deviennent alternes, allongées, plutôt vertes sur l'arbre adulte. Certaines espèces gardent toute leur vie les mêmes feuilles, d'autres gardent longtemps les feuilles juvéniles. (Photo 3 et 4).

CHAPITRE I : Eucalyptus globulus



Photo 3 : les feuilles juvéniles de l'Eucalyptus globulus à la Station de Saida 2019 (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)



Photo 4 : les feuilles adultes de l'Eucalyptus globulus à la Station de Saida 2019 (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)

CHAPITRE I : *Eucalyptus globulus*

Autre caractéristique des feuilles d'*Eucalyptus globulus*, elles sont souvent positionnées à la verticale par rapport aux rayons du soleil. C'est une adaptation pour permettre la photosynthèse sur les deux faces, et pour limiter l'évapotranspiration, Carles feuilles possèdent une couche de cellules palissadiques sur chacune de leurs faces ces cellules palissadiques contiennent les chloroplastes permettent la photosynthèse et les stomates sont également présents sur chaque face des feuilles.

- **Les fleurs**

Elles ont de très nombreuses étamines a de couleur blanche. Au départ, 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.

Pour un même sujet, les opercules peuvent avoir différentes formes. Lorsque les étamines grandissent, elles soulèvent l'opercule et s'étalent pour former la fleur. La floraison peut survenir à différentes périodes de l'année, selon le climat. La pollinisation des fleurs se fait principalement par les insectes, attirés par le nectar. Les fleurs d'Eucalyptus constituent la source de nectar la plus abondante pour la production de miel en Australie. (Photo 5)



Photo 5 : La fleur de l'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)

CHAPITRE I : *Eucalyptus globulus*

- **Fruits et Graine**

Les fruits d'*Eucalyptus globulus* sont formés par le développement du réceptacle ainsi que de l'ovaire qui s'y attache. Ils contiennent un nombre important d'ovules. Une partie de ces ovules seront fécondés par des grains de pollen distincts, lors de la pollinisation, mais ils ne le seront jamais en totalité. Après la fécondation, les graines vont se développer et faire grossir le fruit.

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. La plupart des espèces ne fleurissent pas avant l'apparition du feuillage adulte, sauf pour *Eucalyptus cinerea* et *Eucalyptus perriniana*. Un nombre élevé de semences de petites tailles, procure à l'*Eucalyptus* une importante aptitude à coloniser des terrains dénudés, même si les conditions y sont difficiles. Un nombre important des graines va mourir suite à ces conditions, mais quelques-unes vont survivre et perpétuer l'espèce. (Photo 6).



Photo 6 : Les Fruits et les graines de l'Eucalyptus globulus (Prise par Mr Bouanani et Mr Guetaf en 2019)

CHAPITRE I : *Eucalyptus globulus*

• Racines

Le système racinaire comprend deux parties :

- Un pivot central important s'enfonçant jusqu'à 2,20 m et mesurant, à 80 cm de profondeur, 35 cm de diamètre. A partir de ce niveau, il se divise en 6 grosses racines ayant de 6 à 12 cm de diamètre chacune, descendant parallèlement. (Giordan 1968) signale, en sols sableux, et dans le cas d'*E. globulus* des pivots atteignant 4 m de profondeur.
- Une grande concentration de racines à la base du tronc d'où partent 8 racines latérales. Dans les 40 premiers centimètres du sol, se trouve un réseau latéral dense avec un maximum de racines en surface. Certaines atteignent plus de 3 m de longueur ; il y a de véritables enchevêtrements avec celles des arbres voisins, mais aucune greffe n'a été constatée. (Bisset et Shaw (1964) ou Jacob (1955)).

La plupart des *Eucalyptus* possède également des organes protecteurs souterrains appelés lignotubers. Cet organe est un renflement des racines qui contient des réserves nutritives comme l'amidon. Cette plante indigène de l'Australie a évolué dans un environnement difficile et aride. Les lignotubers permettent à l'*Eucalyptus* d'engendrer de nouvelles pousses si une perturbation majeure détruit (feu ou de gel par exemple), en partie ou en totalité, les parties aériennes de l'arbre. Les lignotubers favorisent donc la survie des espèces d'*Eucalyptus* qui possèdent cette adaptation. (Photo 7).



Photo 7 : Les racines de l'Eucalyptus globulus. (Google image)

V. Mode de reproduction

L'inflorescence des *Eucalyptus globulus* est en général sous forme d'ombelles. La majorité des espèces d'*Eucalyptus* présentent un nombre de chromosome de $2n = 22$.

CHAPITRE I : *Eucalyptus globulus*

Les fleurs sont hermaphrodites, les organes mâles et femelles se trouvent dans la même fleur. L'âge de maturité oscille selon les espèces de 3 à 10 ans, mais un décalage de floraison existe entre les différentes unités génétiques (individus, provenances, espèces).

La pollinisation est principalement entomophile ou réalisée par les oiseaux pour les espèces à grandes fleurs (Hopper et Moran, 1981), ce qui favorise dans ce dernier cas l'hybridation interspécifique. La distance de dispersion du pollen est généralement inférieure à 100 mètres (Eldridge et al. 1993).

VI. Intérêt et utilisation

On utilise les feuilles en infusion, en inhalation, fumigation et sous forme de cigarettes (Sijelmassi, 1991). *L'Eucalyptus globulus* est un antiseptique et un antispasmodique des voies respiratoires (Sijelmassi, 1991), sédatif, hypoglycémiant, antirhumatismal, stimulant et vermifuge. On l'utilise donc pour soigner les maladies de refroidissement, le diabète, les douleurs rhumatismales, certaines affections des voies urinaires, les migraines, les sinusites et les vers intestinaux (Perroti et al., 1999). L'extraction d'huile essentielle est réalisée à partir des feuilles et rameaux (Padrini et Lucheroni, 1996).

Les gommiers bleus revêtent une importance considérable à l'échelle de l'économie forestière mondiale (Lanier, 1986). Ils ont bien démontré une capacité de production assez supérieure à celle enregistrée en Australie (Métro, 1963). Des plantations de bios dur d'intensité très élevée ont été établies avec succès au Brésil, en Californie et bien ailleurs. Les gommiers bleus présentent, incontestablement, les plus importantes plantations de bios dur dans le monde (Turnbull, 1991). Doté d'une grande adaptabilité et d'une croissance rapide, le gommier bleu présente un large éventail d'utilisation. A Madagascar, la litière de feuilles d'*Eucalyptus globulus* décomposées, se récolte et se vend comme engrais de complément (Rakotavao, 1995). Ceci constitue une source de revenus non négligeable pour les femmes et les enfants (Bertrand, 1992) (27).

Du point de vue écologique, les gommiers bleus sont plantés le long des vergers dans les régions productrices de fruits. Leurs fleurs attirent les abeilles et la pollinisation est nettement améliorée. En plus, ceci favorise la production de miel de très bonne qualité. Au Soudan, les *Eucalyptus globulus* plantés pour protéger les récoltes contre les vents de sable. Cet arbre a servi l'humanité grâce aux puissantes émanations de ses feuilles et à sa capacité de pomper d'impressionnantes quantités d'eau. Assainissant de ce fait les marais, les sites de reproduction des insectes ont été fortement réduits.

On outre, cet arbre a été choisi pour répondre à plusieurs fins :

CHAPITRE I : *Eucalyptus globulus*

- Production destinée à l'industrie papetière en Algérie (Villagran et Kadic, 1981) et dans d'autres pays.
- Fourniture de la matière première à l'industrie du bois (Anonyme, 1986).
- Approvisionnement de chemin de fer (Bertrand et Le Roy, 1991) et approvisionnement énergétique en bois de feu et en charbon (Charries, 1980 et Bertrand, 1989) (31).

VII. Ennemis et maladies des *Eucalyptus*

L'*Eucalyptus* est très sensible aux ravageurs et aux maladies. Très nombreux sont les insectes et les microorganismes qui l'affectent. L'action des ravageurs est bien remarquable sur les jeunes peuplements. Tandis que le vieillissement des arbres favorise l'attaque de certains ravageurs qui à leur tour rendent le sujet plus vulnérable à l'agression d'autres parasites secondaires (Mazari, 1982).

- Pink-disease :

Corticium salmonicolor provoque un rapide dépérissement des *Eucalyptus* (Bourbouts, 1936). Les feuilles sont les premières atteintes, elles sèchent, meurent tout en restant attachées aux brindilles longtemps après leurs morts. Les brindilles elles-mêmes meurent progressivement. Le tronc est atteint, se couvrant de blessures et de chancres, puis l'arbre meurt.

- Pourriture du tronc :

Stereum hirsutum est un saprophyte commun reconnu comme agent d'une pourriture sèche du centre du tronc des *Eucalyptus* (Bottomley, 1937).

- Maladies des racines :

De graves dommages sont causés par *Ganoderma sessile* (Girola, 1922). L'infection est causée soit par le mycélium qui passe d'une racine atteinte à une racine saine, soit par des spores tombant sur des blessures ou lésions de racines nues.

VIII. Les plantations forestières de l'*Eucalyptus* dans le monde

Si elles ne représentent que 7% des surfaces des forêts avec 271 millions ha en 2010, les plantations forestières produisent 35% du marché du bois et la surface totale ne cesse de croître.

CHAPITRE I : Eucalyptus globulus

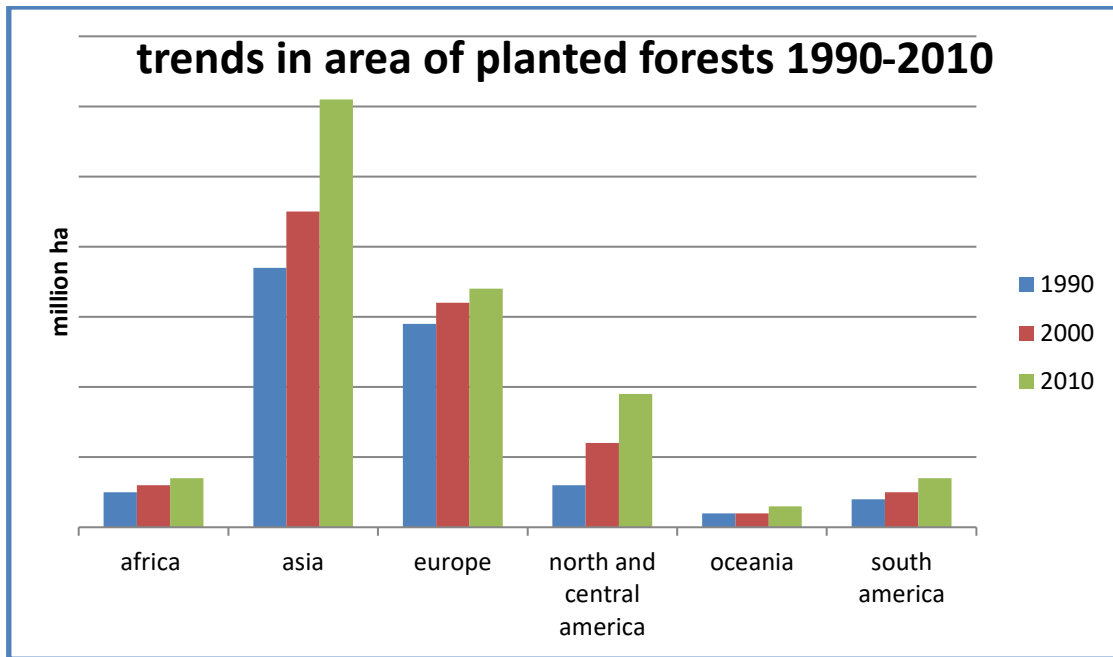


Figure 2 : Histogramme de la plantation de l'Eucalyptus (statistics from FAO, FRA 2010)

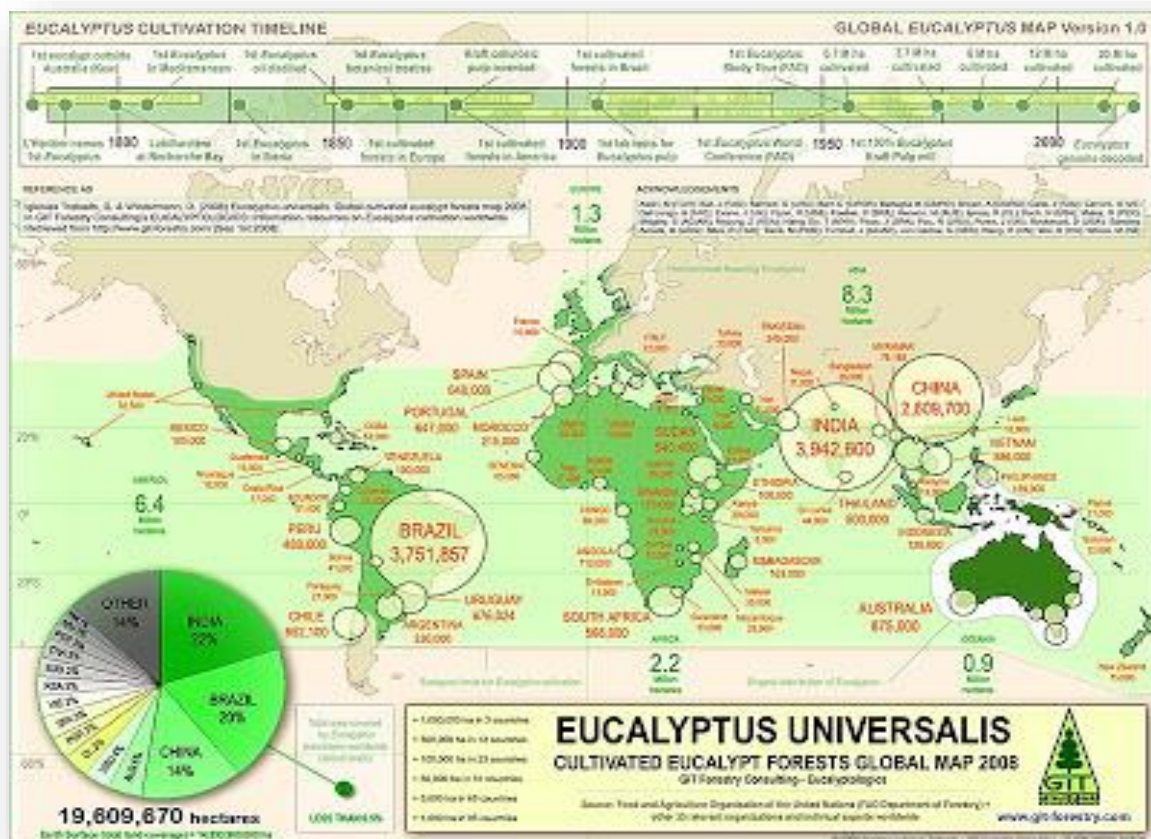


Figure 3 : Répartition de l'Eucalyptus cultivé dans le monde (FAO Map 2008)

CHAPITRE II

Chapitre II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

I. Généralité

L'huile essentielle, essence ou également appelé huile volatile, est l'ensemble d'extraits volatils de composition complexe obtenu des plantes aromatiques. D'après l'Association Française de Normalisation (AFNOR, Edition 2000), a défini les huiles essentielles comme étant : des produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par distillation à l'eau ou à la vapeur d'eau, soit à partir des fruits de Citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques.

Les huiles essentielles sont composées par des molécules aromatiques présentant une très grande diversité de structure. Cependant ces huiles essentielles sont obtenues avec des rendements très faibles (de l'ordre de 1%) ce qui en fait des substances fragiles, rares, mais toujours précieuses. Ainsi les différentes techniques d'extraction des huiles essentielles ou extraits aromatiques doivent d'une part, tenir compte de ces caractéristiques et d'autre part, apporter des performances quantitatives satisfaisant une forte demande toujours plus exigeante.

Basée sur différents phénomènes physiques : la distillation, l'extraction ou la séparation, ces techniques d'extraction seront présentées selon le principe sur lequel elles sont basées, et classées en deux catégories distinctes selon le produit final obtenu : une huile essentielle ou un extrait aromatique.

II. Historique des huiles essentielles

L'histoire des huiles essentielles est aussi vieille que l'histoire de la civilisation. Les huiles essentielles ont été dans la pratique, dans presque toutes les civilisations anciennes connues à la race humaine. (JESSICA.2010) (39).

III. Chronologie historique des huiles essentielles

L'histoire des huiles essentielles remonte à 4000 avant JC, que les huiles essentielles et « Aromathérapie » sont assez moderne (inventé seulement au cours du XXe siècle). Les Egyptiens, Grecs, Romains, les Perses, les Chinois et les Indiens étaient connus pour avoir pratiqué l'aromathérapie avec des huiles essentielles dans leurs médicaments pendant des siècles. (Kesbi,2011).

IV. Définition des Huiles essentielles

Les huiles essentielles (essences : huiles volatiles) sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation (Brunton, 1993). Les huiles essentielles sont par définition des métabolites secondaires produits par les plantes comme moyen de défense contre les ravageurs phytophages (Cseke et Kaufman 1999).

Selon (Smallfield, 2001) les huiles essentielles sont des mélanges de composés aromatiques des plantes, qui sont extraites par distillation par la vapeur ou des solvants. Selon (Parini et Lucheron, 1996) les huiles essentielles, appelées aussi essences, sont des mélanges de substances aromatiques produites par de nombreuses plantes et présentes sous forme de minuscules gouttelettes dans les feuilles, la peau des fruits, la résine, les branches, les bois, elles sont présentes en petites quantités par rapport à la masse du végétal. Elles sont odorantes et très volatiles (Brunton, 1993).

Selon (la 8eme éditions de la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (essences = huiles volatiles) sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation. (Bruneton J.1993) Elles sont très sensibles à l'oxydation et ont également tendance à se polymériser pour former des produits résineux.

Selon l'AFNOR, une huile essentielle est un produit obtenu à partir d'une matière végétale définie botaniquement après séparation de la phase aqueuse par des procédés physiques : soit par un entrainement à la vapeur d'eau, soit par un procédé mécanique à partir de l'épicerpe pour les citrus, soit par distillation sèche. Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et perdent rapidement leurs propriétés, lorsqu'elles sont exposées au soleil, ou lumière, ou à leur chaleur, elles absorbent de grande quantité d'oxygène à l'air en se résinifiant, en même temps leur odeur se modifie, leur point d'ébullition augmente et leur solubilité diminue. Elles doivent être conservées dans des flacons en verre coloré bien fermés, à l'abri de l'air, de la lumière pour une meilleure protection (Bruneton.1993 ; CHARPENTIER.1998 ; BENKADA.1990).

V. Répartition et localisation des huiles essentielles

Parmi les espèces végétales 800.000 à 1.500.000 selon les botanistes, 10 % seulement sont dites aromatiques. Les huiles essentielles n'existent quasiment que chez les végétaux supérieurs, elles sont presque exclusivement de l'embranchement des Spermaphytes, les genres qui sont capables de les

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

élaborer sont rassemblés dans un nombre restreint de familles comme les : *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Asteraceae*, *Rutaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae*, *Cupressaceae*, *Piperaceae* (Bruneton, 1999).

La synthèse et l'accumulation d'une huile essentielle sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface du végétal (Bruneton, 1987). Il existe en fait quatre structures sécrétrices :

- Les cellules sécrétrices : Chez les Lauracées et les Zingibéracées.
- Les poils glandulaires épidermiques : Chez les Lamiacées, Géraniacées, etc.
- Les poches sphériques schizogènes : Les glandes de type poche se rencontrent chez les familles des : Astéracées, Rosacées, Rutacées, Myrtacées, etc.

Les canaux glandulaires lysisigènes : On les retrouve chez les Conifères, Ombellifères, etc. Sur le site de stockage, les gouttelettes d'huile essentielle sont entourées de membranes spéciales constituées d'esters d'acides gras hydroxylés hautement polymérisés, associés à des groupements peroxydes (Bruneton, 1993).

Les teneurs en huiles essentielles sont généralement très faibles, il faut parfois plusieurs tonnes de plantes pour obtenir un litre d'huile essentielle. A l'exception de celle du bouton florale du giroflier où le rendement en huile essentielle atteint largement les 15 % (Makhloof, 2002).

VI. Classification des huiles essentielles

Selon le pouvoir spécifique sur les germes microbiens, et grâce à l'indice aromatique obtenu par des aromatogrammes, les huiles essentielles sont classées en groupe :

- Les huiles majeures.
- Les huiles médiums.
- Les huiles terrains. (CHACOU M.et BASSOU K.2012).

VII. Les pays producteurs des huiles essentielles

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

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

L'huile essentielle de *E. globulus* est également utilisée en médecine, en soins dentaires, pour les produits désinfectants (Garnero, 2002). L'utilisation pharmaceutiques des huiles essentielles de cette plante exige une teneur approximative de 70% en 1,8 cineole (Pereira et al. 2004).

VIII. Techniques d'extraction des huiles essentielles

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

VIII. 1 Les techniques conventionnelles

VIII.1. 1 L'hydrodistillation

Au cours de l'hydrodistillation, le matériel végétal est immergé dans l'eau, le mélange hétérogène est bouilli, et l'huile essentielle est volatilisée puis condensée. Etant donné l'insolubilisation dans l'eau de ses principaux composés volatils, l'HE peut être séparée par décantation après refroidissement dans un séparateur de phases. (Figure 5) (Penchev, 2010).

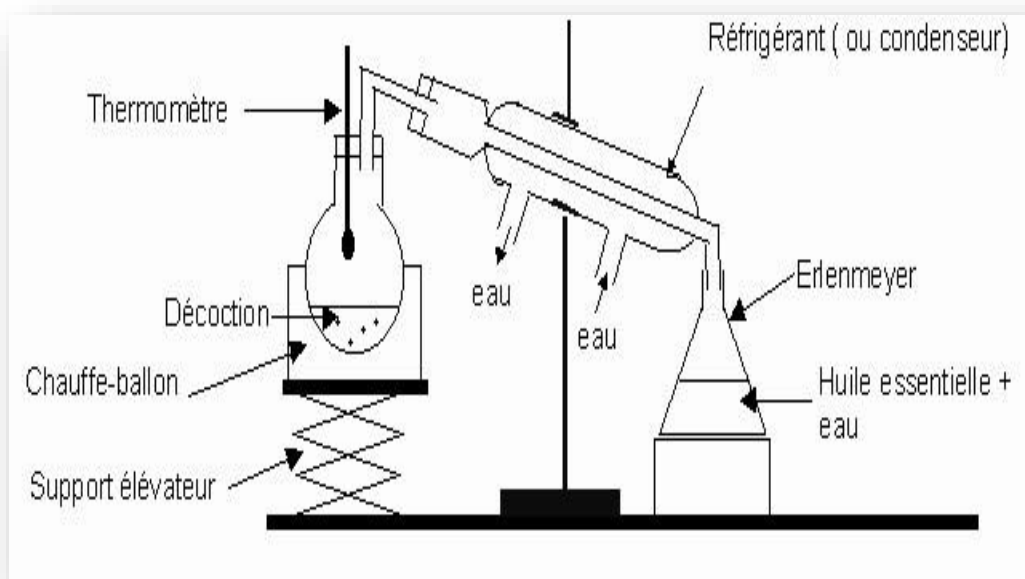


Figure 4 : Schéma1 du dispositif d'hydrodistillation (Penchev, 2010)

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

VIII.1. 2 L'entraînement par la vapeur d'eau

C'est la seule distillation préconisée par la Pharmacopée française, car elle minimise les altérations hydrolytiques (notamment des esters). Les plantes entières, ou broyées (lorsqu'il s'agit d'organes durs : racine, écorce), sont disposées dans un alambic traversé par un courant de vapeur d'eau produit par la chaudière. La vapeur d'eau injectée à travers la masse végétale, disposée sur des plaques perforées, entraîne l'huile essentielle. Elle se condense ensuite dans le serpentin du réfrigérant. A la sortie de l'alambic, le vase florentin (essencier) permet de séparer l'eau de l'huiles essentielles grâce à la différence de densité des deux liquides. (Figure5) (Da Silva,2010).

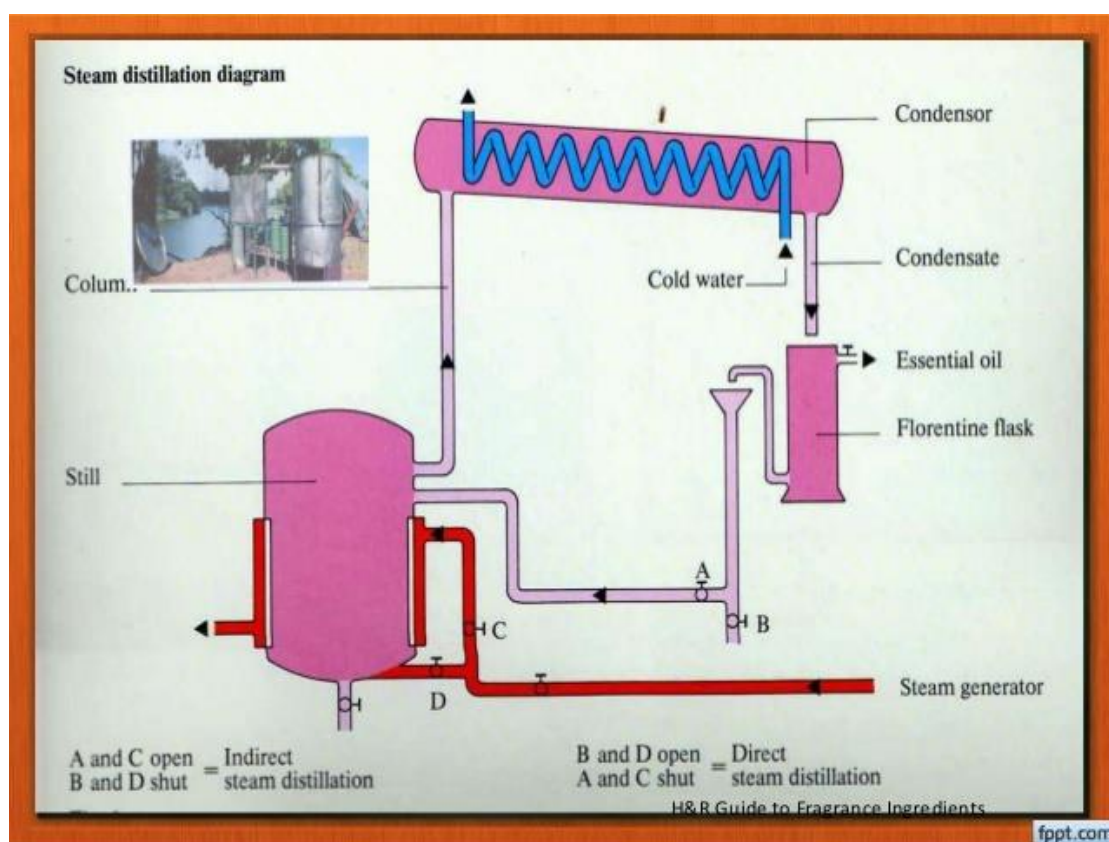


Figure 5 : Schéma de l'appareil d'entraînement à la vapeur d'eau (Bousbia,2011)

VIII.1. 3 L'hydrodiffusion (percolation)

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

VIII. 2 Les techniques nouvelles ou innovantes

VIII. 2. 1 L'extraction assistée par microondes

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

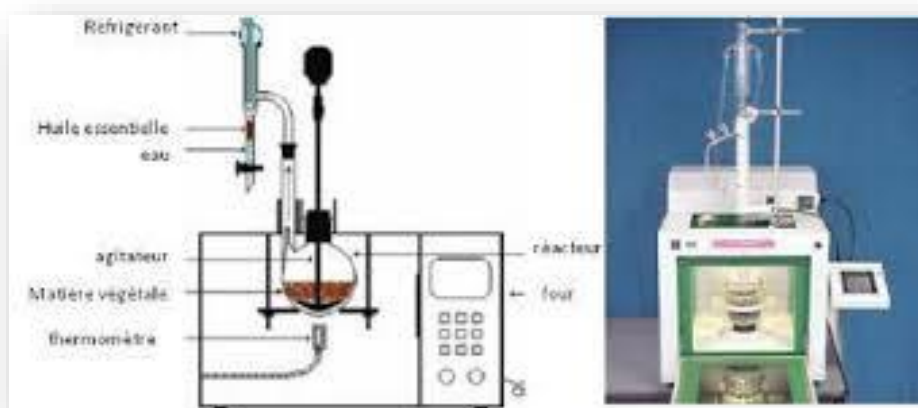


Figure 6 : Extraction des huiles essentielles par microondes

VIII. 2. 2 L'extraction accélérée par solvants

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

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

VIII. 2. 3 Extraction par des solvants supercritiques

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

IX. Composition chimique des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes et éminemment variables de constituants qui appartiennent, de façon quasi exclusive, à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : le groupe des terpénoïdes, d'une part, et le groupe des composés aromatiques dérivés du phénylpropane, beaucoup moins fréquent, d'autre part (Abdoul dorosso samate, 2002).

IX.1 Groupe des terpénoïdes

D'une manière générale, les huiles essentielles ne contiennent que les terpènes les plus volatils, c'est-à-dire ceux dont la masse moléculaire n'est pas trop élevée : mono-et sesquiterpènes. Ce sont des hydrocarbures ayant respectivement dix et quinze atomes de carbone.

Ils peuvent être saturés ou insaturés, acycliques, monocycliques, bicycliques ou polycycliques. Ils peuvent également être accompagnés de leurs dérivés oxygénés : alcools, esters, éthers, aldéhydes, cétones, etc.

IX.2 Groupe des composés aromatiques

De manière moins systématique que les terpénoïdes, une autre famille chimique est fréquemment rencontrée parmi les composés volatils. Il s'agit des dérivés du phénylpropane. Ce sont très souvent des allyle-et propénylphénols, parfois des aldéhydes, caractéristiques de certaines huiles essentielles d'Apiaceae (anis, fenouil, persil, etc. : anéthole, anisaldéhyde, apiole, méthylchavicol) mais aussi de celles de girofle, de la muscade, des cannelles, etc. (eugénol, myristicine, asarones, cinnamaldéhydes, ...)

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

IX.3 Composés d'origines diverses

De faibles quantités de composés acycliques non terpéniques et de poids moléculaires peu élevés peuvent se retrouver dans certaines huiles essentielles (alcools, aldéhydes, cétones, etc.) (Abdoul dorosso samate, 2002).

X. Huile essentielle d'*Eucalyptus Globulus*

L'huile essentielle d'*Eucalyptus Globulus* est connue pour son efficacité contre les affections respiratoires. Cette essence aromatique possède également d'innombrables vertus et s'avère efficace dans le maintien de la santé au quotidien.

XI. Composition chimique des Huiles essentielles d'*Eucalyptus*

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

- Partie distillée : la feuille, utilisée aux états unis dans la préparation de certains produits présentés dans le tableau 3

Concentration (%)	Savon	Détergents	Lotions/Crème	Parfum
Usuelles	0,3	0,005	0.002	0.1
Maximales	30,03	0.004	0.1	1.0

Tableau 3 : Produits préparés à base des huiles essentielles d'*E. globulus*

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

- L'huile essentielle de l'eucalyptus a obtenu le statut de Produit GRAS par la FEMA(1965), et approuvé par la FDA pour son utilisation alimentaire (Opdyke, 2002). Son aspect est liquide, limpide, presque incolore à jaune claire son odeur est caractéristique rappelant celle de l'eucalyptol (Buronso, 2008). Elle est utilisée comme agent de flaveur dans l'industrie alimentaire à une dose $\leq 5\text{mg/Kg}$ (Batish et al., 2008). Les principaux composés identifiés dans les huiles essentielles de la plante *E. globulus* sont montrés dans le Tableau 4.

Auteurs	Composition
(Jubril Olayinka et al., 2012)	Feuilles : monoterpenes oxygénés : 46,5 %, avec le terpinen-4-ol : 23,46% le constituant le plus abondant. Les autres composés sont γ -terpinene: 7,01 %, spathulenol: 8,94 %, p -cymene: 8,10 % et p -cymen-7-ol: 6,39 %. Globulol: 2,52 % et α -phellandrene: 2.20%.
(Damjanović-Vratnica, 2011)	Feuilles : 1,8 cineole: 85,8%, α -pinene: 7,2%, et β -myrcene: 1,5%, β -pinene, limonene, α -phellandrene, γ -terpinene, linalool, pinocarveol, terpinen-4-ol, et α -terpineol
(Song et al, 2009)	Feuilles : 1,8-eucalyptol : 72,71 %, α -pinene: 9,22%, α -terpineol: 2,54 %, globulol: 2,77 %, α -terpineol acetate: 3,11%, et alloaromadendrene: 2,47%.
(Tyagi et al, 2011)	Feuilles : 20 composés ont été identifiés : 44,5% monoterpenes-hydrocarbonés et 52% monoterpenes-oxygénés, donc environ 96,5% des composés détectés. Les constituants majoritaires sont le 1,8-cineole : 45,4%, limonène : 17,8%, p -cymene: 9,5%, c -terpinène: 8,8%, α -pinene: 4,2% .

Tableau 4 : Principaux composés des HES de *E. globulus*

XII. Propriétés médicinales

Cette huile possède un effet rafraîchissant indéniable sur la température du corps. C'est un fébrifuge. Elle est utilisée dans de nombreuses spécialités pharmaceutiques pour ses multiples vertus sur l'arbre respiratoire.

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

Elle Facilite la dissolution et l'élimination des glaires bronchiques (balsamique, fluidifiant, expectorant), anti-infectieux vis-à-vis des bactéries et virus. Antiseptique pour les voies urinaires, elle est aussi antirhumatismale, stimulante et tonifiante. En outre, c'est un excellent antibiotique naturel.

XIII. Utilisation des huiles essentielles *d'Eucalyptus globulus*

Les huiles essentielles d'eucalyptus est utilisé par deux voie la voie interne et la voie externe.

XIII.1 Utilisation interne

- Inflammation et infection des voies respiratoires (bronchite, sinusite, rhume, etc.).
- Infusion : Infuser de 2 g à 3 g de feuilles séchées dans 150 ml d'eau bouillante durant 10 minutes. Boire deux tasses par jour.
- Inhalation : Elle consiste à respirer de la vapeur d'eau (par le nez) chargée de quelques gouttes d'huile essentielle (pas plus de 10 gouttes). A défaut d'inhalateur (que vous pouvez acheter en pharmacie), vous pouvez tout simplement vous pencher au-dessus d'un bol d'eau chaude avec une serviette de bain sur la tête pour respirer le plus possible de vapeur. Ne pas dépasser plus de 15 minutes par inhalation. Répéter jusqu'à trois fois par jour.

XIII.2 Utilisation externe

- Inflammation et infection des voies respiratoires.

Friction et massage : Appliquées sur la peau, les huiles essentielles pénètrent les tissus et irriguent le corps par le sang. On peut ainsi privilégier les passages veineux comme le poignet ou le coude. En règle générale, il vaut mieux éviter d'appliquer sur la peau des huiles essentielles non diluées. Il est conseillé de les mélanger au préalable avec une huile végétale (jojoba, macadamia, rose musquée, argan, noix de coco, germes de blé, amande douce, olive, noyau d'abricot...).

- Mal de gorge.

Gargarisme : Infuser durant 10 minutes de 2 g à 3 g de feuilles séchées dans 100 ml d'eau bouillante. Se rincer la bouche ou se gargariser avec la préparation filtrée et refroidie, de deux à trois fois par jour. On peut également préparer un gargarisme en diluant de 2 à 3 gouttes d'huile essentielle dans 5 ml d'alcool, préparation à laquelle on ajoutera 50 ml d'eau.

- Douleurs rhumatismales.

Friction : Verser de 15 à 20 gouttes d'huile essentielle dans 25 ml d'huile végétale et frictionner les articulations douloureuses, trois fois par jour.

- Mal de tête.

CHAPITRE II : Les huiles essentielles et leurs méthodes d'extraction

Friction : Verser de 1 à 2 gouttes d'huile essentielle dans quelques gouttes d'huile végétale ; frictionner les tempes et le front. Ne pas appliquer trop près des yeux.

XIV. Activités biologiques des huiles essentielles d'*E. globulus*

XIV. 1 Activité antibactérienne et antifongique

Djenne et al. (2011) ont démontré l'efficacité des huiles essentielles d'*E. globulus* comme agent naturel de la conservation des aliments grâce à son effet antibactérien sur de nombreux micro-organismes. L'huile essentielle de *E. globulus* (100%) est efficace contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Raho et Benali, 2012) (81), ainsi que sur *Candida albicans*.

En outre, une très forte sensibilité des levures aux HEs des feuilles de *E. globulus* a été notée avec une concentration minimale inhibitrice de 1,13 à 2,25 mg/mL sur la flore bactérienne (Tyagiet Malik, 2011).

CHAPITRE III

Chapitre III : Matériels et méthodes

I. Matériel biologique utilisé

I.1 Matériel végétal

I.1.1 Choix de la plante

Eucalyptus globulus ou comme appelé (Calitouss) est l'espèce végétale aromatique choisis selon leur abondance dans notre région et leur utilisation courante par la population de Saïda en médecine traditionnelle pour les maladies des vois respiratoires

I.1.2 Zone de récolte

Les parties aériennes de la plante étudiée ont été recueilli dans la région de Vieux Saïda, la forêt récréative située à la sortie Sud de la ville de la wilaya de Saïda (Ouest D'Algérie). La zone du vieux Saïda est un vaste plateau rocheux.



Figure 7 : la zone de la forêt d'el Ogbane (vieux Saïda), Saïda Algérie

I.1.3 Récolte et séchage

Le matériel végétal a été obtenu au mois d'Octobre au niveau de la wilaya de Saïda. Le tableau 5 représente l'origine du matériel végétal. L'identification botanique a été faite au niveau de laboratoire biologique ; département de biologie ; Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

de l'Université de Dr Moulay Taher Saïda. Le matériel végétal a été laissé sécher à température ambiante, à l'ombre et à l'abri de l'humidité dans une pièce aérée pendant une période de 10 à 15 jours.

Quantité du matériel végétal traité	100 g
Lieu de récolte	La forêt d'el Ogbane Saïda
L'origine de la plante	L'Australie
Durée de séchage	10-15 jours
Partie utilisée	Aérienne
Etat	Sec

Tableau 5 : Origine et caractéristique du matériel végétal

I.1.4 Extraction des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont extraites par la méthode d'hydrodistillation type Cleavenger. Une quantité de 100g de la matière sèche de la plante étudiée (*Eucalyptus globulus*) est introduite dans un ballon de 1 L imprégnés d'eau distillée, l'ensemble est porté à l'ébullition pendant 4 heures. Les vapeurs chargées d'huile essentielle ; en traversant un réfrigérant se condensent et chutent dans une ampoule à décanter (Figure 8), l'eau et l'huile se séparent par différence de densité, pour éliminer toute trace d'eau, l'huile extraite a été traitée avec du sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), filtrée et ensuite stockée à l'obscurité à 4 °C. Nos huiles essentielles ont été extraites au niveau de laboratoire de département de biologie ; Faculté des Sciences, l'Université de Saïda.

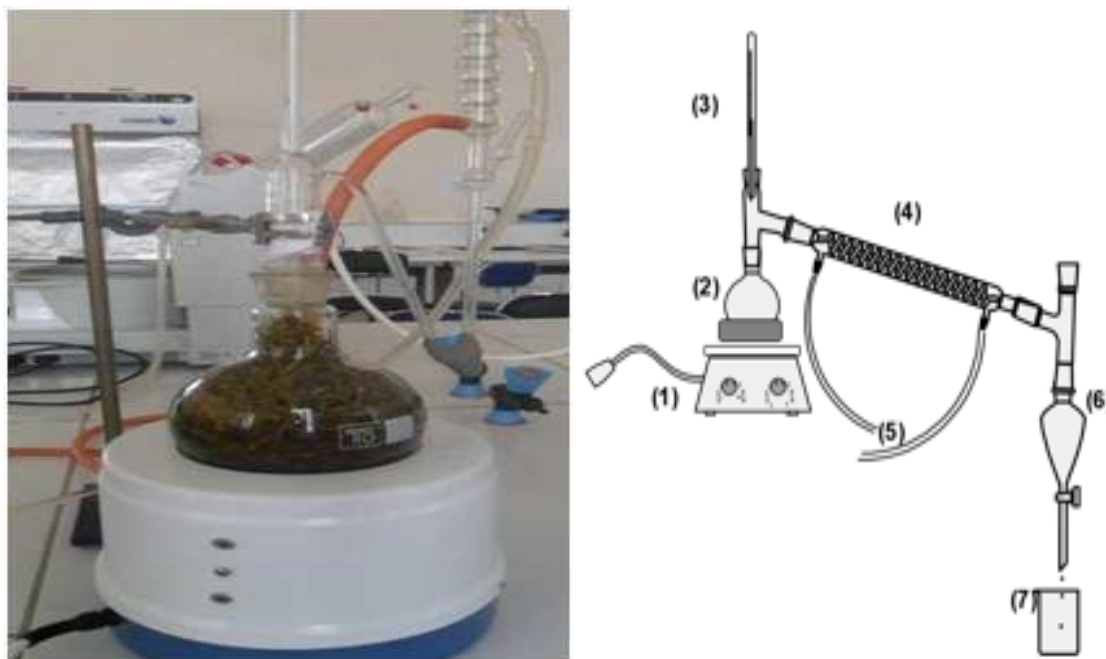


Figure 8 : Hydrodistillation type Cleavenger

(1) Chauffe ballon. (2) Eau + biomasse végétale. (3) Thermomètre. (4) Réfrigérant. (5) Eau de refroidissement. (6) ampoule à décanter. (7) Huiles essentielles+ hydrolat.

I.1.5 CPG / MS : chromatographie en phase gazeuse /spectrométrie de masse

La composition chimique des huiles essentielles a été analysée en utilisant un chromatographe en phase gazeuse monté sur un spectromètre de masse. Fonctionnement en mode impact électronique d'assurance-emploi (70 eV). Une CB- 5 colonne (25m de longueur) ont été utilisés. Les conditions chromatographiques sont les suivantes : températures de l'injecteur et du détecteur à 250° C ; gaz porteur, de l'hélium à un débit de 1,4ml / min, température de programme rampe de 50°C pendant 15 min, on augmente vers 250°C par 2°C/min et après on laisse à 250°C pendant 10 min, donc le temps d'analyse totale 125 min. La quantité relative des composants individuels de l'huile totale a été exprimée en pourcentage d'aire du pic par rapport à la zone de pic totale. Une recherche bibliographique a été réalisée en utilisant la combinaison de NIST MS Recherche et de la littérature. Les composants des huiles ont également été identifiés par leurs indices de rétention relatifs à n-alcanes (C8 - C24).

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

I.2 Matériel microbienne

I.2.1 Souches utilisées

Quatre souches bactériennes ainsi que 3 souches de levure de références ont été utilisées pour déterminer l'activité antimicrobienne des huiles essentielles de la plante étudiées, elles sont représentées dans le Tableau (6).

Les souches testées		
Bactéries	Bactéries à Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
		<i>Pseudomonas aerugina</i> ATCC 27853
	Bactéries à Gram (-)	<i>Klebsiella pnemonia</i> ATCC 70603
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25933
Les levures		<i>Candida albicans</i> ATCC 26790
		<i>Candida albicans</i> IP 444
		<i>Candida albicans</i> ATCC 10231

Tableau 6 : Souches utilisées

Elles sont entretenues par repiquages successifs sur Gélose Nutritive (Bactéries) et sur Gélose Sabouraud (levures) et conservées à 4°C. Ces souches nous ont été fournies par le Laboratoire ; Faculté des Sciences, Département de Biologie Université de Saïda.

II. Etude de l'activité antibactérienne de l'HE d'*Eucalyptus globulus*

II.1 Préparation des dilutions par DMSO

Les huiles essentielles ont été diluées (tableau 7) Dans une quantité de DMSO, ce dernier a été testé afin de confirmer l'absence d'une activité antimicrobienne. (CLSI 2014)

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

Dilution	Concentration	Quantité
1 ^{ère} Dilution	5% = 53 mg/ml	50 µL HE + 950 µL DMSO
2 ^{ème} Dilution	10% = 106 mg/ml	100 µL HE + 900 µL DMSO
3 ^{ème} Dilution	50% = 530 mg/ml	500 µL HE + 500 µL DMSO
4 ^{ème} Dilution	100 % = 1060 mg/ml	1000µL HE + 0 µL DMSO

Tableau 7 : Les concentrations de l'HE utilisée

II.2 Préparation de la suspension bactérienne

A partir des cultures jeunes sur la gélose nutritive (bactéries) ou sabouraud gélose (levures), nous avons prélevé cinq (05) colonies bien isolées et identiques dans 5 ml d'eau physiologie stérile, agitées manuellement pendant quelques secondes. L'ajustement de la charge bactérienne à 10^6 UFC/ml, est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 625 nm. Selon la standardisation de Mc Farland, nous admettons une DO comprise entre 0.08 et 0.1 correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml ; la suspension d'inoculum est diluée à $1/100^{\text{ème}}$ dans le milieu de culture pour avoir une concentration de 10^6 UFC/ml. (Hellal, 2011).



Photo 8: Spectrophotomètre

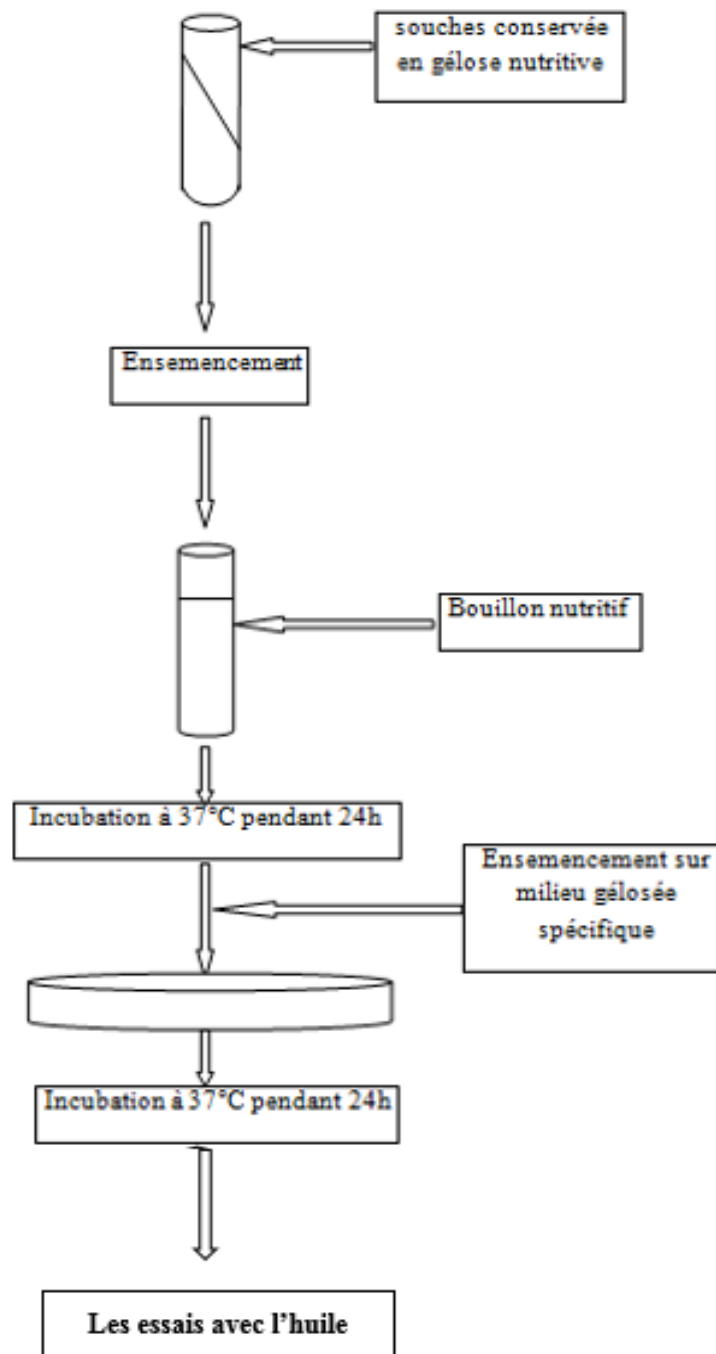


Figure 9 : Préparation de la suspension bactérienne

III. Méthode de diffusion sur le milieu gélose

La technique des disques de diffusion est simple à mettre en œuvre et relativement bon marché. Elle fournit seulement les informations qualitatives et semi-quantitatives sur la sensibilité d'un

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

microorganisme donné à un antibiotique donné. Le test est réalisé en appliquant à la surface des plaques en gélose avec l'affectation des différentes dilutions (Berche. P, Gaillard. JL, Simonet. M).

III.1 Ensemencement

Cette opération doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum. On trempe un stérile dans la suspension bactérienne, puis on floter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, séché, de haut en bas, en strie serrées. L'opération doit se faire trois en tournant la boîte à 45° à chaque fois.

Après application immédiate des disques, les boîtes sont laissées pendant 15 mn à température ambiante.

On fait placer 4 disques plus un disque de DMSO comme témoin sur chaque boîte pétrie, une contienne *Escherichia coli*, une *Staphylococcus aureus* et une *Klebsiella pneumoniae*, et l'autre *Pseudomonas aeruginosa*, par une micropipette met sur chaque disque 10µl des différentes concentrations de l'HE, puis on incube pendant 24h à l'étuve (37°C).

IV. Préparation des disques

On a utilisé le papier Wattman N°6 coupé en disques de 6 mm ces derniers doivent avoir un contour régulier pour donner une zone d'inhibition facile à mesurer les disques, une fois préparés, sont placés dans une boîte de pétri (en verre) contenant 10ml d'eau distillée pendant 20mn à 120 °C (stérilisation des disques).

La gélose Muller-Hinton (MH) est coulée en boîte de pétri sur épaisseur de 4mm, sont préséchées avant l'emploi.

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

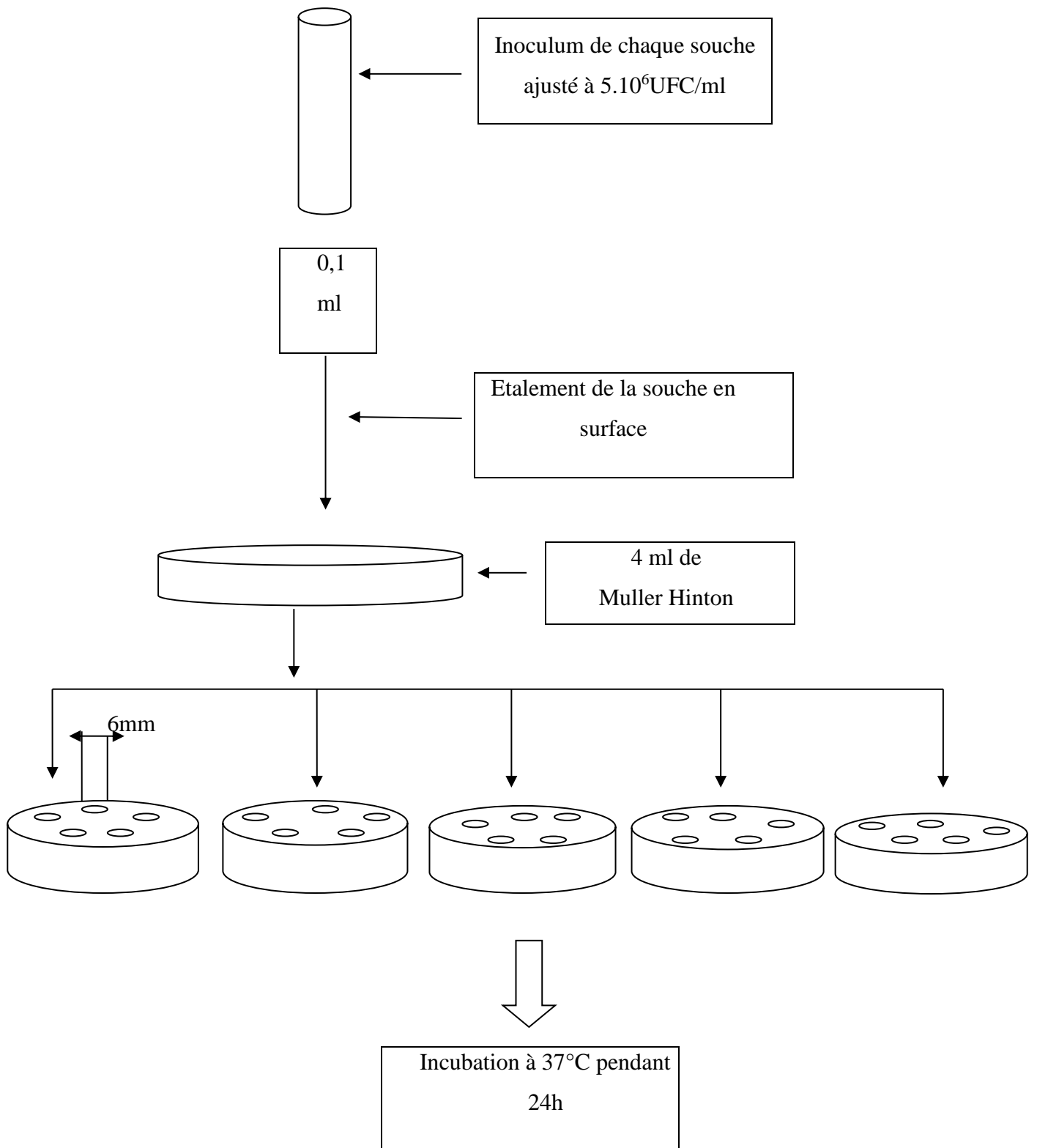


Figure 10 : Préparation des disques

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

V. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide

V.1 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles a été évaluée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). La technique utilisée a été décrite par CLSI en 2006. Elle est basée sur la capacité des microorganismes à produire une croissance visible à l'œil nu au sein d'une série de dilutions de la substance antimicrobienne (CLSI-M7-A7 2006).

Le Bouillon Mueller Hinton (MH) (pH de 7,2 à 7,4) est largement utilisé comme milieu standard pour la micro-dilution en plaque. Il permet une meilleure croissance de la plupart des bactéries pathogènes non exigeantes, en plus de son faible effet antagoniste vis-à-vis des antibiotiques. Ce bouillon est considéré comme milieu de référence.

A partir d'une préculture bactérienne en milieu solide (gélose nutritive) de 24 h à 37°C, nous avons prélevé quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons re-suspendues dans du bouillon nutritif. La concentration cellulaire est 10^8 cellules/ml. Une dilution au 1/100^{ème} est effectuée pour avoir un inoculum final de 10^6 cellules/ml.

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination, qui contient seulement le Bouillon Mueller Hinton, comme témoin positif (100 µl). Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'huile essentielle dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. Le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans HE). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu à l'aide de d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme une trouble). [(Espinel-Ingroff et Canton., 2007) ; (Majorosetcoll., 2005)].

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M7-A7 2006).

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

V.2 Activité antifongique

L'étude de l'activité antifongique est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Nous avons utilisé la méthode décrite en 2002 par *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A2 (CLSI). C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les CMI et les CMF correspondantes (CLSI-M27-A2 2002). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes.

Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fond rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations décroissantes d'huile essentielle. Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon sabouraud

Les souches fongiques conservées dans sabouraud gélose à 4°C, sont ensemencées dans sabouraud liquide à 30°C pendant 48 h, puis réensemencées en strie sur boîte de pétri contenant de sabouraud gélose à 30°C pendant 48 h, nous avons prélevé 5 colonies d'un millimètre de diamètre, que nous avons placé dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée à 10^8 cellules/ml par cellule de Thomas. Une dilution au $1/100^{\text{ème}}$ est effectuée pour avoir un inoculum final de 10^6 cellules/ml.

Pour chaque ligne de la microplaque, nous avons déposés 50µl de l'inoculum dans les 12 puits à l'exception du puits N°12 qui servira de puits de contrôle de contamination qui contient seulement l'RPMI comme témoin positif (100 µl). Nous avons ensuite ajouté 50 µl de la solution de l'huile essentielle dans les 12 puits à l'exception du puits N°11 et puits N°12. le puits N°11 servira de témoin négatif (croissance sans HE). Les plaques sont scellées et placées dans une étuve à 30°C pendant 48 heures (CLSI-M27-A2 2002).

La lecture du résultat s'effectue à l'œil nu à l'aide d'une source de lumière sous la microplaque pour visualisé si il y'a une inhibition ou non (la croissance sous forme une trouble). [(Espinell-Ingroff et Canton., 2007) ; (Majorosetcoll., 2005)].

CHAPITRE III : Matériels et méthodes :

La plus faible concentration de chaque fraction ne montrant aucune croissance sera considérée comme la concentration minimale inhibitrice (CMI), elle est confirmée par un ensemencement sur milieu solide (CLSI-M27-A2 2002).

VI. Détermination des concentrations minimales bactéricide (CMB) ou fongicide (CMF)

VI.1 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme la plus faible concentration de l'antibactérien qui détruit 99,9% de la concentration cellulaire finale. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 37°C), les deux puits contenant les concentrations en huile essentielle strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMB. Pour ce faire, un échantillon de 10 µl de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu Gélose nutritive. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte de celle de la CMB renferme un nombre de colonies inférieur à 3 (PRESCOTT et coll. 1995).

VI.2 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Pour la détermination de la concentration minimale fongicide, nous avons utilisé la méthode décrite par CANTON et coll. 2003. Cette méthode est en accord avec les exigences de la CLSI « *Clinical and Laboratory Standards Institute* » (ESPINELINGROFF et CANTON 2007).

Après la détermination de la CMI (durant 48h d'incubation à 30°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF. Pour ce faire, 10 µl de chaque puits vont être transférés dans des boîtes de Pétri contenant du milieu sabouraud gélose. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 30 °C pendant 48 h. Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boîte correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (MAJOROS et coll., 2005).

CHAPITRE IV

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Chapitre IV : Résultats et discussion

Cette partie consiste à interpréter les résultats obtenus durant notre expérimentation afin d'évaluer l'effet antibiotique et antifongique des huiles essentielles de l'eucalyptus globulus.

I. Résultats de l'extraction de l'huile essentielle

I.1 Rendement en huile essentielle

Le rendement R en huile essentielle est calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{RHE} = \text{Masse d'huile essentielle(g)} / \text{Masse du matériel végétal utilisé(g)} \times 100$$

- $M' = 2.64\text{g}$ $M = 100\text{g}$ donc $M'/M \times 100$
- Ce dernier est exprimé en ml/100 g de matière sèche.

- Nous avons obtenu les résultats suivants :

$$\text{RHE\%} = (M'/M) 100$$

$$\text{RHE\%} = (2.64/100) 100$$

$$\text{RHE\%} = 2,64 \pm 0,1\%$$

Espèces	Parties utilisées	Rdt(%)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Parties aériennes	2,64±0,1%

Tableau 11 : Rendements massiques des huiles essentielles

I.2 Résultats du CPG/MS

Les résultats de la chromatographie en phase gazeuse /spectrométrie de masse de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sont représentés dans le tableau suivant :

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Composants	TR	%
2,5-Dimethylhex-5-en-3-yn-2-	4.298	0.010
β -Thujene	7.201	3.401
A-PHELLANDRENE	12.934	5.084
p-Cymene	15.567	20.242
Eucalyptole	16.111	11.289
γ -Terpinene	18.953	2.165
Terpinen-4-ol	29.502	3.660
Cryptone	30.173	5.018
Cuminal	34.548	2.644
Phellandral	37.028	2.535
Elixene	41.495	2.980
Globulol	55.513	0.138
(-)-Spathulenol	56.590	14.102
Phytol	83.452	0.032

Tableau 8 : les composants majoritaires de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

L'analyse chimique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants pour notre HE représentant 100%. Cette analyse montre que *les* composants majoritaires de notre huile essentielle *d'Eucalyptus globulus* sont des monoterpéniques et sesquiterpéniques. Le *p-Cymene*, *l'Eucalyptole* et *(-)-Spathulenol* sont les composés majoritaires pour l'HE de *l'e.g* voir tableau 8.

D'après (TALEB, 2015), les résultats obtenues pour le CPG/MS sur l'HE *d'e.g* de la région de Kabylie (nord Algérie), ont montré que les composés majoritaires sont différents des c'elles qu'on a obtenues, on cite l'Eucalyptol, Globulol, α -pinène et P. Cymène. Voir tableau 9

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

Composants	Pourcentage
l'Eucalyptol	47,05
Globulol	8,65
α -pinène	7,69
P. Cymène	3,48

Tableau 9 : Les composants majoritaires de notre huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* de la région de kabylie

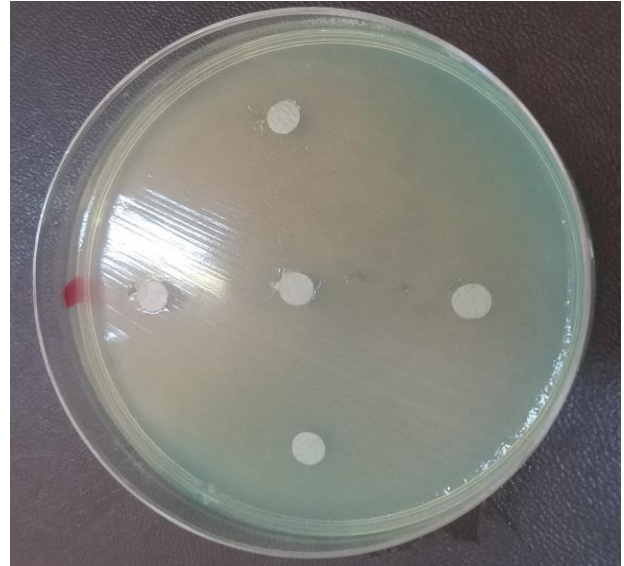
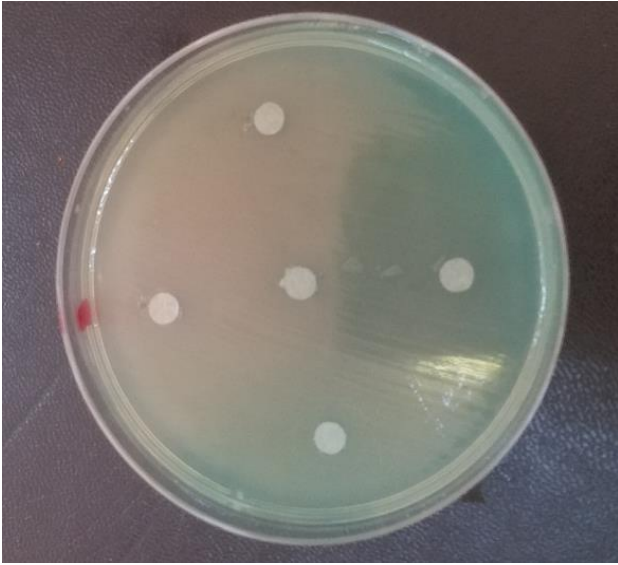
La différence obtenue entre les composants majoritaires des deux huiles essentielles des deux régions au même mois (février), est due au changement environnemental ou biogéographique des deux zones.

I.3 L'effet de l'huile essentielle sur les souches bactériennes

Les diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle sur les souches bactériennes testés sont représentés dans le tableau suivant :

Souches bactérienne	Gram	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)				
		Les dilutions (μ l)				DMSO
		100%	50%	10%	05%	
<i>Escherichia coli</i>	-	32	15	15	7	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	20	9	8	8	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	> 30				

Tableau 9 : Les diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle sur les bactéries

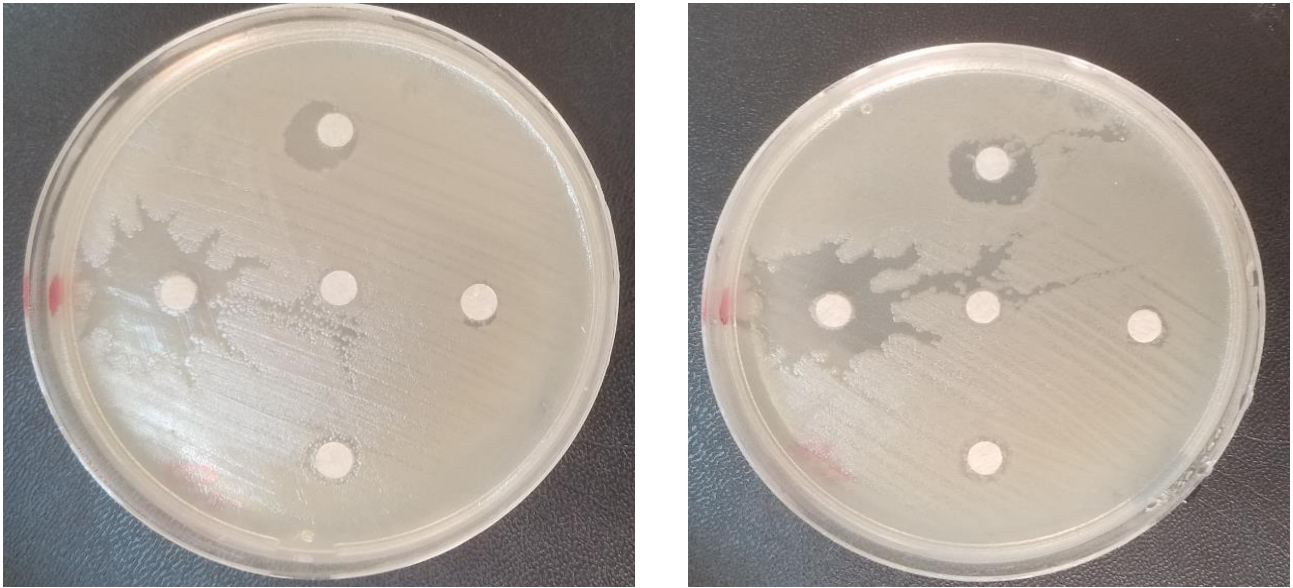


Staphylococcus aureus

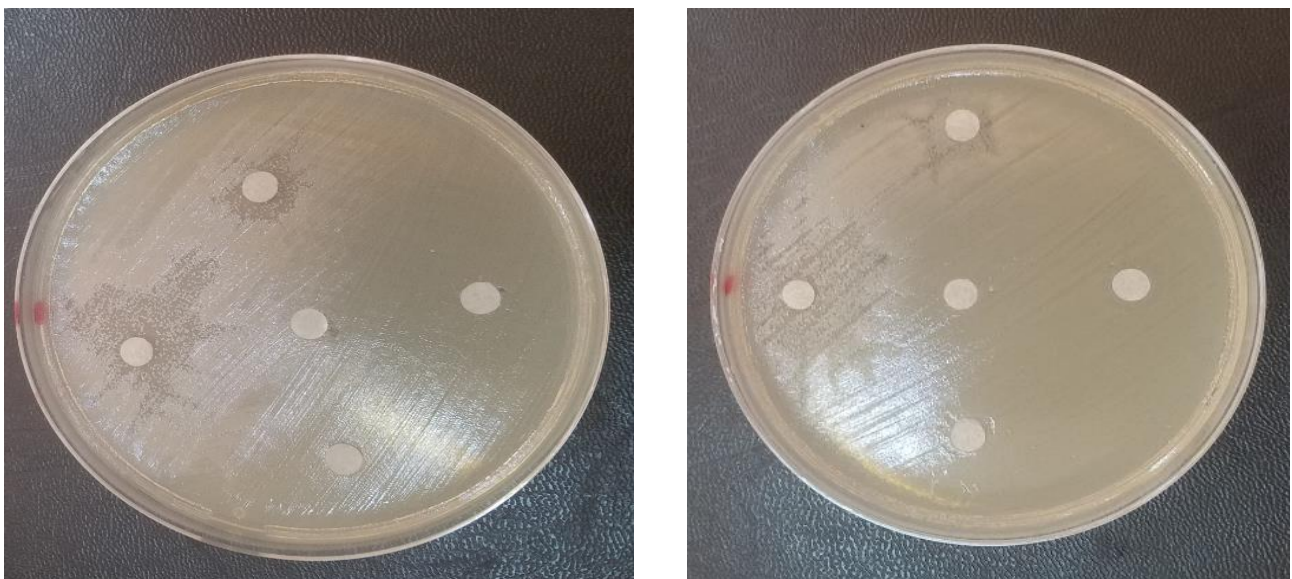


Pseudomonas aeruginosa

CHAPITRE IV : Résultats et discussion



E. coli



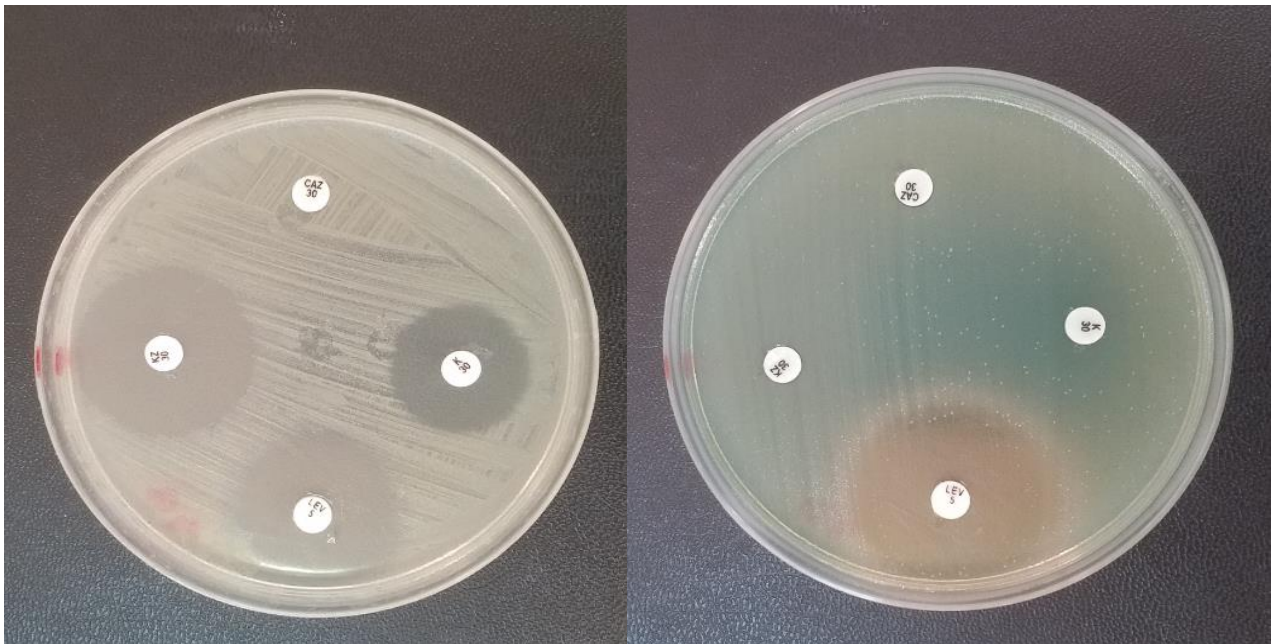
Klepsiella pneumonea

Figure 11 : Les zones d'inhibition de L'HE sur *S.a*, *Pseudomonas aerugina* , *E.coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

On remarque que l'HE a fortement inhibé surtout les souches *E.coli* et *Pseudomonas aerugina* , et une activité modéré avec la souche *Klebsiella pneumoniae*, contrairement au *Staphylococcus aureus*, qui a été la plus résistante.

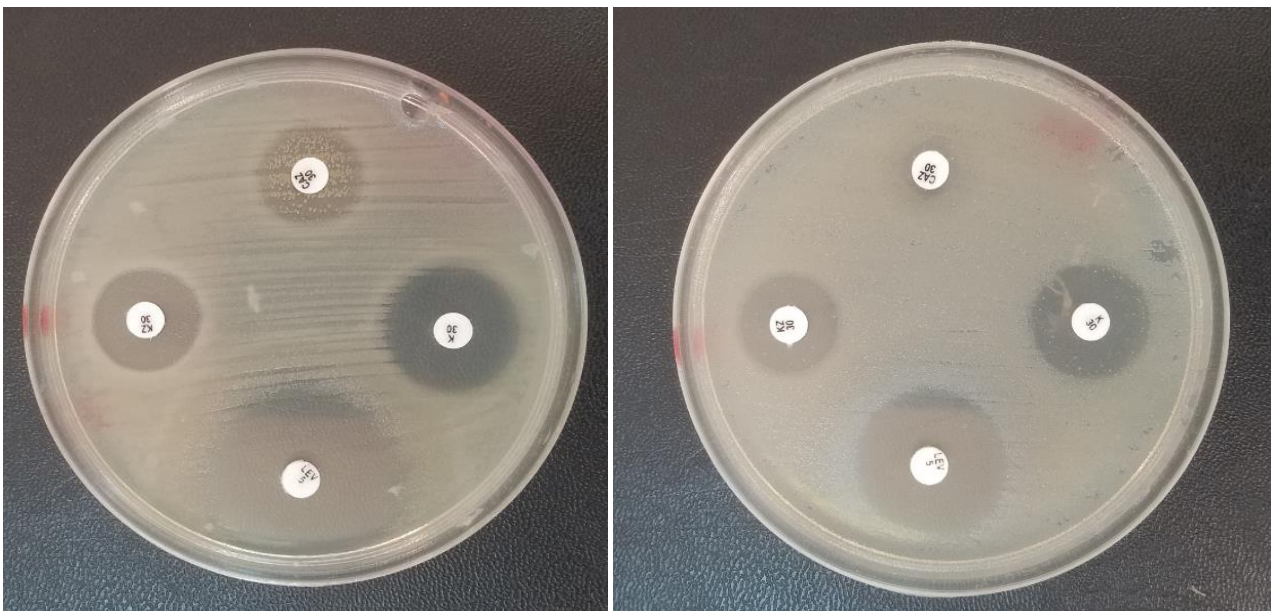
CHAPITRE IV : Résultats et discussion

II. Comparaison de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle avec celle des antibiotiques



Staphylococcus aureus

Pseudomonas aeruginosa



E. coli

Klebsiella pneumoniae

Figure 12 : La sensibilité et la résistance des souches *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* aux antibiotiques k, kz, cas, et lev.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

L'analyse comparative des effets de l'HE et des antibiotiques (Figure 12) a révélé la :

Résistance de

- *Stafilococcus aureus* au CAZ
- *Pseudomona aerugina* au K, KZ et CAZ
- *E. coli* à aucun antibiotique
- *Klebsella pneumonea* au CAZ

Sensibilité de

- *Stafilococcus aureus* au K, KZ et LEV
- *Pseudomona aerugina* au LEV
- *E. coli* à tous les antibiotiques testés
- *Klebsella pneumonea* au K, KZ et LEV

Similarité de l'action antibactérienne des antibiotiques et de l'HE des feuilles sur nos souches utilisées *Pseudomona aerugina*, *E. coli* et *Klebsella pneumonea* par des zones d'inhibitions bien claires sauf avec *Stafilococcus aureus* qui a été résistante à l'HE contrairement aux antibiotiques.

Sensibilité similaire à l'antibiotique K, KZ et LEV a été notée pour *K.pneumonea* et *S.aureus* ceci pourrait être due au même mode d'action de K, KZ et LEV sur les bactéries citées.

III. L'effet de l'huile essentielle sur les souches fongiques

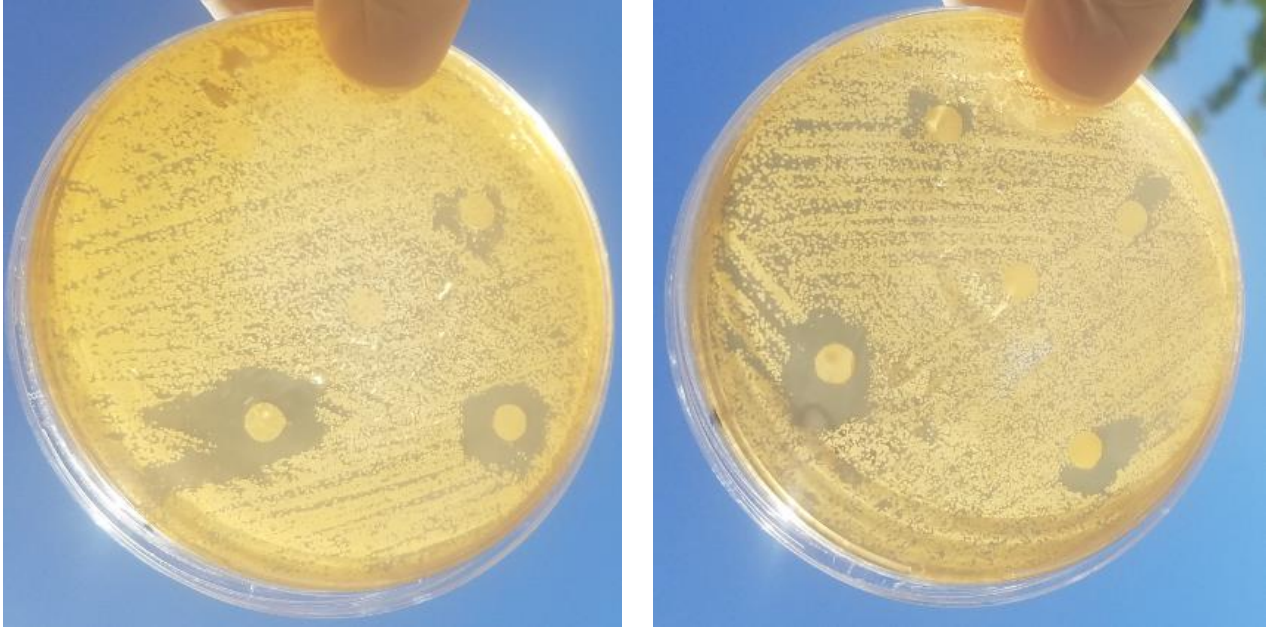
Les diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielle sur les souches fongiques testés sont représentés dans le tableau suivant :

Souches fongiques	Diamètres des zones d'inhibitions (mm)				
	Les dilutions (µl)				DMSO
	100%	50%	10%	05%	
<i>Candida albicans</i> ATCC 26790	20	15	12	10	-
<i>Candida albicans</i> (IPP444)	25	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20	12	12	8	-

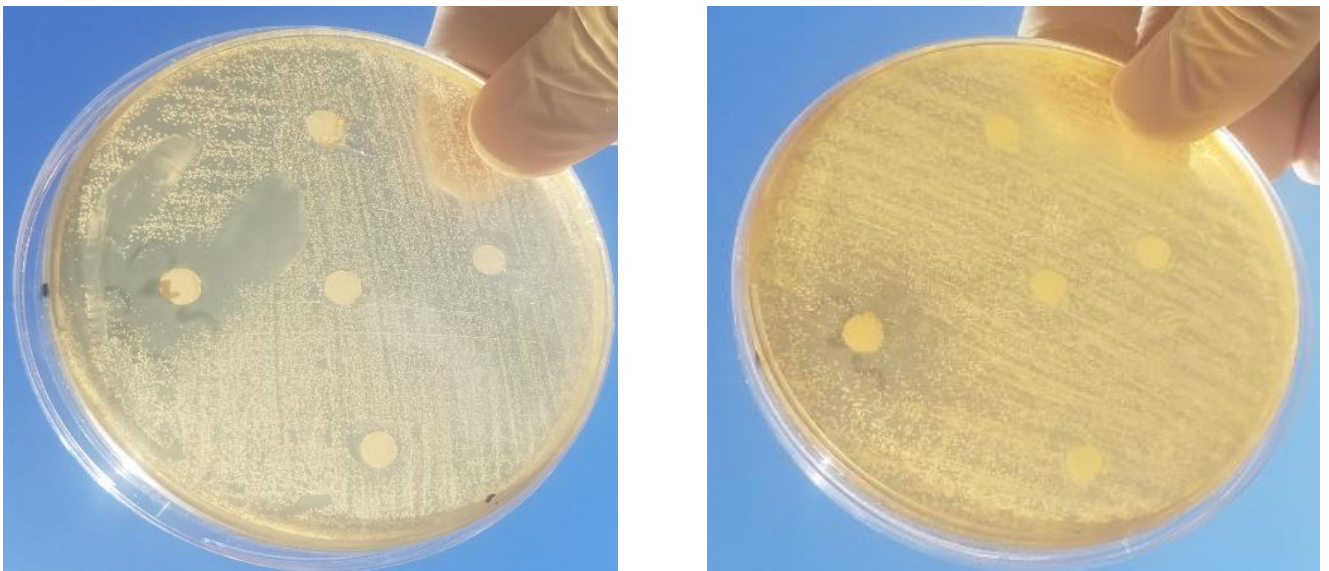
Tableau 10 : Les diamètres des zones d'inhibitions de l'huile essentielles sur les souches fongiques

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

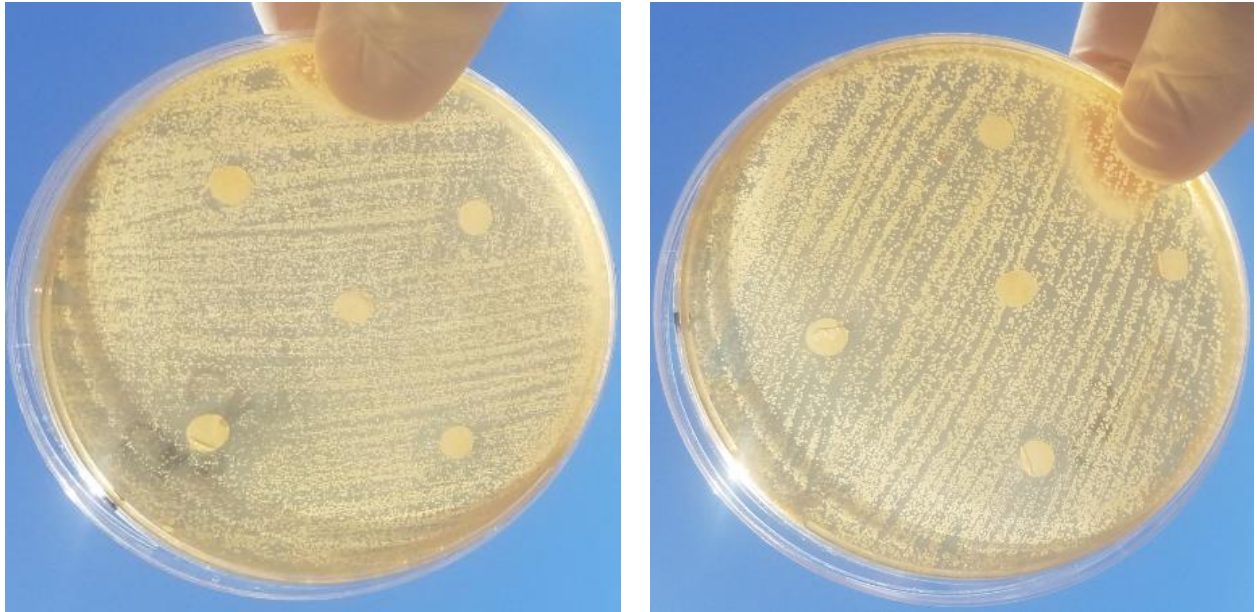
Les mesures des zones d'inhibitions figurent dans le tableau 10 nous ont permis d'évaluer l'activité antibactérienne des différents concentrations mesurées.



Candida albicans ATCC 26790



Candida albicans (IPP444)



Candida albicans ATCC 10231

Figure 13 : Les zones d'inhibition de L'HE sur *Candida albicans* ATCC 26790, *Candida albicans* (IPP444) et *Candida albicans* ATCC 10231

On remarque que l'HE a inhibé surtout les souches *Candida albicans* ATCC 26790 et *Candida albicans* ATCC 10231, contrairement au , *Candida albicans* (IPP444), qui a été la plus résistante. Donc on peut dire que le pouvoir biologique de l'HE d'*Eucalyptus globulus* est efficace pour l'activité antibactérienne et antifongique, est due généralement à la composition de l'HE qui est riche aux terpènes (composés terpéniques).

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV. Evaluation de l'activité antimicrobienne

IV.1 Activité antibactérienne : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales bactéricides (CMB)

La méthode des micro-dilutions sur milieu liquide est une technique quantitative permettant de déterminer la sensibilité des microorganismes vis-à-vis une substance antimicrobienne. Cette méthode se base sur le pouvoir inhibiteur des huiles essentielles à l'intérieur d'un puits, dans un milieu nutritif (Mueller Hinton bouillon) ensemencée par l'inoculum des souches à testées.

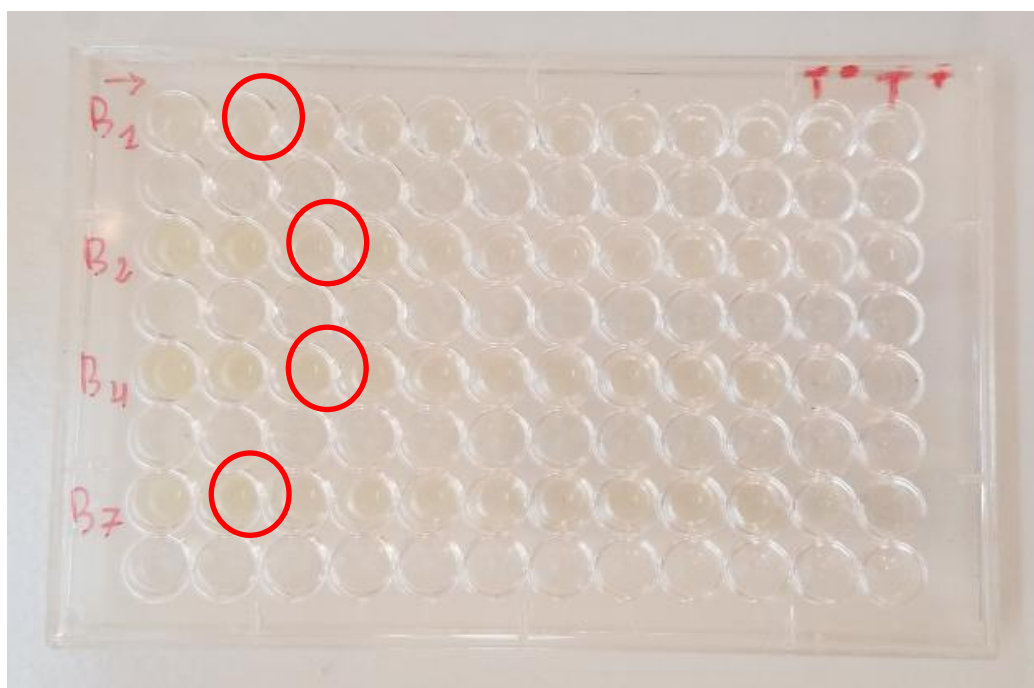


Figure 14 : Les résultats des CMI et des CMB de l'huile essentielle *Eucalyptus globulus* vis-à-vis des souches bactériennes

Les résultats de la méthode de microdilution montrent que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a un effet inhibiteur à une concentration de 53 mg/ml vis-à-vis de la souche *E. coli* et *P. aerugina* qui représente les souches les plus sensibles parmi nos souches testées. La CMI est de 106 mg/ml vis-à-vis de *K.pneumonea* et *S.aureus*, cette dernière est considérée comme la souche la plus résistante.

Nos résultats ont montré aussi que toutes les valeurs de CMI sont équivalentes à celles de CMB vis-à-vis toutes les souches testées. Nous pouvons conclure que les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* ont un effet bactéricide.

CHAPITRE IV : Résultats et discussion

IV.2 Activité antifongique : détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) et des concentrations minimales fongicides (CMF)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'HE d'*Eucalyptus globulus* vis-à-vis trois souches de levures est réalisée par la méthode des micro-dilutions sur milieu liquide. Nous avons utilisé le milieu de culture : le Bouillon Sabouraud (BS).

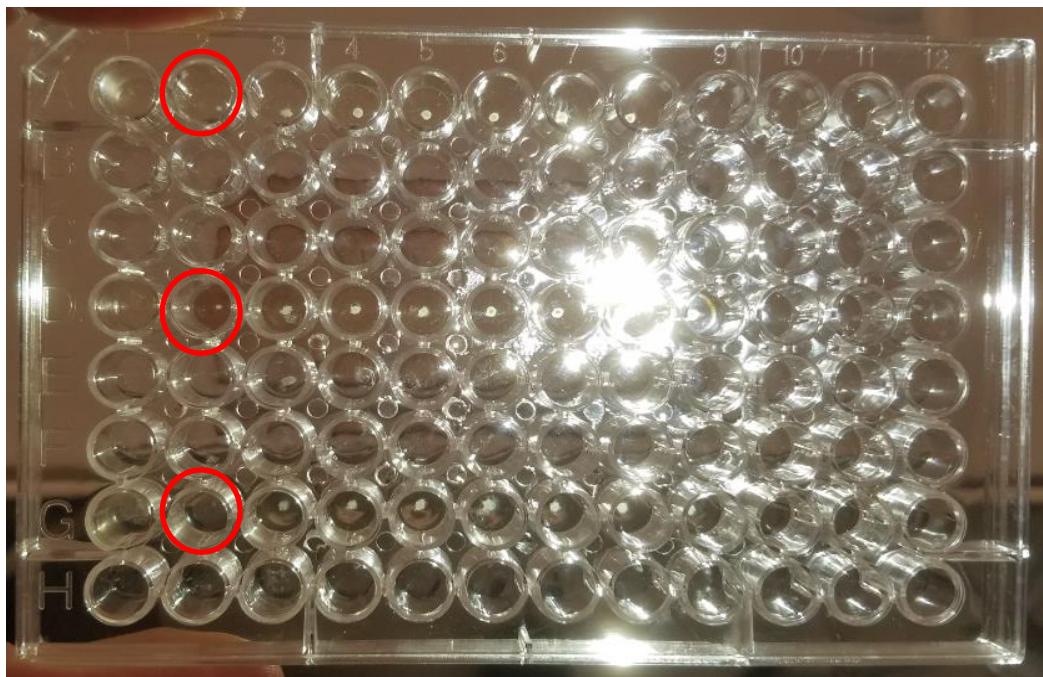


Figure 15 : Résultats des CMI et des CMF des huiles *Eucalyptus globulus*, vis-à-vis de trois souches fongiques

Les résultats concernant la détermination des concentrations minimales inhibitrice (CMI) montrent que les HEs d'*Eucalyptus globulus* a un effet inhibiteur très prononcé avec une concentration de 106 mg/ml vis-à-vis toutes nos souches testées, *Candida albicans* ATCC 26790 et *Candida albicans* (IPP444), *Candida albicans* ATCC 10231. Les rapports des valeurs de CMI et de CMF montrent que notre HE possède une très bonne activité antifongique en comparant avec les résultats de l'activité antibactérienne.

Nos résultats ont montré aussi que toutes les valeurs de CMI sont équivalentes à celles de CMF vis-à-vis toutes les souches testées. Nous pouvons conclure que les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* ont un effet fongicide.

CHAPITRE V

CHAPITRE V : Discussion générale

Chapitre V : Discussion générale

I. Discussion

Toutefois, l'HE de l'*eucalyptus globulus* a été obtenu par hydrodistillation avec un rendement de l'ordre de **0,27 %**. Les propriétés organoleptique de l'huile essentielle extraite sont représentées par un aspect liquide et une odeur aromatique très forte doté d'une couleur brune foncé. La technique de aromatogramme a permis de confirmer l'effet de l'huile essentielle et dans différentes concentrations (**2,64±0,1%**) démontrés par l'existence des zones d'inhibition pour la majorité des souches étudiées (8 – 20 mm), mais cette effet est variable d'une concentration à l'autre.

L'analyse chimique a fait ressortir un nombre déterminé de constituants pour notre HE représentant 100%. Cette analyse montre que les composants majoritaires de notre huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* sont des monoterpéniques et sesquiterpéniques. Le p-Cymene, l'Eucalyptole et (-)-Spathulenol sont les composés majoritaires pour l'HE de l'e.g.

D'après (TALEB, 2015), les résultats obtenues pour le CPG/MS sur l'HE d'e.g de la région de Kabylie (nord Algérie), ont montré que les composés majoritaires sont différents des c'elles qu'on a obtenues, on cite l'Eucalyptol, Globulol, α -pinène et P. Cymène.

Ces résultats signifient que l'HE possède une activité inhibitrice contre les souches bactériennes étudiées.

Les résultats obtenus pour *E.coli* montrent une fort sensibilité vis-à-vis de l'HE *eucalyptus globulus* avec des zones d'inhibition de l'ordre de (32/15/15/7) mm.

S.aureus présente est une souche qui s'est révélé résistante vis-à-vis de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* avec une absence totale des zones d'inhibition.

La méthode d'aromatogramme nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique de l'huile essentielle de l'*eucalyptus globulus* vis-à-vis des souches de bactéries et de levures testées.

L'HE de l'*eucalyptus globulus* a montré une activité antibactérienne et antifongique intéressante en comparaison avec l'effet des antibiotiques et antifongiques utilisés.

La méthode des disques est généralement employée comme une analyse préliminaire pour étudier l'activité antibactérienne ensuite viennent des méthodes plus détaillées. Dans cette méthode, les

CHAPITRE V : Discussion générale

paramètres tels que le volume de l'HE absorbé par le disque, l'épaisseur de la couche d'agar et si un dissolvant est employé varient considérablement entre les études (Manouetal, 1998 ; Brut, 2004). Ceci signifie que cette méthode est utile pour le choix des HEs actives et pour la mise en évidence de leur activité antimicrobienne.

Les interactions entre les agents émulsifiants (DMSO), et les constituants des HE représentent un facteur important pour la mesure de leurs activités antimicrobiennes car elles peuvent diminuer l'activité antimicrobienne.

Les HEs peuvent être utiles en tant qu'agent antifongique parce qu'elle affecte 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).

Le pouvoir antibactérien des HEs est puissant sur plusieurs bactéries à gram- et intermédiaire sur les bactéries à gram+, cause de la différence de la composition chimique de la paroi de deux groupes bactériens. Les B à gram- ont une paroi qui permet la pénétration des molécules lipophiles à cause de la présence des LPS (lipopolysaccharides), tandis que celles à gram+ ont une paroi constituée essentiellement de peptidoglycane qui laisse passer les molécules hydrophiles.(Gill et al ;2004).

CONCLUSION

Conclusion

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

L'objectif de notre travail consiste à faire une étude biologique sur d'huile essentielle *d'Eucalyptus globulus* de région de Saida- Algérie.

Les résultats obtenus, montrent que les huiles essentielles de *d'Eucalyptus globulus* obtenue par hydrodistillation dont les propriétés tel que la densité, l'indice de réfraction, d'acidité et le pH sont conforme aux exigences de la norme AFNOR

De même que l'activité biologique, la phase aqueuse de l'huile essentielle *d'Eucalyptus globulus* présent un pouvoir antibactérien assez différent selon la souche testée ; on remarque que l'huile essentielle a fortement inhibé la souche *Escherichia coli* et *psedomonas aerugina* et une activité faible avec *Klebsiella pneumoniae*, contrairement au *Staphylococcus aureus*, qui a été la plus résistante.

Le rendement de l'huile essentielle obtenue est très intéressé sur le plan économique pour d'éventuelle utilisation commerciale, a noté que 100 ml de l'huile essentielle d'Eucalyptus est commercialisé à 50 dollars. Cette opportunité ainsi que le pouvoir biologique important de l'huile, ouvert la voie vers la mise en valeur de la plante et ces dérivés dans le développement économique durable et dans la création de la richesse renouvelable dans notre pays.

Liste des références

- 1 **Quézel P et Santa S (1963)** Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome 2, 637p
- 2 **Hurtel J.M (2001)** Phytothérapie, plantes m médicinales, aromathérapie, huiles essentielles
- 3 **Mariani E.O, Mariani C. E et Lipinsky S.B (1981)** Tropical eucalyptus. P. 373-368. In McClure T.A et Lipinsky E.S (ed), CRC Handbook biosolar resources, vol. il. Resource materials. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL
- 4 **Treiner J (2000)** Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France. 39-143
- 5 **Anonyme (1953)** FAO Tournées d'étude sur l'eucalyptus. Unasyva. Vol .7. N°1.
- 6 **Kajangwe V et Mukarusine E (2001)** Etude comparative de la teneur en huiles essentielles de 61 espèces d'Eucalyptus de l'arboretum de Ruhande. Bulletin de l'Institut Rwandais de Recherche Scientifique et Technologique (I.R.S.T).
- 7 **Rodolfo J (2003)** Quality characters of essential oils from Rwanda. Part II: Eucalyptus, Brasil and Vetiver. A SNAPP-USA, ASNAPP-Rwanda.
- 8 **Bigendako M.J (2004)** Identification et Zonage des Eucalyptus Globulus au Rwanda. Chemonics International Inc, sous le projet ADAR
- 9 **Mehani M (2006)** Diagnostic sur les essais d'introduction de quelques essences
- 10 **Boudy P (1952)** Guide du forestier en Afrique, du Maroc, de Tunisie. Ed librairie agricole. Horticole forestier et Ménagère, Paris, 496p
- 11 **Mehani M (2006)** Diagnostic sur les essais d'introduction de quelques essences
- 12 **Melun F et Nguyen N (2012)** L'eucalyptus en France : une espèce remarquable pour la production de biomasse Revue Forestière Française (soumis), 20 p
- 13 **Penfold A. R, Willis J. L (1961)** The Eucalyptus. Botany, cultivation, chemistry and utilization. London Leonard Hill (Books) limited
- 14 **Giordano E (1968)** Osservazioni sull'apparato radicale de l'eucalyptus globulus Labill. Publ. del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale. X, 2 : 135-148.
- 15 **Bisset W.J et Shaw N. H (1954)** A comparison of D.C.P.A., T.C.P.A. and Arsenic for killing Eucalypt regrowth in subtropical native pastures. J. Aust. Inst. Agric. Sci., 20, 177-181
- 16 **Jacob M.R (1955)** Growth habits of the eucalyptus. Ed. by Forest and Timber Bureau. Dept of the Interior. Canberra. Australia.
- 17 **Google image** Les racines de l'Eucalyptus globolus.

- 18 Hopper S.D et Moran G.F (1981)** Bird pollination and the mating system of *Eucalyptus stoatei*. Australian Journal of Botany 29, 625-638p
- 19 Eldridge K, Davidson J, Harwood C et vanwyk G (1993)** Eucalypt domestication and breeding, Oxford University Press Inc., New York, p 288
- 20 Sijelmassi A (1991)** Les plantes médicinales du Maroc. 2^{ème} ED, le feunec 125p
- 21 Sijelmassi A (1991)** Les plantes médicinales du Maroc. 2^{ème} ED, le feunec 125p
- 22 Perroti C, Caraffa N, Aïli S (1999)** Se soigner par les plantes. Berti Editions, 118p.
- 23 Padrini F et Lucheroni M.T (1996)** Le grand livre des huiles essentielles-Guide pratique pour retrouver vitalité, bien être et beauté avec les essences et l'ramassage énergétique avec Plus de 100 Photographie. Edition De Vecchi, Paris, 11-15-61 et 111p
- 24 Lanier I(1986)** Maladies de l'eucalyptus. Bult. OEPP/EPPOB 16: 255-263 p.
- 25 Métro A(1963)** L'eucalitticoltura in una economia forestale modera. Ann. Acc. It. Scienze. Forestali, frenz
- 26 Turnbull J.W (1991)** future use of eucalyptus: opportunities and problems. In A.P.G. Schonau (ed). IUFRO Symp Intensive for the role of eucalyptus. Southern African Institute of Forestry, Pretoria. 2-27 p
- 27 Rakotavao N.A (1995)** Enquête sur les activités et produits de cueillette-extractivisme dans la zone de Manjakandriana et particulièrement dans les zones boisées en *Eucalyptus robuste*. CIRAD-foret et FOFIDA-DRD, Antananarivo.
- 28 Bertrand A (1992)** Les filières D'approvisionnement Enbois-Energie d'Antananarivo Et De Mahajanga. Evolutions et Perspectives, Proposition Pour La Planification Des Actions. UPED; CIRAD-Foret, Nogent/Marne
- 29 Villagran J et Kadik B (1981)** Etude préliminaire sur l'évolution de *Phoracantha semipunctata* Fab, ravageur des forets en Algérie .C.N.R.E.F.p6
- 30 Anonyme (1986)** FAO les eucalyptus sont-ils écologiquement nocifs? Unasyuva. Vol 38.N°152
- 31 Bertrand A et Le Roy E (1991)** Appui méthodologique aux volets foncier et économie forestière. ATP FOFIDA-CIRAD. L'économie forestière sur les hautes terres malgaches; Nogent/Marne.
- 32 Charries J (1980)** L'eucalyptus sur les hauts plateaux malgaches: Témoin, acteur et victime de comportements sociaux et politiques. Cah O.R.S.T.O.M, Sér.Sci.Hum, 17:267-268p
- 33 Bertrand A (1989)** Analyse économique de l'approvisionnement d'Antananarivo en produits forestiers et propositions de réforme de la réglementation et des redevances forestières. DEF, CTFT, Nogent/Marne.

- 34 Mazari G (1982)** Etudes de quelques aspects biologiques de *phoracantha semipunctata* et d'autres ravageurs d'eucalyptus dans la Mtidja et dans certaines stations avoisinantes. Mem .Ing.
- 35 Bourbouts J (1936)** Uma molestia de (Eucalyptus) de (Populus), na Bahia, causada por (Corticium salmonicolor), B et Br. Rodriguésia, It, 301-305p.
- 36 Bottomley A.M (1937)** Some of the more the important diseases affecting timber plantations in the Transval. S. Afr. I. Sci, 33. 373-376p
- 37 Girola D.C (1922)** Ganoderma sessil. Minis. Agric. Nacion (Buenos Aires). 236-239p
- 38 FAO(2005)** Global Forest Resources Assessment 2005. Rome, Italie,
- 39 FAO** Map 2008
- 40 AFNOR:** L'Association Française de Normalisation
- 41 AFNOR, EDITION 2000.** Huiles essentielles. Ed. PARA Graphic. Tome1 –Echantillonnage et méthode d'analyse 471 P. Tome 2 –Volume 1 Monographie relative aux huiles essentielles
- 42 JESSICA,** huiles essentielles et Aromathérapie: Un aperçu historique article Publié dans Histoire des huiles essentielles sur le 4 janvier 2010.
- 43 KESBI AMRANE;** étude des propriétés physicochimique et évaluation l'activite biologique des huiles essentielles d'eucalyptus globulus dans la région de Ouargla; mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master en génie des procédés, 2011.
- 44 BRUNETON J.1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier. 623p.
- 45 CSEKE, L.J. ET P.B. KAUFMAN. 1999.** How and why these compounds are synthesized by plants. Pages 37-90 in P.B. Kaufman, L.J. Cseke, S. Warber, J.A. Duke et H.L. Brielmann (eds.), Natural Products from Plants. CRC Press, Boca Raton, FL
- 46 PADRINI F., & LUCHERONI M. T., 1996.** Le grand livre des huiles essentielles :
- 47 BRUNETON J.1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier. 623p.
- 48 BRUNETON J.1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier. 623p.
- 49 BENKADA,** isolation des huiles essentielles de la menthe suaveolens, Ehrh (Bous Domrane) de la région de Tlemcen et leur analyse par différentes méthodes chromatographique mise en évidence du composé majoritaire « la pulégone », Thèse Magister. Unive. Tlemcen, 1990, pp 42,76.
- 50 BRUNETON J. 1999.** Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales. 3e édition. Ed. Tecet doc. Paris.
- 51 BRUNETON J.1987.** Elément de Phytochimie et Pharmacognosie. Ed. Tech. Et Doc. Ed Lavoisier, Paris
- 52 BRUNETON J.1993.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Paris, Lavoisier.

- 53 MAKHLOUF H. 2002** -Les huiles essentielles de romarin et de clou de girofle : approche analytique et activité antioxydant sur une huile alimentaire. Mémoire ingénieur, I.N.A., Alger, 82p
- 54 CHACOU M.et BASSOU K.** Efficacité antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles obtenues par extraction de la menthe verte *Mentha Spicata* L. issue de la région de Ouargla sur quelques germes pathogènes: *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*. Mémoire de DES microbiologie. Université de Kasdi Merbah Ouargla, 2007.P.14-27.
- 55 Garnero J.(2002).** Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physico-chimiques. P9
- 56 batish D R, Pal Singh H, Kumar Kohli A , Shalinder Kaur S.(2008).** Eucalyptus essential oil as a Natural pesticide *Forest Ecology and Management* 256 :2166–2174
- 57 Baba Aissa F. (2000).** Encyclopédie des plantes utiles. Flore d'Algérie et du Maghreb, substances végétales d'Afrique, d'orient et d'occident. Edition: Librairie moderne –Rouïba: P101
- 58 Garnero J.(2002).** Huiles essentielles. Techniques de l'Ingénieur, traité Constantes physico-chimiques. P9
- 59 Pereira S.,Freire S.R.C.; Neto P., Silvestre J. D.,and Silva M.S.A.(2005).** Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal. *Flavour and fragrance journal* flavour fragr. J. 2005; 20: 407–409
- 60 Penchev P.I.(2010).** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat en: Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. P9,P17,P19
- 61 Da silva F.(2010).** Utilisation des huiles essentielles en infectiologie ORL. Thèse de doctorat en Pharmacie. Université Henri Poincaré -Nancy p17,10,p18
- 62 Bousbia N.(2011).** extraction des huiles essentielles riches en antioxydant à partir de produits naturels et de coproduits agro-alimentaires. Thèse de doctorat en Chimie de l'université d'Avignon et des pays de Vaucluse et de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique. P16
- 63 Benabdelkader T.(2012).** Biodiversité, Bio activité et Biosynthèse des Composés Terpéniques Volatils des Lavandes Ailées, *Lavandula stoechas* Sensus Lato, un Complexe d'espèces Méditerranéennes d'Intérêt Pharmacologique. Thèse de doctorat en Biologie et Ecophysiologie Végétale de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger et de l'Université Jean-Monnet de Saint-Etienne, France.P10,25
- 64 Piochon M.(2008).** Etude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et hémi-synthèse. Thèse de doctorat en ressources renouvelables. Université du Québec:P7,11,17,20
- 65 Penchev P.I.(2010).** Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions. Thèse de Doctorat en:

Génie des Procédés et de l'Environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. P9,P17,P19

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

67 ABDOUL DOROSSO SAMATE, 2002, compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soljdanienne du Burkina Faso: valorisation. Thèse doctorat, l'Université de Ouagadougou.164p

68 ABDOUL DOROSSO SAMATE, 2002, compositions chimiques d'huiles essentielles extraites de plantes aromatiques de la zone soljdanienne du Burkina Faso: valorisation. Thèse doctorat, l'Université de Ouagadougou.164p

69 Opdyke D.L.J.(2002).Eucalyptus oil .P107. Zhiri A et Baudoux D.(2008).les huiles essentielles chémotyées:ISBN:2-919905-27-9 Edition Inspir Development. P7,P38

70 Opdyke D.L.J.(2002).Eucalyptus oil .P107*

71 Buronso A.M.(2008).Grand guide des huiles essentielles Santé Beauté et Bien Etre23.7362.9 ISBN:978-2-0123-7362-4

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

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

74 Tyagi A.,Malik A.Antimicrobialpotential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms.Food Chemistry126 (2011) 228–235

75 Djenane D .,Lefsih K., Yangüela J., Roncalés P.(2011).Composition chimique et activité anti-Salmonella enteritidis CECT 4300des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus, de Lavandula angustifoliée de Satureja hortensis. Tests in vitro et efficacité sur les œufs entiers liquides conservés à 7 ± 1 °Phytothérapie (2011) 9: 343–353 © Springer-Verlag France . DOI 10.1007/s10298-011-0664-

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

77 Tyagi A.,Malik A.Antimicrobialpotential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms.Food Chemistry126 (2011) 228–235

78 Vilela G. R., De Almeida G. S., Bismara Regitano D'Arce M. A., Duarte Moraes M. H., Otávio Brito J, das G.F. da Silva M F, ão Cruz Silva S, de Stefano Piedade S M, Calori-Domingues M. A., Micotti da Gloria E(2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-

cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Linkand *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research* 45 :108–111

79 Mishra A K, Sahu N, Mishra A, Ashoke K. Ghosh, Jha S, Chattopadhyay P.(2010)Phytochemical Screening and Antioxidant Activityof essential oil of *Eucalyptus* leaf *Pharmacognosy Journal* || Vol 2 | Issue 16 P25-28

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

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

82 Google image (vieux Saïda)

83 Hellal,2011 Contribution à l'étude des propriétésantibatériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extradites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardine pilchardus*). Mémoire magister option ; Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud Mammeri De Tizi-ouzou

84 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2014) methods for dillution antimicrobial succceptibility tests for bacteria that grew aerobically, approved standard, national committee for clinical laboratery standard, Wayne, Pa, USA 9th edition

84 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition (M2-A9).26 (1)

85 Espinel-Ingroff Ana and Cantón Emilia. (2007)Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. In:Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, and Avery C. Goodwin.

86 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2006) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Ninth Edition (M2-A9).26 (1).

87 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002) Reference method for broth dilutionantifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, 22 (15).

88 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, 22 (15).

89 Espinel-Ingroff Ana and Cantón Emilia. (2007) Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. In:Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, and Avery C. Goodwin

90 CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard M27-A2, 2nd ed. Clinical and

Laboratory Standards Institute, Villanova, PA, 22 (15)

91 Prescott, Harley et Klein (1995). Microbiologie. De Boek-Wesmael. S.A., p.1014.

92 Berche. P, Gaillard. JL, Simonet. M (1989): Bactériologie les bactéries des infections humaines. Edition Flammarion 1^{ère} éd. Paris.

93 Espinel-Ingroff Ana and Cantón Emilia. (2007) Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. In: Richard Schwalbe, Lynn Steele-Moore, and Avery C. Goodwin.