

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. MIRA – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Ecologie microbienne



Réf : .....

Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme  
**MASTER**

*Thème*

**Evaluation de l'activité antimicrobienne et  
anti-inflammatoire des huiles essentielles  
d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus radiata***

Présenté par :  
**AOUMER Hamida et SENOUNE Kati**

Soutenu le : 24/06/2023

Devant le jury composé de :

Mme. BELHAMMICHE N.	MAA	Présidente
Mme. BENSIDHOUM L.	MCB	Promotrice
Mme. SAIDANI K.	MCB	Examinatrice

**Année universitaire 2022/2023**

## **Remerciements**

*Nous remercions avant tous, Dieu le tout puissant, pour la volonté et la santé qu'il nous a donné durant toutes les longues années d'études afin que nous puissions arriver là.*

*Nous exprimons nos plus vifs remerciements à notre promotrice Madame BENSIDHOUM Leïla a son soutien, sa compétence, son aide précieuse pour notre recherche, son sens élevé du devoir, le fait d'être toujours montré à l'écoute, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance nous ont beaucoup appris, nous avons l'honneur de vous exprimer nos très profondes reconnaissances et nos sentiments les plus sincères.*

*Nos remerciements s'adressent particulièrement à Mr. NABTI El- Hafid de nous avoir accordé la chance de travailler au sein de son laboratoire avec tous les moyens nécessaires pour la réalisation de notre travail. Nous remercions Fatima (Faty), ainsi toutes l'équipe de Biomasse et Environnement du Laboratoire de Maîtrise des Energies Renouvelables*

*On tient à remercier les membres du jury Mme. BELHAMMICHÉ N. et Mme. SAIDANI K. pour leur présence, pour leur lecture attentive de ce mémoire, ainsi que pour les remarques qu'ils nous adresseront lors de cette soutenance afin d'améliorer notre travail.*

*On souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ce parcours universitaire.*

*Merci*

## *Dédicaces*

*A mes chers parents...*

*Aucun mot, aussi signifiant soit-il, ne saurait exprimer le degré d'affection, de gratitude, de respect et de reconnaissance qui j'éprouve pour vous. Votre présence à mes côtés m'a toujours apporté confiance et réconfort. Vous n'avez cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, toujours présent à mes côtés pour me consoler quand il fallait et vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.*

*Que dieu vous procure longue vie avec bonheur et santé chers parents, dont le mérite, les sacrifices et qualités humaines m'ont permis de vivre ce jour.*

*A mes petits frères Younes et Faiz*

*A ma chère sœur Mélissa pour toute l'affection et de soutien inconditionnel que j'ai trouvée auprès d'elle. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de réussite dans ta vie.*

*A ma grande famille et à mes amies Amel, Ryma, Ahlem,...*

*A ma binôme Kati pour sa compréhension.*

*Que ce travail si modeste soit pour vous le témoignage de ma grande considération, mon respect et mon amour*

*Hamida*

## *Dédicaces*

*Du plus profond de mon cœur, je dédie ce travail à :*

*A la mémoire de mon père disparu trop tôt,*

*J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part de sa fille qui a toujours prié pour le salut de son âme, puisse dieu, le tout puissant l'avoir en sa sainte miséricorde.*

*A ma mère et à toute ma famille qui ont su m'aider et m'encourager dans les moments difficiles.*

*A moi-même, je me remercie d'avoir toujours persévérer et de n'avoir jamais abandonné.*

*A mon binôme Hamida, qui a toujours su me comprendre.*

*Kati*

**Listes des figures**

**Figure 1** : Mécanismes d'action des HE sur la cellule bactérienne.....5

**Figure 2** : Mode d'action des huiles essentielles sur les champignons.....6

**Figure 3** : Photographie de l'entreprise TEROIR SAHEL.....15

**Figure 4** : Photographie des différents produits de l'entreprise TERROIR SAHEL.....15

**Figure 5** : Photo de différentes parties de la plante d'*Eucalyptus globulus*.....16

**Figure 6** : : Photo de différentes parties de la plante d'*Eucalyptus radiata*.....16

**Figure 7** : Photographie illustrant les étapes d'extraction.....18

**Figure 8** : Schéma de la vapo-distillation des huiles essentielles.....19

**Figure 9** : Photographie illustrant les étapes de préparation de la suspension bactérienne....20

**Figure 10** : Photographies des étapes de test d'activité par la méthode de diffusion sur agar.....21

**Figure 11** : Schéma des étapes de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-atmosphère.....22

**Figure 12** : Schéma de test de détermination de la CMI sur microplaque.....23

**Figure 13** : Schéma illustrant les étapes de préparation de la suspension sporale.....24

**Figure 14** : Schéma des étapes d'activité antifongique par la méthode de micro-atmosphère.....26

**Figure 15** : Photographies des différentes étapes suivies dans le test *ex vivo* sur les pommes.....27

**Figure 16** : Aspect des huiles essentielles d'*E. globulus* et *E. radiata*.....29

**Figure 17** : Activité de DMSO et des Antibiotiques sur les souches bactériennes AX : Amoxicilline ; AM : Ampicilline ; P : Pénicilline.....30

---

---

<b>Figure 18</b> : Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE d' <i>E. globulus</i> .....	31
<b>Figure 19</b> : Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE d' <i>E. radiata</i> .....	31
<b>Figure 20</b> : Diamètres moyens des zones d'inhibition obtenues sur les souches bactériennes sous l'action des huiles essentielles.....	32
<b>Figure 21</b> : Comparaison des diamètres moyens des zones d'inhibition d' <i>E. coli</i> et de <i>B. subtilis</i> par les HE d' <i>E. radiata</i> et d' <i>E. globulus</i> .....	33
<b>Figure 22</b> : Résultats de l'activité des HE d' <i>Eucalyptus</i> sur <i>P. aeruginosa</i> par la méthode de Micro-atmosphère.....	35
<b>Figure 23</b> : Résultats de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	37
<b>Figure 34</b> : Activité antifongique de l'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i> .....	38
<b>Figure 25</b> : Diamètres moyens des zones d'inhibition des trois champignons par l'HE d' <i>E. globulus</i> .....	38
<b>Figure 26</b> : Diamètres moyens des zones d'inhibition des trois champignons par l'HE d' <i>E. radiata</i> .....	39
<b>Figure 27</b> : Comparaison des diamètres moyens des zones d'inhibition des champignons par les HE d' <i>E. radiata</i> et d' <i>E. globulus</i> .....	40
<b>Figure 28</b> : Résultats de l'activité des HE d' <i>Eucalyptus</i> sur <i>Aspergillus niger</i> et <i>A. alternata</i> par la méthode de Micro-atmosphère.....	42
<b>Figure 29</b> : Résultats de l'activité des HE d' <i>Eucalyptus</i> sur <i>Aspergillus niger</i> et <i>A. alternata</i> par la méthode de Micro-atmosphère.....	43
<b>Figure 30</b> : Activité synergique (EG+ER) sur <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> .....	44
<b>Figure 31</b> : Effet des huiles (pures, diluées et mélangées) sur les souches bactériennes.....	45
<b>Figure 32</b> : Activité synergique (EG+ER) sur les champignons testés.....	46
<b>Figure 33</b> :4 Effet de l'huile (pure, déflué et synergie) sur les champignons.....	46

**Figure 34 :** Aspect des surfaces de lyse obtenues sur des pommes infectées par *A. niger* et traité par des huiles d'eucalyptus.....47

**Figure 35 :** Les valeurs des surfaces de lyse obtenues sur des pommes infectées par *A. niger* et traité par des huiles d'eucalyptus.....47

**Figure 36 :** Pourcentages d'inhibition de la dénaturation protéique par l'huile essentielle d'*E. radiata* et de diclofénac sodique.....49





**Liste des tableaux**

**Tableau I.** Les principaux composants chimiques des huiles essentielles, leurs propriétés et leurs toxicités.....11

**Tableau II.** Nature de l'activité antibactérienne des huiles essentielle.....34

**Tableau III.** Concentrations minimales inhibitrices des quatre HEs (exprimée en mg/ml).....36

**Tableau IV.** Nature de l'activité antifongique des huiles essentielles.....41

**Liste des abréviations**

**AO** : Albumine de l'œuf

**CMB** : Concentration minimale bactéricide

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde

**EG** : *Eucalyptus globulus*

**ER** : *Eucalyptus radiata*

**HE** : Huile essentielle

**LB** : Luria-Bertani

**MH** : Mueller Hinton

**PDA** : Potato dextrose agar

**TSA** : Trypto-caséine soja

### Introduction

Les vertus des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis des siècles par un grand nombre de civilisations. Leurs usages à des fins thérapeutiques rencontrent aujourd'hui un regain d'intérêt lié au désir de revenir aux principes de la nature. Ces plantes représentent un intérêt économique grandissant dans les domaines pharmaceutique, agro-alimentaire, cosmétique et agricole (Guemache, 2021).

L'aromathérapie, une expression créée par un chercheur lyonnais «René-Maurice Gattefossé» en 1928, désigne l'art de la guérison avec des huiles essentielles (Iserin, 2001). Ces dernières sont utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques ; antibactériennes, anti-inflammatoires, antioxydantes, antiseptiques, antivirales, antifongiques, mucolytiques, cicatrisantes,...(Soualeh, 2016).

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus efficaces dans le traitement des maladies infectieuses, depuis leur découverte au 20<sup>ème</sup> siècle. Ils ont considérablement réduit la menace posée par les maladies infectieuses (Martinez, 2014). Toutefois, peu de temps après, l'usage excessif et anarchique de ces produits a contribué à l'émergence de souches résistantes, voire multi-résistantes (Chibane, 2019). L'évolution continue de cette résistance dans le temps a entraîné une diminution de l'efficacité des antibiotiques, et ce phénomène est maintenant devenu un véritable problème de santé publique (O'Neill, 2014).

Les huiles essentielles sont l'un des principaux métabolites sur lesquels les chercheurs se sont concentrés (Bakkali, 2008). Leurs propriétés antimicrobiennes, ont été rapportées dans plusieurs études indiquant ainsi, qu'elles peuvent servir d'outil puissant pour réduire les agents pathogènes et les bactéries multi-résistantes (Stefanakis, 2013).

L'Algérie par sa position biogéographique dispose d'une grande diversité écologique et floristiques, estimées à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% sont endémiques et restent très peu explorées, tant sur le plan phyto-chimique que sur le plan pharmaceutique (Daira, 2016). La valorisation de ces plantes demeure un domaine de grande importance pour le pays. Cette utilisation repose en grande partie sur l'idée que les plantes sont des moyens naturels de guérison pour soulager la souffrance et améliorer la santé humaine (Bouacheriene et Benrabia, 2017).

Dans ce présent travail, l'objectif principal est de vérifier le pouvoir antibactérien, antifongique et anti-inflammatoire des huiles essentielles de deux plantes aromatiques (*Eucalyptus radiata* et *Eucalyptus globulus*). Dans ce document nous allons cerner la problématique, détailler les protocoles suivis et rapporter les résultats obtenus, tout en les discutant.

## **1 Généralités sur les huiles essentielles**

### **1.1 Définition**

Les huiles essentielles sont des substances volatiles, obtenues à partir des structures présentes chez les plantes aromatiques dans tous les organes végétaux (fleurs, feuilles et écorces), elles sont synthétisées par ces plantes comme métabolites secondaires et sont habituellement à l'origine de l'odeur caractéristique de celles-ci. Elles assurent également plusieurs fonctions au sein de ces plantes, comme la défense contre les prédateurs (micro-organismes, champignons, insectes, herbivores), protection contre le stress abiotique, inhibition de la germination et de développement d'autres espèces végétales dans leur voisinage (effet allélopathique), etc. (Bouyahya et al., 2016).

### **1.2 Propriétés physico-chimiques des Huile Essentielles**

Les constituants aromatiques de toute huile essentielle sont des molécules connues et biochimiquement définies. Ce sont ces éléments aromachimiques des huiles essentielles qui leur confèrent leurs propriétés spécifiques, (Baudoux, 2017)

- ✓ Liquides à température ambiante, rarement visqueuses aux faibles températures (10°C), certaines cristallisent sans aucune altération chimique et indiquent une très bonne qualité du produit.
- ✓ Volatiles, ce qui explique leurs caractères odorant et permet leurs entraînements à la vapeur d'eau.
- ✓ Presque toujours plus légères que l'eau, densité inférieure à 1 et non miscibles avec l'eau, ce qui permet leurs séparations aisées dans l'essencier de manière totalement naturelle et spontanée.
- ✓ Elles sont diversement colorées : bleu foncé, rouge brun, vert pale, vert émeraude, orange de la mandarine, jaune pâle, jaune brun, etc. (Baudoux, 2017).

### **1.3 Localisation et lieux de synthèse des huiles essentielles**

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux : feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits et graines (Bruneton, 1999). Les plantes aromatiques comportent trois catégories principales d'appareils sécréteurs

- ✓ Les poils glandulaires ;
- ✓ Les poches glandulaires ;
- ✓ Les canaux glandulaires ;

## **2 Activités biologiques des huiles essentielles**

### **2.1 Activités antimicrobiennes**

Les huiles essentielles présentent de nombreuses activités biologiques (Guessoum et Sayah, 2019), leurs propriétés antimicrobiennes sont utilisées empiriquement depuis des siècles. Les composés de ces huiles sont actifs et efficaces sur une large gamme de bactéries, champignons et levures (Hellal, 2011).

#### **2.1.1 Activités antibactériennes**

Les propriétés antibactériennes des HEs sont connues depuis longtemps, et de nombreux travaux ont confirmé leurs effets bactériostatiques et bactéricides contre des souches bactériennes pathogènes, même à des concentrations très faibles. Cette activité est influencée par plusieurs facteurs, tels que la composition chimique de l'HE testée, la souche test et la méthode utilisée (Delaquis et al., 2002). Cette activité dépend également des effets synergiques, additifs ou antagonistes entre les différents composés, ainsi que des composés minoritaires qui peuvent moduler l'action des autres constituants (Mourey et Canillac, 2002).

Les HEs ont plusieurs cibles dans la cellule bactérienne, elles peuvent avoir une action sur la paroi et induire la fuite des ions, agir sur les protéines, les acides gras membranaires et également les médiateurs du quorum sensing. Ces mécanismes peuvent être appliqués en même temps (Bouyahya et al., 2018).

- ***Action sur la membrane cellulaire***

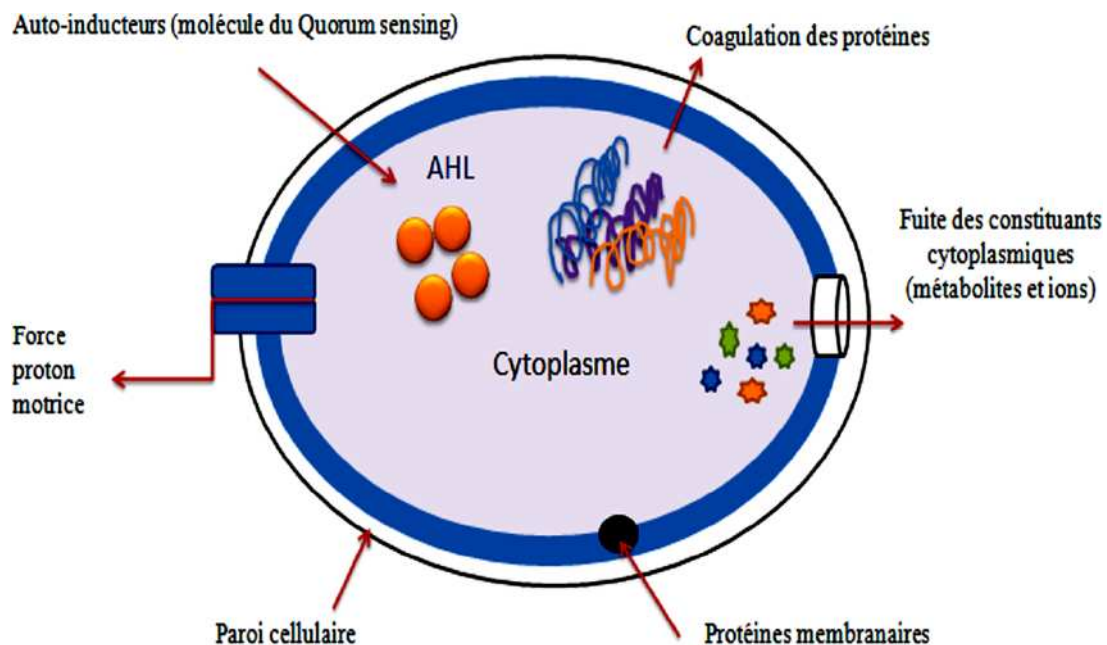
De nombreux mécanismes d'action sont basés sur l'interaction des composés bioactifs des HEs avec la membrane cellulaire (Benchaar et al., 2008), la nature lipophile de ces molécules leur permet de pénétrer dans la bicouche phospholipidique de la membrane cellulaire et de s'accumuler entre les phospholipides, provoquant ainsi des changements de conformation et une désorganisation au niveau de la membrane cellulaire, ce qui perturbe le transport membranaire des nutriments. Ce dernier peut également être perturbé en modifiant le gradient ionique des deux côtés de la membrane cytoplasmique, cependant, certaines souches bactériennes ont pu échapper à cet effet par l'utilisation des pompes ioniques (Cox et al., 2001).

- *Action sur les acides gras membranaires*

Le métabolisme des lipides chez les bactéries est une cible intéressante pour développer de nouvelles molécules antimicrobiennes (Heath et Rock, 2004). Les HEs sont de véritables candidats pouvant affecter la biosynthèse des lipides, et ainsi modifier la structure de la membrane cellulaire (Burt, Reinders , 2003). Les effets des huiles essentielles ne se limitent pas aux acides gras uniquement, mais ils peuvent également affecter les enzymes responsables de leur biosynthèse (Di Pasqua, 2007).

- *Action intra-celulaire*

Une fois à l'intérieur de la cellule bactérienne, les HEs peuvent affecter plusieurs processus vitaux pour la bactérie. Elles peuvent inhiber la division cellulaire (Domadia, et al., 2007) et perturber la synthèse des enzymes et des toxines. Les HEs peuvent également agir sur la synthèse de l'ATP et de nombreuses protéines essentielles pour la bactérie (Turgis, 2009).

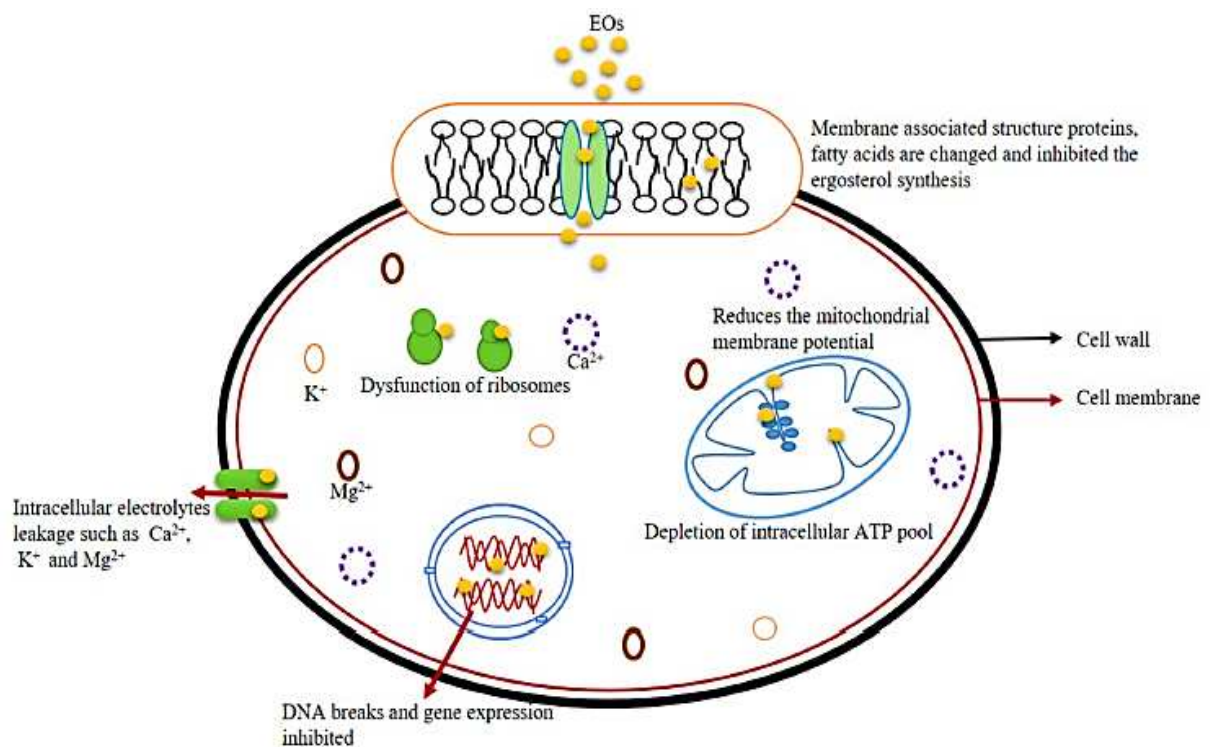


**Figure 1 :** Mécanismes d'action des HEs sur la cellule bactérienne (Bouyahya, et al., 2018)

### 2.1.2 *Activité antifongique*

Les champignons pathogènes partagent des similitudes avec leurs hôtes aux niveaux cellulaire et moléculaire, par conséquent, ils sont des cibles difficiles à atteindre. Dans le domaine phytosanitaire et agroalimentaire, les HEs ou leurs composés actifs peuvent être utilisées comme agents de lutte biologique contre les champignons phytopathogènes et les microorganismes envahissant les denrées alimentaires. L'activité antifongique des HE est liée à leur composition caractérisée par la présence d'une grande variété de composés chimiques bioactifs (terpènes, phénols, cétones, etc.) (Lis-Balchin, 2002).

Tout comme chez les bactéries, les HE peuvent agir sur plusieurs cibles dans la cellule fongique. Elles peuvent perturber la perméabilité membranaire et la chaîne respiratoire ; bloquer la croissance et la synthèse de molécules vitales ; inhiber la synthèse d'enzymes et de mycotoxines (Raut et Karuppayil, 2014).



**Figure 2 :** Mécanisme d'action des huiles essentielles sur les champignons  
(Maurya et al., 2021)



### **2.1.3 *Activité antioxydante***

Le stress oxydatif se produit lors d'un déséquilibre entre les niveaux d'oxydants et d'antioxydants dans un système biologique particulier. Ce déséquilibre peut être causé par des carences alimentaires en antioxydants, une surproduction endogène de substances pro-oxydantes, ou une exposition environnementale à ces dernières (Kulisici et al., 2004).

Les antioxydants peuvent inhiber ou retarder l'oxydation des substrats oxydable et cela semble être très important dans la prévention du stress oxydatif qui est considéré comme la cause principale de nombreuses maladies. L'effet antioxydant des HE est dû essentiellement à la présence de groupes hydroxyle dans leur structure chimique, plusieurs de leurs composés sont connus pour être de bons capteurs de radicaux libres (Bamoniri et al., 2010).

### **2.1.4 *Activité antivirale***

En général, les virus sont très sensibles aux molécules aromatiques. Les réponses classiques aux infections virales sont très limitées, faisant de l'HE une véritable alternative dans le traitement des maladies d'origine virale (Pierron, 2014).

### **2.1.5 *Activité anti-tumorale***

Le traitement du cancer a connu de véritables bouleversements et de nombreuses découvertes fondamentales ces dernières années. Plusieurs études cumulatives ont montré le potentiel anti-tumoral des produits naturels isolés à partir des plantes. L'HE et ses composés montrent une puissante activité anticancéreuse *in vitro* et *in vivo*. Cependant, leur mécanisme d'action n'a pas encore été élucidé (Bouyahya et al., 2016).

### **2.1.6 *Activité anti-inflammatoire***

Les plantes sont une source potentielle de molécules bioactives, faisant l'objet de recherches scientifiques rigoureuses pour leur éventuelle utilisation comme alternative, notamment pour prévenir la peroxydation lipidique et traiter les maladies inflammatoires. (Bourkhiss et al., 2010). Les propriétés cicatrisantes des huiles essentielles s'expliquent par la présence des cétones qui peuvent accélérer la vitesse de réparation des tissus. Certains mélanges d'huiles essentielles curatives sont souvent utilisés avec des huiles végétales telles que l'huile d'amande douce (Kellal et Lacete, 2018).

### **3 Méthodes d'extractions**

L'exploitation du potentiel chimique des plantes aromatiques nécessite l'extraction de composés spécifiques à partir d'espèces végétales sélectionnées. Vu la diversité des matières premières et les propriétés des huiles essentielles, ces dernières peuvent être obtenues par différents procédés d'extraction. Parmi ces procédés, on peut citer l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau, l'extraction par hydro-distillation, l'expression à froid, l'extraction par solvants organiques et l'extraction par des fluides supercritiques (Boudraa et al., 2021).

#### **3.1 Extraction par entraînement à la vapeur d'eau**

C'est l'une des méthodes officielles d'extraction des huiles essentielles (BOUKHATEM, 2019). Dans un système d'extraction, la matière végétale est exposée à des jets de vapeur sans macération préalable. Les vapeurs saturées en composés volatils sont condensées puis décantées avant de se séparer en une phase aqueuse et une phase organique. L'absence de contact direct entre l'eau et les plantes, ainsi qu'entre l'eau et les molécules aromatiques, évite les phénomènes d'hydrolyse et de dégradation qui peuvent affecter la qualité de l'huile essentiel (Raaman, 2006).

#### **3.2 Extraction par hydro distillation**

Elle consiste à immerger la matière première dans un bain-marie et à la porter à ébullition. Elle est généralement réalisée à pression atmosphérique. La distillation peut se faire avec ou sans mélange d'eau aromatique obtenue par décantation. Cette méthode présente l'inconvénient d'être principalement exposée à la vapeur ou à l'eau bouillante. Certains organes végétaux, notamment les fleurs, sont fragiles et ne supportent pas les procédés de vapeur et d'hydro distillation (Farhat, 2010)

#### **3.3 Expression à froid**

Cette technique est réservée à l'extraction des essences volatiles contenues dans les écorces d'agrumes en les broyant par un procédé mécanique. Elle consiste à casser ou écraser les parois des sacs oléifères contenus dans le mésocarpe juste en dessous de la peau du fruit afin d'en récupérer le contenu non altéré (Belsito, 2007).

#### **3.4 Extraction par solvant organique**

La technique "classique" d'extraction par solvant consiste à placer un solvant volatil et la matière végétale à traiter dans un extracteur. Grâce à des lavages successifs, le solvant se

charge en molécules aromatiques avant d'être envoyé au concentrateur pour distillation à pression atmosphérique.

L'utilisation limitée de l'extraction par solvant organique volatil est justifiée par son coût, ses problèmes de sécurité et de toxicité et la réglementation environnementale. Cependant, les rendements sont généralement plus élevés par rapport à la distillation, et cette technique évite les effets d'hydrolyse de la vapeur (Lucchesi, 2005)

### **3.5 Extraction assistée par micro-ondes**

La distillation assistée par micro-ondes fait actuellement l'objet de nombreuses recherches et est constamment améliorée en raison de ses nombreux avantages. C'est une technologie respectueuse de l'environnement qui économise de l'énergie et du temps, réduit l'investissement initial et minimise la pyrolyse et l'hydrolyse (Lucchesi, Chemat, & Smadja, 2004).

L'utilisation des micro-ondes est également un procédé d'extraction indépendant qui est encore en cours de développement. Le procédé consiste à placer des plantes dans un réacteur à micro-ondes sans ajout d'eau ni de solvants. L'échauffement interne de l'eau contenue dans la plante provoque le gonflement de ses cellules et la rupture des glandes et des couches d'huile. L'HE libérée s'évapore avec l'eau de la plante (Wang, et al. 2006).

### **3.6 Extraction par fluide à l'état supercritique**

L'originalité de la technique d'extraction par fluide supercritique, vient de l'utilisation de solvants à l'état supercritique. Dans des conditions de température et de pression où le solvant se trouve dans un état intermédiaire entre les phases liquide et gazeuse et présente des propriétés physico-chimiques différentes, notamment une solvabilité croissante (BOUKHATEM, 2019).

## **4 Domaines d'utilisation des huiles essentielles**

Les huiles essentielles sont très utilisées dans notre vie quotidienne en raison de leurs propriétés cosmétiques, thérapeutiques et organoleptiques. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines, principalement en parfumerie et cosmétique, dans le domaine agro-alimentaire (comme arôme et conservateur) et dans l'industrie pharmaceutique (Fillatre, 2011).

#### **4.1 Cosmétique et parfumerie**

Les huiles essentielles sont utilisées dans les parfums et les produits cosmétiques comme conservateur grâce à leurs propriétés antimicrobiennes qui permettent de prolonger la durée de conservation du produit (Fillatre, 2011).

#### **4.2 Pharmaceutique**

Les bienfaits thérapeutiques des huiles essentielles sont bien connus et utilisés surtout en Asie, ces produits naturels sont à la base de la médecine traditionnelle. En industrie pharmaceutique, les HE sont principalement utilisées pour fabriquer des formulations pharmaceutiques aromatisées, des antiseptiques et des produits de conservation (Fillatre, 2011). Elles sont de plus en plus utilisées dans diverses spécialités médicales telles que la Podologie, Ostéologie, Rhumatologie etc. (Feyrouz, 2022).

#### **4.3 Agro-alimentaire**

Dans les secteurs de l'industrie agroalimentaire, les HEs sont utilisées pour conserver, aromatiser et rehausser le goût des produits alimentaires. Les huiles essentielles ou leurs composés, sont utilisés à la fois pour leurs propriétés antimicrobiennes et antioxydantes (Dayan et al., 2009).

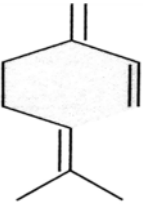
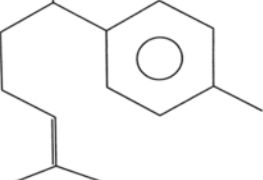
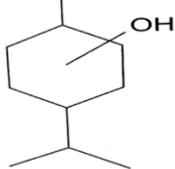
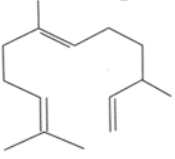
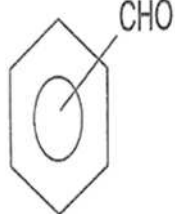
#### **4.4 Agriculture**

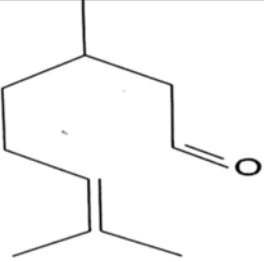
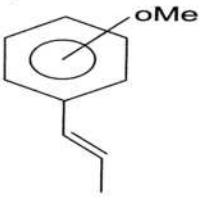
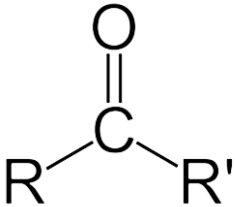
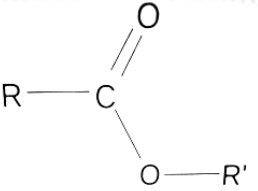
Ces dernières années, l'intervention politique a renforcé la volonté de réduire l'utilisation des pesticides de synthèse dans l'agriculture moderne. Dans ce contexte environnemental, les pesticides naturels, notamment ceux à base d'huiles essentielles, offrent une alternative intéressante pour protéger les cultures des différents agresseurs (Isman, 2000).

### **5 Structure, composition chimique et propriétés des huiles essentielles**

Les huiles essentielles ont une composition chimique diversifiée et très complexe. Leurs composés chimiques sont à l'origine de toutes leurs propriétés spécifiques (tableau I) (Baudoux, 2017).

**Tableau 1.** Les principaux composants chimiques des huiles essentielles, leurs propriétés et leurs toxicités (Koziol, 2015)

Composants chimiques	Propriétés	toxicités
<b>Monoterpènes</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Puissant antiseptique</li> <li>- Désinfectant atmosphérique</li> <li>- Antiviraux</li> <li>- Stimulants immunitaire</li> <li>- Décongestionnants respiratoires</li> <li>- Puissant anti-inflammatoire,</li> <li>- Stimulants digestifs</li> <li>- Stimulants et activateurs lymphatiques et sanguins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Irritant</li> <li>- Allergisant</li> <li>- Dermocaustique</li> </ul>
<b>Sesquiterpènes</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antiseptique de l'air</li> <li>- Décongestionnants des systèmes veineux</li> <li>- Respiratoires et lymphatiques</li> <li>- Antalgique par contact cutanée</li> <li>- Neurotonique</li> <li>- Anti inflammatoire</li> <li>- Hypotenseurs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Non toxique</li> </ul>
<b>Alcools mono-terpènes</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antibactériens</li> <li>- Antifongiques</li> <li>- Antiviraux</li> <li>- Antiparasitaires</li> <li>- Tonique généraux</li> <li>- Stimulants du système immunitaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Non toxique</li> </ul>
<b>Alcools sesquiterpènes</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tonique généraux et stimulants</li> <li>- Cardiotoniques</li> <li>- Décongestionnants veineux et lymphatiques</li> <li>- Immunostimulants</li> <li>- Positivant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peu toxique</li> </ul>
<b>Aldéhyde aromatiques</b> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Calmants</li> <li>- Sédatifs</li> <li>- Spasmolytiques</li> <li>- Antalgiques</li> <li>- Antibactériens</li> <li>- Antiviraux très puissant</li> <li>- Antifongiques</li> <li>- Antiparasitaires</li> <li>- Immuno-modulants</li> <li>- Tonique généraux</li> <li>- Stimulants des contractions utérines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Allergisant</li> <li>- Très dermostatiques</li> <li>- Hépatotoxiques</li> </ul>
Composants chimiques	Propriétés	toxicités
<b>Aldéhydes terpéniques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-inflammatoires</li> <li>- Sédatifs nerveux</li> <li>- Anti-infectieux</li> <li>- Antifongiques</li> <li>- Tonique digestifs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensibilisants</li> <li>- Dermocaustiques</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hypotenseurs</li> <li>- Odeur citronnée répulsif des moustiques</li> <li>- Antibactériens</li> <li>- Antiviraux</li> </ul>
<p><b>Phénols simple et phénols méthyl-éthers</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tonifiants à dose faible</li> <li>- Stomachiques</li> <li>- Antibactériens</li> <li>- Antifongiques</li> <li>- Antiparasitaires</li> <li>- Antiviraux</li> <li>- Antispasmodiques</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hépatotoxiques (déconseillé par voie orale)</li> <li>- certaines molécules sont abortives et neurotoxiques</li> </ul>
<p><b>Cétones</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antifongiques</li> <li>- Antiparasitaires</li> <li>- Antiviraux</li> <li>- Mucolytiques</li> <li>- Anti-hématome</li> <li>- Lipolytiques</li> <li>- Négativants</li> <li>- Pouvoir cicatrisant et régénérant du tissu cutané et muqueux</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Abortives</li> <li>- Neurotoxiques</li> </ul>
<p><b>Esters</b></p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antalgiques</li> <li>- Anti-inflammatoires</li> <li>- Hypotenseurs</li> <li>- Antispasmodiques</li> <li>- Sédatifs</li> <li>- Calmants</li> <li>- Négativants</li> </ul>

## 6 Toxicité des huiles essentielles

Les composés chimiques des substances naturelles peuvent avoir des effets indésirables sur l'homme au même titre que ceux des substances de synthèse. Certaines huiles essentielles contenant surtout des phénols et des aldéhydes peuvent irriter la peau, les yeux et les muqueuses, elles peuvent provoquer des réactions allergiques cutanées (Hayakawa, 1987).

Les HEs sont contre-indiquées aux enfants de moins de sept ans. Certaines sont interdites, il s'agit notamment des HEs riches en aldéhydes aromatiques (dermocaustiques, allergisantes et toxiques à fortes doses), les HEs riches en cétones (neurotoxiques), les HEs riches en phénols (fortes et trop agressives) et les HEs riches en terpènes.

Chez les asthmatiques, les HEs sont utilisées avec prudence. En effet, certaines molécules peuvent déclencher une crise d'asthme. D'après certains aromatoles, certaines HEs peuvent être utilisées par les femmes enceintes ou allaitantes, contrairement à celles riches en cétones, phénols et aldéhydes aromatiques, qui sont interdites (sauge officinale, romarin à camphre, menthe poivrée, etc.) (Koziol, 2015).

La partie expérimentale a été effectuée au sein du Laboratoire de Maitrise des Energies Renouvelables LMER (équipe biomasse et environnement) et du Laboratoire de Mycologie, Université de Bejaia, durant une période de trois mois (Mars-Mai 2023).

La récolte des plantes et l'extraction des huiles essentielles ont été réalisées durant le mois de février 2023, au sein de l'entreprise TERROIR SAHEL de Production des Huiles Essentielles, Végétales et de Macération "EURL TABELLOUT" AOKAS.

Dans cette étude, nous avons exploré les propriétés bénéfiques que l'on peut observer en utilisant des composés naturels. Nous avons évalué les activités biologiques (antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire) des huiles essentielles de deux plantes médicinales : *Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus radiata*.

Un test *ex vivo* est effectué dans le but de vérifier la capacité de nos huiles essentielles à protéger les pommes durant la période post-récolte.

### **1 Description du lieu de stage**

L'entreprise TERROIR SAHEL de Production des Huiles Essentielles, Végétales et de Macération, également connue sous le nom d'EURL TABELLOUT est située à AOKAS-Bejaia (Figure 7). Cette entreprise dispose d'un vapo-distillateur utilisé pour l'extraction des huiles essentielles à partir de différentes plantes par la méthode de l'entraînement à la vapeur d'eau. Cet établissement dispose également d'un broyeur de graines, utilisé pour extraire les huiles végétales utilisées dans la production de crèmes et autres dérivés.

Avant leur commercialisation, les HEs passent par diverses étapes de conditionnement qui sont comme suit :

- Les huiles sont versées soigneusement dans des flacons en verre ambré, ceci dans le but de les protéger de la lumière et de l'oxydation ;
- Les flacons sont ensuite étiquetés.
- Sceller hermétiquement les flacons pour maintenir l'intégrité et la fraîcheur de l'huile essentielle ;
- Stockage à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité ;





**Figure 3 :** Photographie de l'entreprise TERROIR SAHEL



**Figure 4 :** Photographie des différents produits de l'entreprise TERROIR SAHEL

## 2 Matériel

### 2.1 Matériel végétal

#### 2.1.1 *Eucalyptus globulus*

- **Classification botanique** (Goetz et Ghadira, 2012)

**Règne :** Plantae

**Division :** Tracheobionta

**Classe :** Dicotylédones

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Myrtaceae

**Genre :** *Eucalyptus*

**Espèce :** *Eucalyptus globulus*



**Figure 5 :** Photo de différentes parties de la plante d'*Eucalyptus globulus* (Erau, 2019)

#### 2.1.2 *Eucalyptus radiata*

- **Classification botanique** (Cronquist, 1981)

**Règne :** Plantae

**Embranchement :** Phanerogames

**Sous-Embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Eudicots

**Sous classe :** Rosids-Eurosids II

**Ordre :** Myrtales

**Famille :** Myrtacées

**Genre :** *Eucalyptus*

**Espèce :** *Eucalyptus radiata*



**Figure 6 :** Photo de différentes parties de la plante *Eucalyptus radiata* (Erau, 2019)

### **2.1.3 La récolte**

Les parties utilisées pour l'extraction de ces deux huiles sont les feuilles, les fruits verts et les petites tiges, au stade adulte. La récolte a été faite par Mr. YAHIAOUI Allaoua le responsable de l'entreprise de production des huiles essentielles et végétales "AURL TABELLOUT" en mois de Février à Tichy, Bejaia.

## **2.2 Souches microbiennes**

En vue d'étudier l'efficacité de l'activité antibactérienne et antifongique de nos huiles essentielles extraites des plantes aromatiques citées précédemment, six espèces microbiennes ont été utilisées. Les souches bactériennes ont été fournies par le laboratoire d'Ecologie Microbienne et les souches fongiques sont une collection du laboratoire LMER, Université de Bejaïa.

### **2.2.1 Souches bactériennes**

- *Escherichia coli Oxa-48*
- *Bacillus subtilis*
- *Pseudomonas aeruginosa*

### **2.2.2 Champignons**

- *Penicillium sp.*
- *Aspergillus niger*
- *Alternaria alternata*

## **3 Méthodes**

### **3.1 Extraction des huiles essentielles**

La méthode utilisée pour l'extraction des huiles essentielles du végétal est l'entraînement à la vapeur d'eau (Figure 9 et 10). Les étapes suivies pour l'extraction sont comme suit :

- ✓ Nettoyer bien l'appareille pour éliminer tout type de résidus ;
- ✓ Placer de manière homogène 25kg de la matière végétale d'eucalyptus (les feuilles, les fruits verts et les petites tiges) préalablement nettoyée et séchée à l'ombre, dans la grille de la cuvette ;
- ✓ Remplir la chaudière avec 30 L d'eau du robinet ;
- ✓ Placer et bien fermer le couvercle de la chaudière et l'alambic qui sont reliés par un canal métallique qui permet le passage de la vapeur d'eau ;

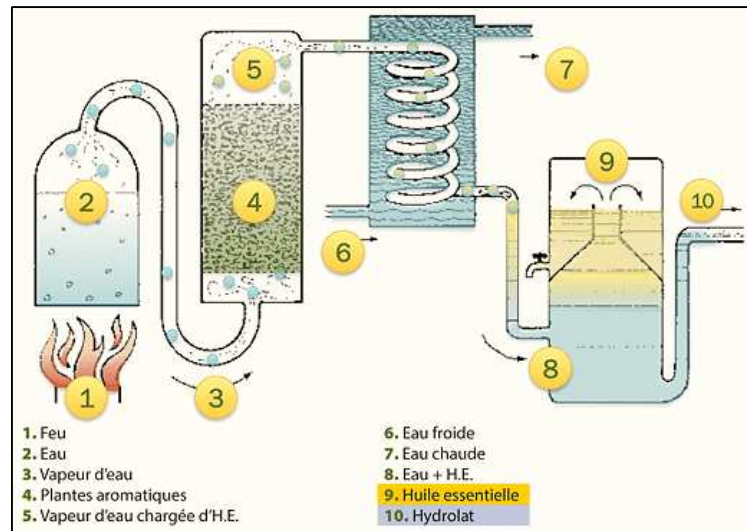
- ✓ Faire bouillir l'eau dans la chaudière afin de générer de la vapeur qui va par la suite réchauffer la plante puis transporter les composés volatiles et les entrainer jusqu'au condenseur ;
- ✓ Le chapiteau de l'alambic est équipé d'un col de cygne dont l'extrémité est reliée à un condenseur qui permet de condenser la vapeur d'eau chargée de l'huile essentielle ;
- ✓ Le distillat passe dans l'essencier et l'HE qui est non miscible dans l'eau et moins dense flotte à la surface ;
- ✓ L'huile essentielle est ensuite récupérée dans des flacons ambrés bien scellés à une température basse (4°C).

La procédure d'extraction commence après 2 heures de chauffage à 99°C° et la récupération de la totalité d'EH après 9h.



**Figure 7 :** Photographie illustrant les étapes d'extraction





**Figure 8** : Schéma de la vapo-distillation des huiles essentielles (Gratton, 2023)

Le rendement RE exprimé en (%) est la quantité d'extrait obtenue à partir d'une matière végétale utilisée, il permet d'estimer la production en huile essentielle des plantes (Dinzedi, 2015).

$$\text{RE (\%)} = (\text{Pd}_{\text{HE}} / \text{Pd}_v) \times 100$$

$\text{Pd}_v$  = Poids de la matière végétale utilisée.

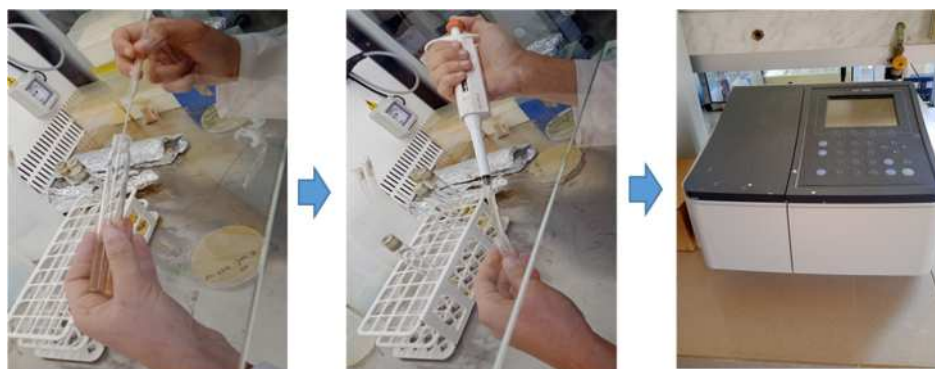
$\text{Pd}_{\text{HE}}$  = Poids d'huile essentielle extraite.

## 3.2 Activités antimicrobiennes des huiles essentielles

### 3.2.1 Activité antibactérienne

- **Préparation de la suspension bactérienne**

A partir d'une culture bactérienne jeune préparée préalablement, quelques colonies bien isolées sont prélevées puis introduites dans 10ml de bouillon nutritif BN (Annexe I). La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée au Vortex, et la densité optique de la solution est mesurée et ajustée afin d'obtenir une culture bactérienne entre 0.08 et 0.1 McFaland, l'équivalent de  $10^8$  UFC/ml à 630 nm.



**Figure 9 :** Photographie illustrant les étapes de préparation de la suspension bactérienne.

- **Préparation des huiles essentielles**

En plus de l'usage des huiles pures, une dilution D $\frac{1}{2}$  des deux huiles est préparée en mélangeant un volume de l'huile pure avec le même volume de DMSO (Diméthylsulfoxyde). Cette dilution est réalisée afin d'évaluer l'effet de la variation de la concentration des HEs sur les différentes activités.

L'effet de synergie entre ces deux huiles a également été vérifié. Le mélange est obtenu en additionnant le même volume de l'huile *Eucalyptus globulus* à celle d'*Eucalyptus radiata*.

Ainsi, les formulations testées sont les suivantes :

- ✓ EG Pure (*Eucalyptus globulus* pure) ;
- ✓ EG D $\frac{1}{2}$  (*Eucalyptus globulus* diluée) ;
- ✓ ER Pure (*Eucalyptus radiata* pure) ;
- ✓ ER D $\frac{1}{2}$  (*Eucalyptus radiata* diluée) ;
- ✓ EG+ER (*Eucalyptus globulus* pure + *Eucalyptus radiata* pure).

### **3.2.1.1 Méthode de diffusion sur agar**

La méthode de diffusion sur agar est utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des HE. Le test est réalisé selon la méthode de Laouer (figure 12), (Laouer, 2004).

Des boîtes de Pétri remplies de gélose Muller Hinton (annexe I) sontensemencées avec la suspension bactérienne standardisée par la technique d'écouvillonnage ;

- ✓ Des disques en papiers Watman stérile de 6mm de diamètre, sont imbibés par 10 µl de l'HE (EG pure, ER pure, EG D½, ER D½) puis déposés à la surface de la gélose ensemencée (Chaque boîte comporte trois dépôts d'HE de concentration similaire afin de garantir les mêmes conditions expérimentales) ;

Afin de valider les résultats, le test est réalisé en duplicata et des témoins positifs et négatifs sont préparés en parallèle

- **Témoin négatif** : Par dépôt de 10µl de DMSO sur chaque disque ensuite dépôt des disques dans les boites préalablement ensemencées avec la suspension bactérienne.
  - **Témoin positif** : Par dépôt de 3 disques d'antibiotiques (Ampicilline, Amoxicilline, Pénicilline) dans des boites ensemencées avec la suspension bactérienne.
- ✓ Les boîtes sont laissées environ 2h à température basse (4°C) puis incubées à 37°C pendant 24h ;
  - ✓ Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés.



**Figure 10** : Photographies des étapes de test d'activité par la méthode de diffusion sur agar.

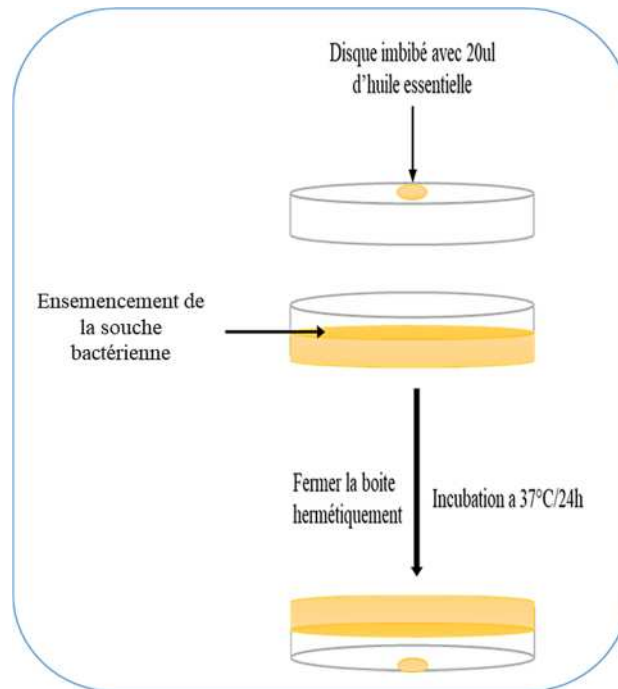
- **Détermination du mode d'action de l'activité (bactériostatique ou bactéricide)**

Pour déterminer du mode d'action de l'activité des HEs testées, des prélèvements au niveau des zones d'inhibition sont effectués puis transférés dans des tubes eppendorfs qui contiennent 1 ml de bouillon nutritif. Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

- L'apparition d'un trouble indique un effet bactériostatique
- L'absence de trouble indique un effet bactéricide.

### 3.2.1.2 Méthode de micro atmosphère

Les mêmes étapes du test de diffusion sont suivies pour la réalisation de ce test, la seule étape qui diffère est celle du dépôt des disques chargés de l'HE. Le disque chargé de 20µl de l'une des HE est fixé au centre du couvercle afin de vérifier l'activité de la fraction volatile (figure 13). Après incubation, la croissance des différentes souches est observée.



**Figure 11** : Schéma des étapes de l'activité antibactérienne par la méthode de micro-atmosphère

### 3.2.1.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI est la plus faible concentration de l'HE, pour laquelle la croissance bactérienne est inhibée. La technique utilisée pour la détermination de la CMI de nos huiles est celle de micro-dilution (figure 14) décrite par Ghavam et al. (2020) comme suit :

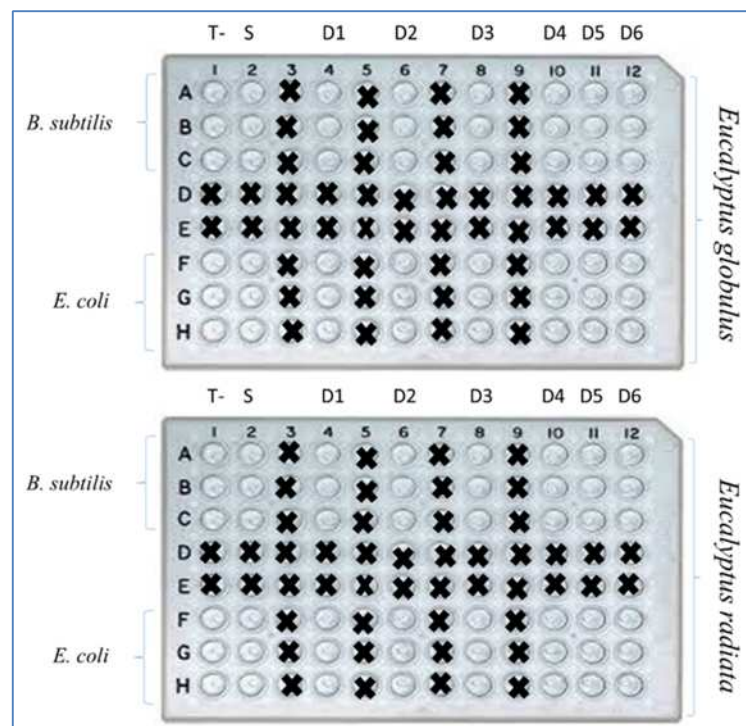
- Une solution mère d'HE (2 mg/ml) est préparée dans un mélange de BN et de DMSO, puis diluée de manière appropriée en utilisant le même mélange pour obtenir différentes concentrations (1000, 500, 250, 125, 62.5 mg/ml) ;
- Des microplaques stériles à 96 puits sont remplies avec 95 µl de milieu de culture, 5 µl de suspension bactérienne ( $10^8$  UFC/ml) et 100 µl d'huile essentielle à différentes concentrations ;



- Les microplaques sont par la suite incubées à 37 °C pendant 24 heures ;
- Afin de valider ces résultats, les puits de la première et la deuxième ligne verticale de la microplaque sont utilisés comme témoins.
- Après incubation à 37°C/24H, la CMI de chaque HE est déterminée, elle correspond au premier puits de la gamme de concentration, dépourvu de toute croissance bactérienne visuelle.

Remarque :

Chaque microplaque est utilisée pour le test d'une HE sur deux souches. Les puits des trois premières lignes horizontales de la microplaque sont utilisés pour tester la première souche (une ligne verticale correspond à une répétition) et les trois dernières lignes pour l'autre souche. Deux lignes horizontales sont laissées vides, afin d'éviter tout risque de contamination entre les deux souches. Ci-dessous une image illustrant les différentes étapes du test.



**Figure 12 :** Schéma de test de détermination de la CMI sur microplaque

T- : Témoin : BN non inoculé ; S: BN inoculé avec 10<sup>6</sup> UFC/ml de la culture bactérienne ; D : 100µl de BN inoculé avec 10<sup>6</sup> UFC/ml de la culture bactérienne + 100 µl de la dilution D de HE (D1 : 2 mg/ml ; D2 : 1 mg/ml ; D3 : 0.5 mg/ml ; D4 : 0.25 mg/ml ; D5 : 0.125 mg/ml ; D6 : 0.0625 mg/ml)

### 3.2.1.4 Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

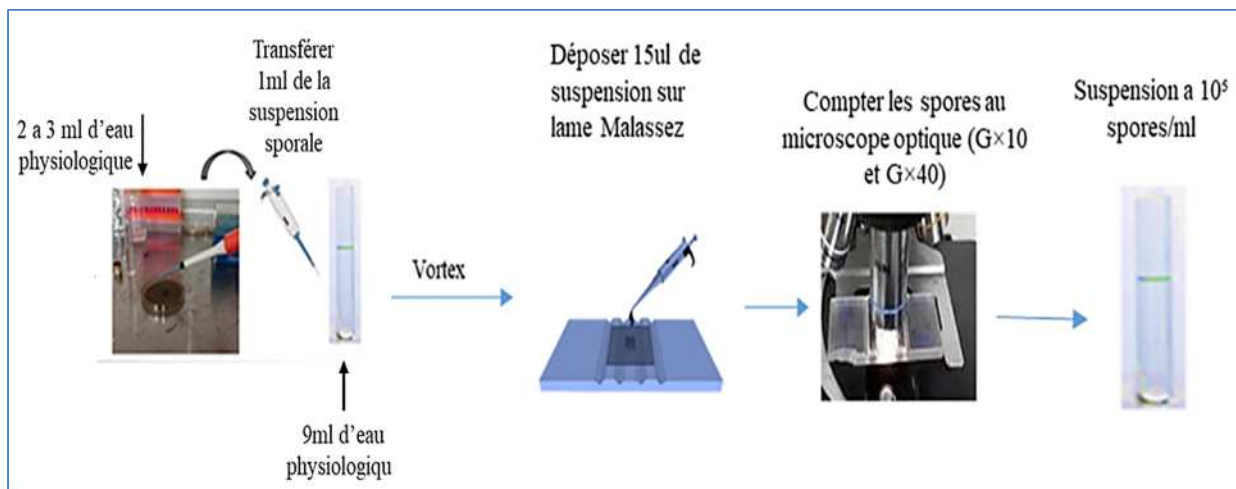
Les étapes permettant la détermination de la CMB des HE testées sont les suivantes :

- A partir des puits négatifs (aucune croissance bactérienne), prélever 50 $\mu$ l et les ensemercer dans des boites de Pétri contenant le milieu TSA (annexe I) ;
- Incubation des boites à 37°C pendant 24h ;
- La CMB correspond à la concentration la plus basse à laquelle aucun signe de croissance n'est observé.

### 3.2.2 Activité antifongique

- **Préparation de la suspension sporale**

Un volume d'eau physiologique d'environ 3 ml est versé dans une boîte de Pétri contenant l'une des souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium* sp.) âgée de 7jours. Par la suite, on procède au raclage superficiel à l'aide d'un râteau étaleur afin de récupérer les spores fongiques. La suspension sporale obtenue est ainsi récupérée par une micropipette puis diluée de façon à obtenir une concentration de 10<sup>5</sup> spore/ml.



**Figure 13** : Schéma illustrant les étapes de préparation de la suspension sporale

#### 3.2.2.1 Méthode de diffusion sur agar

La technique utilisée est la même que celle décrite dans la section (3.2.1.1). Le milieu utilisé est PDA et l'incubation est réalisée à 25°C pendant 72h.

- **Détermination de la nature de l'activité :**

Pour déterminer la nature de l'activité des HE testées, des prélèvements au niveau des zones d'inhibition sont effectués puis repiqués sur milieu PDA et incubés à 25°C / 72 h.

- L'apparition de la croissance mycélienne indique un effet fongistatique
- L'absence de la croissance mycélienne indique un effet fongicide.

### *3.2.2.2 Méthode de micro atmosphère*

Cette méthode est effectuée par l'inoculation d'une boîte de Pétri contenant le milieu PDA avec un disque de 5 mm de diamètre de l'un des champignons, puis un disque chargé de 20µl de l'une des HE est fixé au centre du couvercle afin de vérifier l'activité de la fraction volatile. Après incubation à 25°C pendant 72h, la croissance des champignons est observée et les diamètres sont mesurés.

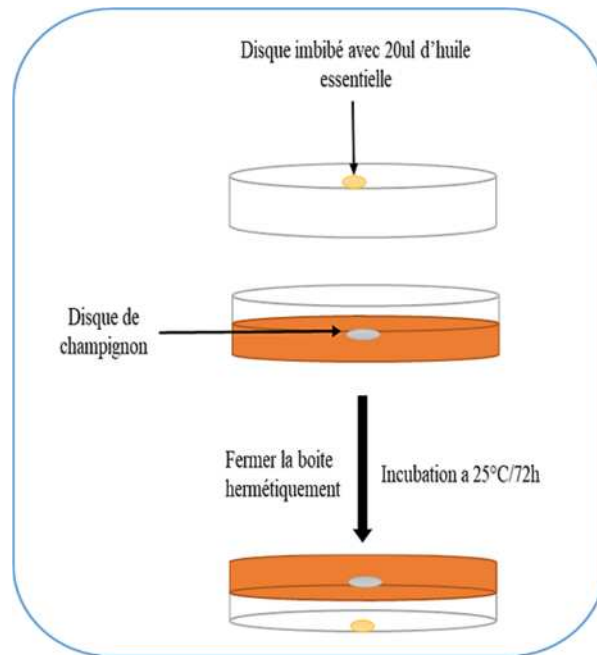
Le pourcentage d'inhibition est calculé en utilisant la formule suivante :

$$n = [(a-b)/a] \times 100$$

n : Pourcentage d'inhibition des champignons testés (%).

a : Diamètre moyen de mycélium dans la boîte de témoin (cm).

b : Diamètre moyen de mycélium dans les boîtes inoculées par les bactéries (cm).



**Figure 14 :** Schéma des étapes d'activité antifongique par la méthode de micro-atmosphère

### 3.3 Test d'activité antifongique *ex vivo* (sur pomme)

Afin de vérifier la capacité des deux huiles essentielles (EG pure et ER pure) à contrôler la croissance des champignons phytopathogènes *ex vivo*, l'espèce fongique *Aspergillus niger* et le fruit Pomme de variété *Golden Delicious* sont utilisés dans l'expérience. Le test est réalisé comme suit :

- ✓ Désinfecter les pommes sélectionnées par immersion dans une solution à 2% d'hypoclorite de sodium pendant 1 à 2 min, ensuite les laver avec de l'eau distillée stérile et les sécher à l'aide d'un papier absorbant stérile ;
- ✓ Réaliser deux puits dans la zone équatoriale de la pomme (3mm largeur x 3mm de profondeur) afin de pouvoir inoculer la suspension sporale et l'HE ;
- ✓ Mettre 30  $\mu$ l de l'HE dans chaque puit, laisser agir pendant 10 min puis rajouter 15 $\mu$ l de suspension sporale préalablement standardisée a  $7.10^5$  spore/ml ;
- ✓ Transférer les pommes traitées dans des boîtes stériles contenant du papier absorbant stérile humecté avec de l'eau distillé stérile (2 pommes par boîte) ;
- ✓ Incubation à 25°C pendant 7 jours ;
- ✓ Le test est réalisé en duplicata

***Les différents traitements :***

Test1 : inoculation avec 30 µl de l'HE puis ajout de 15 µl de la suspension fongique

Témoin 1 : inoculation avec 30 µl d'eau physiologique stérile

Témoin 2 : inoculation avec 30 µl de l'HE

Témoin 3 : inoculation avec 15 µl de la suspension fongique

Afin de mettre en évidence l'effet protecteur des huiles essentielles, les pommes sont photographiées et les surfaces de lyse sont mesurées par le logiciel Image J.



**Figure 15 :** Photographies des différentes étapes suivies dans le test *ex vivo* sur les pommes  
1-Humidification des boites ; 2- Réalisation des puits ; 3- Traitement ; 4-Transfert des pommes dans des boites ;  
5- Incubation

### **3.4 Activité anti-inflammatoire**

La capacité des HEs à protéger la protéine (ovalbumine OA) de la dénaturation induite par la chaleur est vérifiée par le test de dénaturation *in vitro*, décrit par Nea et al., (2019) avec quelques modifications. Ce test consiste à préparer 4 solutions d'un volume de 0.5 ml :

- La solution standard test : composée de 0,45 ml de la solution aqueuse d'OA à 2 % et de 0,05 ml de la solution de standard diclofénac sodique (médicament de référence) à différentes concentrations (10 mg/ml, 5 mg/ml et 1 mg/ml).
- La solution d'essai : composé de 0,45 ml de la solution aqueuse d'OA à 2 % et de 0,05 ml de l'HE à différentes concentrations (10 mg/ml, 5 mg/ml et 1 mg/ml).
- La solution contrôle : composé de 0,45 ml de la solution aqueuse d'OA à 2 % et de 0,05 ml de DMSO (control).
- La solution contrôle produit : composé de 0,45 ml de DMSO et de 0,05 ml de la solution de l'HE à différentes concentrations (10 mg/ml, 5 mg/ml et 1 mg/ml).

Toutes les solutions sont incubées à 37 °C pendant 20 minutes, puis à 57 °C pendant 3 minutes. Après refroidissement, 2,5 ml de tampon phosphate sont ajoutés aux solutions. L'absorbance est ensuite mesurée à 660 nm.

Le pourcentage d'inhibition est calculé selon la formule suivante (Chandra et al., 2012) :

$$\% \text{ Inhibition} = 100 ( V_t / V_c - 1)$$

Vt : solution d'essai

Vc : solution contrôle

### **3.5. Analyses statistiques**

Une analyse de la variance (ANOVA) est réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism® version 6.01. Dans le cas où des différences significatives sont détectées, le test de comparaison multiple des moyennes LSD est réalisé.

## 1 Caractéristiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles obtenues à partir des plantes d'*Eucalyptus radiata* et *Eucalyptus globulus* par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau, sont présentés dans la figure 16.



**Figure 16 :** Aspect des huiles essentielles d'*E. globulus* et *E. radiata*

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est de couleur jaune, dégage une odeur étouffante à forte dose et elle est légèrement camphrée et mentholée. L'huile essentielle d'*E. radiata* est de couleur jaune clair, caractérisée par un parfum frais, légèrement fruité et doux. Son arôme est souvent décrit comme plus doux et plus subtil que celui de l'*Eucalyptus globulus* (Bechaalany, 2014).

### 1.1 Rendement en huiles essentielles

Les rendements en huiles essentielles obtenus à partir de l'*E. radiata* et de l'*E. globulus* sont de 0,36% et 0,35% respectivement. Nous constatons que les valeurs des deux rendements sont presque similaires.

Nos résultats sont variables comparés aux résultats obtenus dans des études ultérieures. Les rendements obtenus dans notre étude sont inférieurs à ceux rapportés dans les études de, da Silva et al. (2006) ; Joshi (2012) et Selvakumar et al. (2012) qui ont obtenus des rendements de 0,77 % à 1,29 %. De plus Melo et al. (2007) rapporte que l'HE de *Eucalyptus* donne des rendements qui varient de 0,4–1,1%. Sharma, et al., (2021) a trouvé que le rendement d'extraction d'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* était d'environ 0,133%.

## 2 Activité antimicrobienne des huiles essentielles

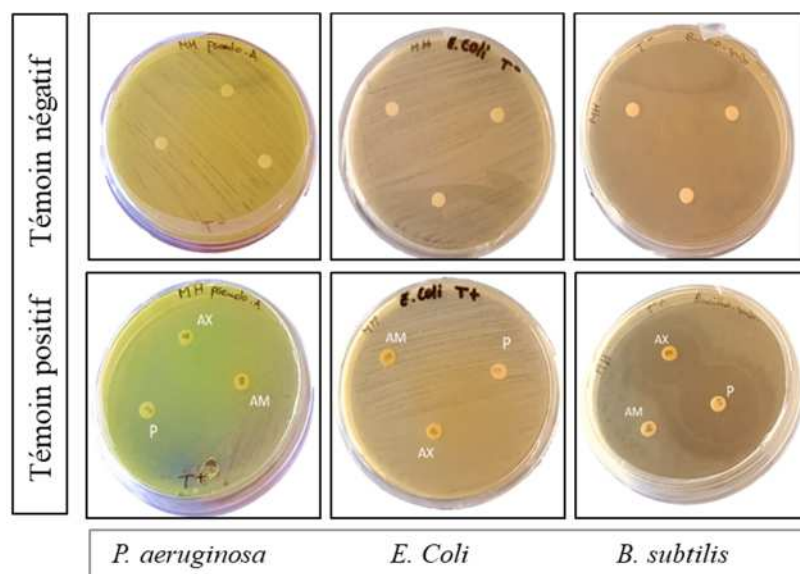
### 2.1 Activité antibactérienne

#### 2.1.1 Méthode de diffusion sur agar

La méthode de diffusion sur agar a été appliquée pour évaluer l'activité antimicrobienne des composés diffusibles des huiles essentielles. La sensibilité des souches microbiennes aux HE est évaluée selon le diamètre des zones d'inhibition (D) y compris le disque comme suite (Ponce et al., 2003), Boutabia et al., 2016).

- Non sensible (-) :  $D \leq 6$  mm
- Sensible (+) :  $7 \text{ mm} \leq D \leq 14$  mm
- Très sensible (++) :  $15 \text{ mm} \leq D \leq 19$  mm
- Extrêmement sensible (+++) :  $D \geq 20$  mm

La figure 17 représente les résultats de DMSO et des antibiotiques sur les souches bactériennes.



**Figure 17** : Activité de DMSO et des Antibiotiques sur les souches bactériennes

AX : Amoxicilline ; AM : Ampicilline ; P : Pénicilline

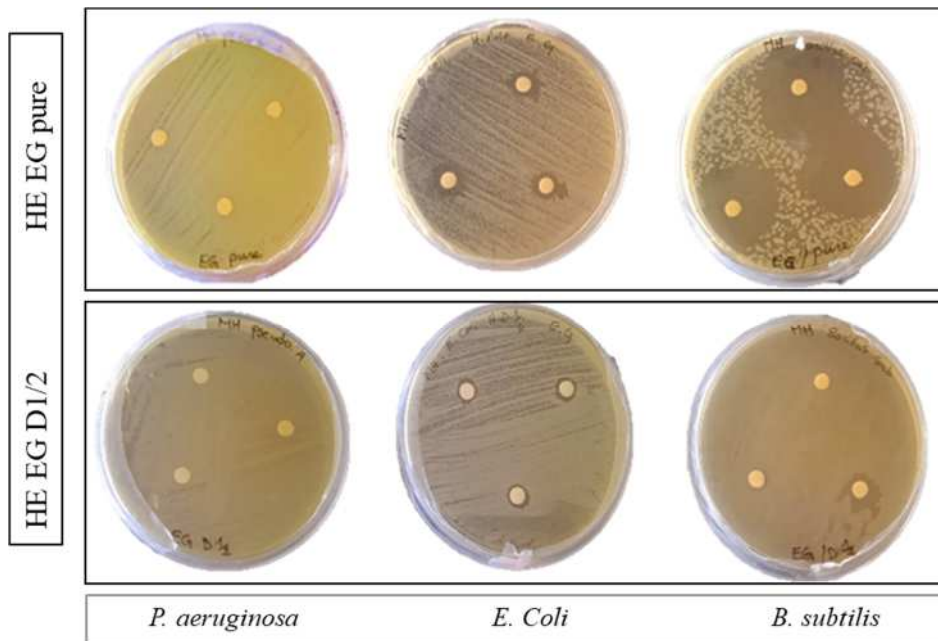
Les résultats obtenus montrent que le DMSO n'a pas d'activité antibactérienne sur les souches testées (témoin négatif).

D'après l'antibiogramme réalisé, on a constaté que la souche *Bacillus subtilis* est extrêmement sensible à l'amoxicilline, et à la Pénicilline, contrairement à l'ampicilline à

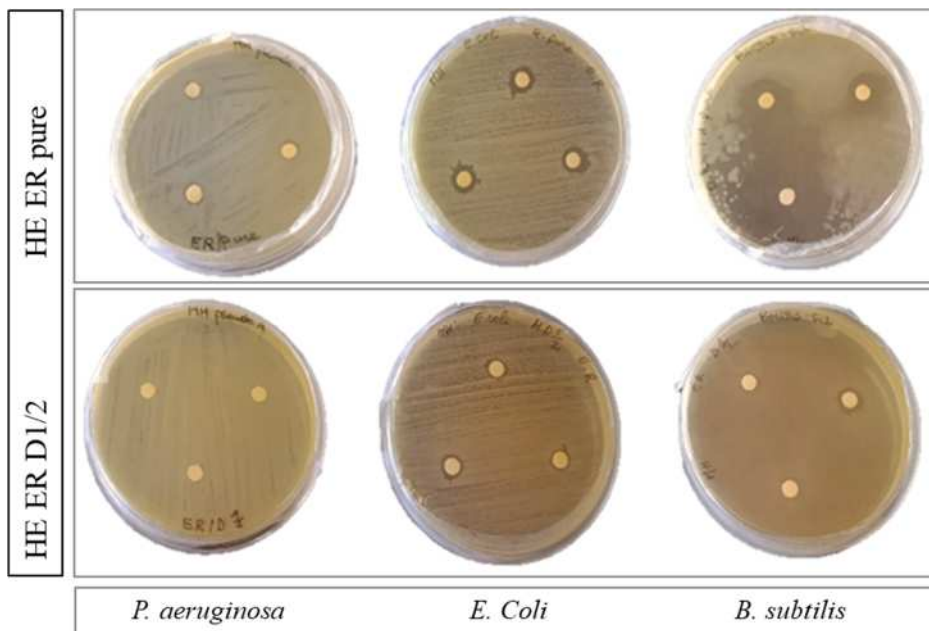


laquelle la souche semble être résistante, tandis que *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli* sont résistantes aux trois antibiotiques (témoin positif).

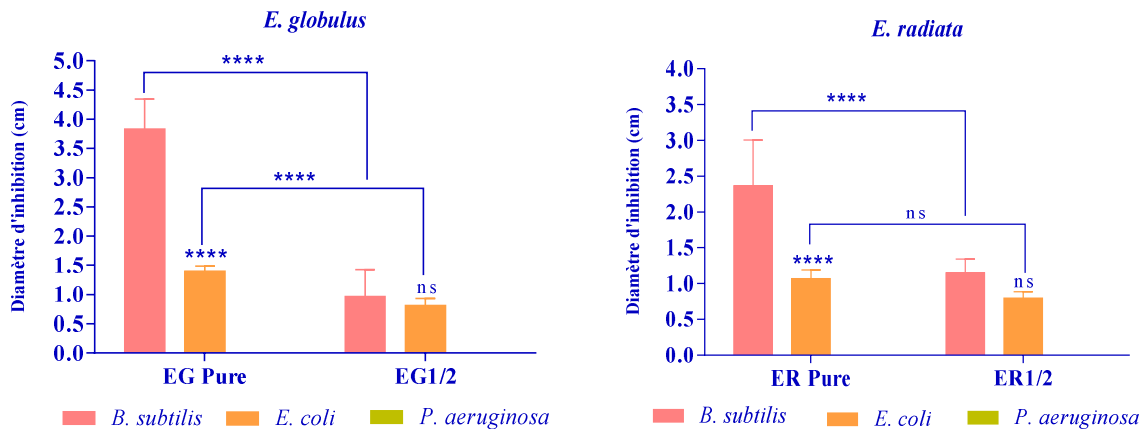
Les résultats de l'activité des huiles pures et des dilutions 1/2 testées sur les souches bactériennes sont présentés respectivement dans les figures 18 et 19.



**Figure 18 :** Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE d'*E. globulus*



**Figure 19 :** Résultats de l'activité antibactérienne de l'HE d'*E. radiata*

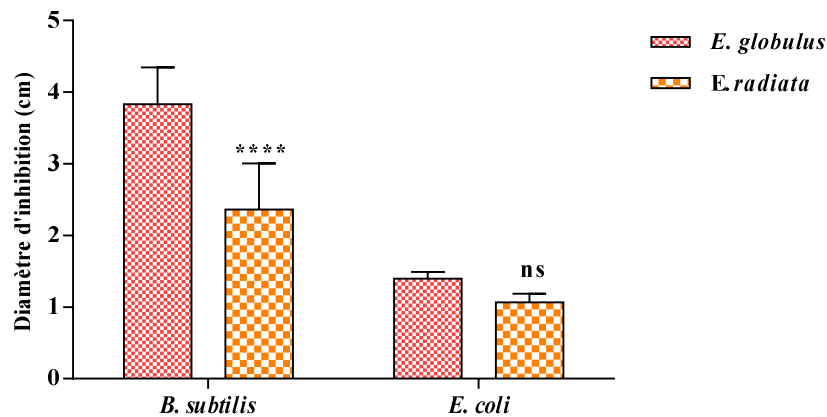


**Figure 20 :** Diamètres moyens des zones d’inhibition obtenues sur les souches bactériennes sous l’action des huiles essentielles

Les résultats obtenus montrent que l’effet antibactérien de nos huiles est proportionnel à la dilution ; les diamètres des zones d’inhibition augmentent avec l’augmentation de la concentration en huile essentielle. Pour l’huile *E. globulus*, les diamètres d’inhibition de *B. subtilis* et d’*E. coli* sont de  $3.83 \pm 0.51$  cm et  $1.4 \pm 0.09$  cm pour le pure et de  $0.96 \pm 0.46$  cm et  $0.81 \pm 0.11$  cm pour la D $\frac{1}{2}$  respectivement. Concernant l’huile *E. radiata*, les diamètres d’inhibition de *B. subtilis* et d’*E. coli* sont de  $2.36 \pm 0.63$  cm et  $1.06 \pm 0.12$  cm pour le pure et de  $1.15 \pm 0.19$  cm et  $0.80 \pm 0.09$  cm pour la D $\frac{1}{2}$  respectivement.

L’analyse statistique des données obtenus montre que l’effet de l’huile pure sur *B. subtilis* et *E. coli* est significativement ( $p \leq 0,0001$ ) supérieur à celui de l’huile diluée, excepté pour l’huile d’*E. radiata* sur *E. coli* où cette différence n’est pas significative. Sur *P. aeruginosa*, aucune activité n’a été observée ( $D \leq 6$  mm). Les diamètres mesurés montrent que la souche *Bacillus subtilis* est Extrêmement sensible aux deux huiles essentielles ( $D \geq 20$  mm), tandis que *E. coli*, est sensible ( $D \leq 14$  mm).

Le graphe ci-dessous représente une comparaison de l’effet antibactérien des deux HE *E. globulus* et *E. radiata* sur *B. subtilis* et *E. coli*.



**Figure 21 :** Comparaison des diamètres moyens des zones d’inhibition d’*E. coli* et de *B. subtilis* par les HE d’*E. radiata* et d’*E. globulus*

Les résultats obtenus montrent que les deux huiles ont une activité sur *E. coli* et *B. subtilis*. L’analyse statistique a montrés que l’HE d’*E. globulus* est significativement ( $p \leq 0,0001$ ) plus actif que celle de l’*E. radiata* sur *B. subtilis*. Cependant sur *E. coli*, la différence de l’effet antibactérien entre les deux huiles n’était pas significative ( $p > 0,05$ ).

La sensibilité des souches testées est variable, certaines souches se distinguent par une sensibilité plus élevée, c’est le cas de *B. subtilis*, d’autres, au contraire, présentent une résistance totale les deux huiles, c’est le cas de *P. aeruginosa*, qui d’après plusieurs études semble être résistante à un très grand nombre d’huiles essentielles. *P. aeruginosa* possède une résistance intrinsèque à une large gamme de biocides. Cette résistance est associée à la nature de sa membrane externe (Haddouchi et al., 2009).

Il a souvent été rapporté que les bactéries Gram-négatives sont moins sensibles aux huiles essentielles et à leurs composés que les bactéries Gram-positives. Cette sensibilité différentielle aux effets des huiles essentielles est attribuée à la présence de parois cellulaires lipopolysaccharidiques dans le groupe des Gram-négatif, qui limitent la diffusion des molécules hydrophobes et empêchent leur pénétration dans les cellules bactériennes (Burt, 2004).

Les huiles essentielles d’*Eucalyptus globulus* présentent un potentiel antibiotique remarquable en raison de leurs compositions riches en composés bioactifs (Bahadar et al., 2016). D’après Koziol, (2015) L’huile essentielle d’*Eucalyptus radiata* présente une composition chimique proche de celle de l’HE d’*E. globulus*, en particulier sa forte

concentration en 1,8-cinéole. L'huile d'*E. globulus* est particulièrement active contre *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *S.aureus*, *Enterococcus spp*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *P. mirabilis* et *E. aerogenes*. En revanche, elle est inactive sur *P. aeruginosa* et *E. Coli*. Mehani, (2015) a également rapporté que *P. aeruginosa* est résiste à l'huile essentielle d'eucalyptus ce qui concorde avec les résultats trouvé dans cette étude. Selon Dembélé et al. (2020), l'huile essentielle de l'*Eucalyptus* a montré une activité sur une large gamme de bactéries et la plupart à Gram négative telle qu'*E. coli*. Abdellah, (2013), affirme que la sensibilité d'un microorganisme, dépend de son type, de la composition chimique de l'huile essentielle.

➤ **Détermination de mode d'action de l'activité (bactériostatique/ bactéricide)**

Les résultats obtenus sur la nature de l'activité des HEs testées à l'égard des souches ayant présentées des zones d'inhibition après la réalisation de l'aromatogramme, sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau II :** Nature de l'activité antibactérienne des huiles essentielle

Souche	huile		Effet de l'activité
<i>E. coli</i>	EG	Pure	Bactériostatique
		D ½	Bactériostatique
	ER	Pure	Bactéricide
		D ½	Bactéricide
<i>B. subtilis</i>	EG	Pure	Bactériostatique
		D ½	Bactériostatique
	ER	Pure	Bactériostatique
		D ½	Bactériostatique

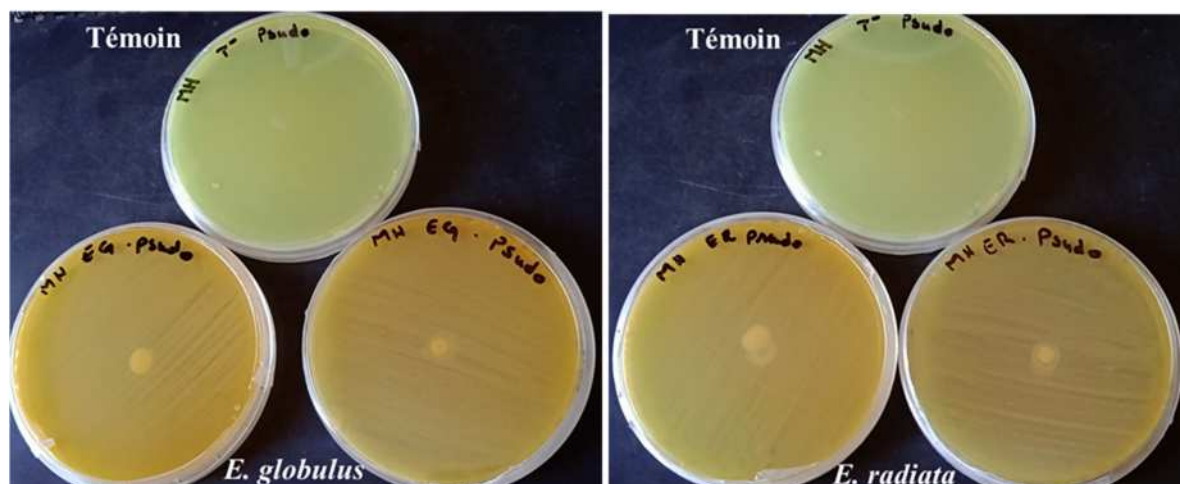
D'après ces résultats, l'huile d'*Eucalyptus globulus* pure ainsi que la dilution D $\frac{1}{2}$  ont un effet bactériostatique sur les deux souches *E. coli* et *Bacillus subtilis* tandis que l'huile d'*Eucalyptus radiata* pure et diluée ont un effet bactéricide à l'égard de la souche *E. coli* et bactériostatique sur *Bacillus subtilis*.

Le plus souvent, l'action des huiles essentielles est assimilée à un effet bactériostatique. Cependant, certains de leurs constituants chimiques semblent avoir des effets bactéricides. Cette activité antibactérienne des substances naturelles s'explique par la lyse des membranes bactériennes (Caillet et Lacroix, 2007). Les huiles essentielles, peuvent provoquer une fuite d'ions potassium au niveau de la membrane, entraînant des dommages irréversibles conduisant à la mort de la cellule (Benkherara et al., 2011).

Du fait de son hydrophobicité, l'HE exerce sa capacité antibactérienne en interférant avec la bicouche lipidique des cellules cibles, ce qui entraîne une perturbation de la perméabilité et une perte de composants cellulaires. De plus, cette réponse varie selon la nature de la bicouche lipidique, ce qui explique la résistance chez les bactéries Gram négatif (Burt, 2004).

### 2.1.2 Méthode de micro atmosphère

Les figure 22 représente l'activité des huiles essentielles d'*E. globulus* et d'*E. radiata* sur *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 22 :** Résultats de l'activité des HEs d'*Eucalyptus* sur *P. aeruginosa* par la méthode de Micro-atmosphère

Les résultats ont montré que les deux huiles ont un effet sur toutes les souches testées. Une diminution de la charge bactérienne est observée dans les boîtes contenant les disques des HE par rapport au témoin. On a remarqué également l'absence d'aspect vert dans la culture de *P. aeruginosa*, ce qui peut être expliqué par la perte de la capacité de production de ses pigments.

Les composés volatils présents en grande quantité dans l'huile d'eucalyptus, notamment les monoterpènes, jouent un rôle majeur dans son activité antimicrobienne. Les monoterpènes, tels que le 1,8-cinéole (eucalyptol), le limonène, le  $\alpha$ -pinène et le  $\beta$ -pinène, sont parmi les principaux composés de l'huile d'eucalyptus et sont souvent responsables de ses propriétés antibactériennes (Bendali et al., 2019).

Les recherches de Farah (2001) montrent que la sensibilité dépend de type de micro-organisme, de la concentration en huile essentielle et de la méthode utilisée. Mehani et Segni (2014) ont rapporté que les souches bactériennes peuvent présenter une sensibilité variable à l'huile essentielle d'eucalyptus. Dans leur étude, *Nitrobacter* s'est avérée très sensible, tandis qu'*E. coli* a montré une sensibilité moyenne et *P. aeruginosa* une sensibilité très faible. Le potentiel antibactérien des huiles essentielles extraites de différentes plantes a été largement étudié, mais leur mécanisme d'action n'a pas été élucidé en détail. En raison de la composition complexe des huiles essentielles, l'activité antimicrobienne ne peut pas être expliquée par un mode d'action unique, mais par de multiples mécanismes d'action au sein des cellules bactériennes (Burt, 2004).

### 2.1.3 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Le tableau III représente les résultats de la CMI observés sur les microplaques après 24h d'incubation.

**Tableau III :** Concentrations minimales inhibitrices des quatre HEs (exprimée en mg/ml)

Huile	Souches	Témoin -	Témoin +	D <sub>1</sub> 2mg/ml	D <sub>2</sub> 1mg/ml	D <sub>3</sub> 0.5mg/ml	D <sub>4</sub> 0.25mg/ml	D <sub>5</sub> 0.125mg/ml	D <sub>6</sub> 0.0625mg/ml
<i>E. radiata</i>	<i>B. subtilis</i>	---	+++	---	---	---	---	---	---
	<i>E. coli</i>	---	+++	---	---	---	---	---	---
<i>E. globulus</i>	<i>B. subtilis</i>	---	+++	---	---	---	---	---	---
	<i>E. coli</i>	---	+++	---	---	---	---	---	---

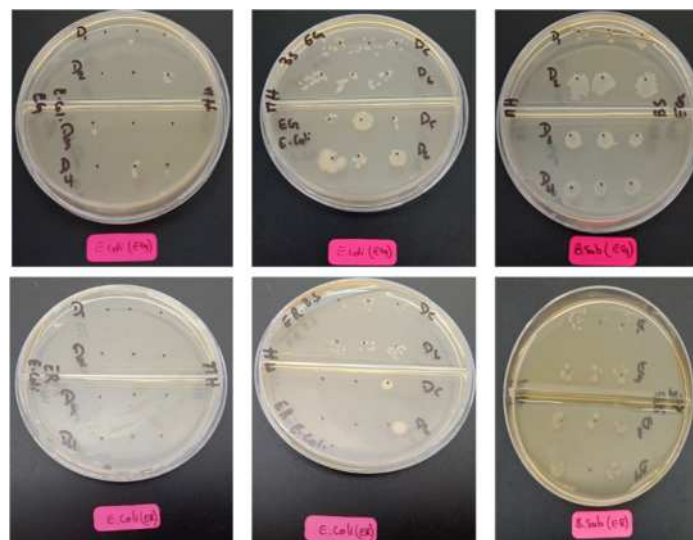
- : Absence de croissance ; + : Présence de croissance

D'après les résultats, on constate qu'il n'y a pas de croissance d'*E. coli* et de *Bacillus subtilis* traité par *Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus radiata* a toutes les concentrations testées, on peut alors affirmer que la concentration minimale inhibitrice de ces deux huiles est inférieure a 0,0625mg/ml.

Selon Mekonnen (2016), la CMI de l'HE d'*Eucalyptus* sur *S. aureus* est inférieure à 0.7 mg/ml. Damjanović-Vratnica et al. (2011), ont évalué l'activité antibactérienne des huiles essentielles d'*E. globulus* Labill et les résultats ont montré que l'HE avait une forte activité antibactérienne, notamment contre *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*. Les CMI des *P. aeruginosa* et *S. infantis* sont inférieures à 3,13 mg/ml celle des *S. aureus* ; d'*E. coli* et de *S. pyogenes* sont inférieures à 0,09 mg/ml. Salem et al. (2018), ont évalué la CMI de l'HE de l'*E. globulus* sur *Bacillus cereus* ATCC 14579 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Les CMI obtenues ont été inférieures à 2 mg/ml.

#### 2.1.4 Concentration minimale Bactéricide (CMB)

La figure 23 représente les résultats de l'évaluation des CMB des HEs d'*E. globulus* et *E. radiata* après 24h d'incubation.



**Figure 23** : Résultats de la concentration minimale bactéricide (CMB)

Selon les résultats obtenus, la croissance d'*E. coli* et de *B. subtilis* est observée dans toutes les dilutions d'*E. globulus* testées (effet bactériostatique), de ce fait la CMB est supérieure à 2mg/ml.



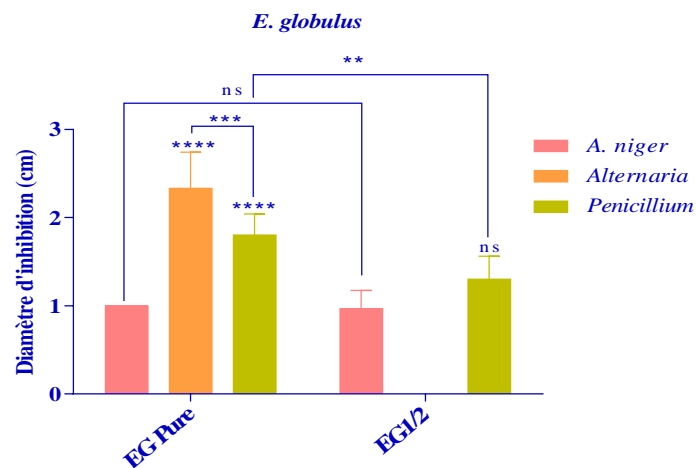
L'huile d'*E. radiata* sur la souche *Bacillus subtilis* a un effet bactériostatique, la CMB est supérieure à 2 mg/ml. Par contre, sur la souche *E. coli* il n'y a pas de croissance de la dilution 1 jusqu'à la dilution (effet bactéricide), la CMB est donc supérieure à 0.125 mg/ml.

## 2.2 Activité antifongique

Les résultats de l'activité des huiles pures et des dilutions 1/2 testées sur les souches fongiques sont présentés dans la figure 24 et 25.



**Figure 14 :** Activité antifongique de l'HE d'*Eucalyptus globulus*



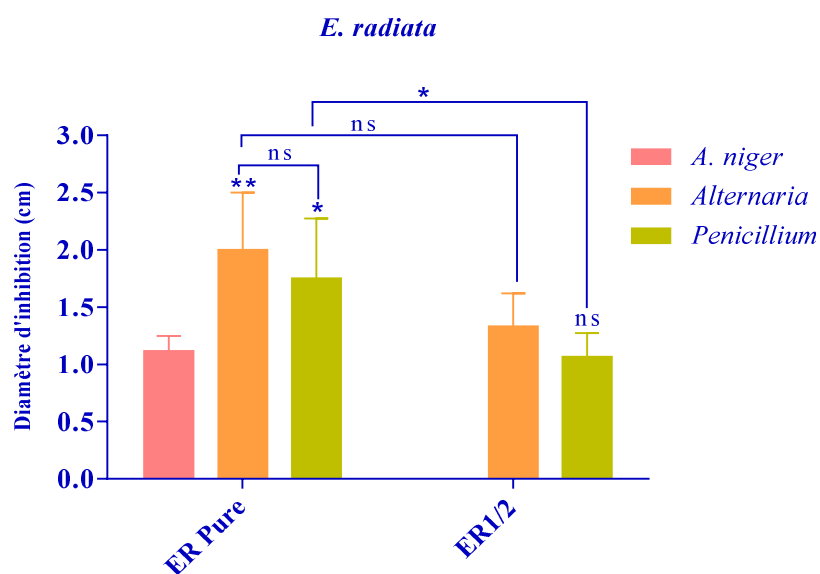
**Figure 25 :** Diamètres moyens des zones d'inhibition des trois champignons par l'HE d'*E. globulus*

D'après les résultats obtenus, l'huile d'*Eucalyptus globulus* a une activité antifongique sur tous les champignons testés.



Les résultats obtenus montrent que l'effet antibactérien de l'HE d'*E. globulus* est proportionnel à la dilution dans le cas de *Penicillium* sp. Les diamètres d'inhibition de l'huile pure et diluée sur *A. niger* sont de  $1 \pm 0,00$  cm et de  $0,96 \pm 0,2$  cm respectivement, la différence entre les deux mesures n'est pas significative. Sur *A. alternata*, l'effet s'est avéré plus important et très significatif ( $p \leq 0,0001$ ) comparé aux deux autres champignons, cependant, l'huile D1/2 n'a donné aucun effet sur *A. alternata*.

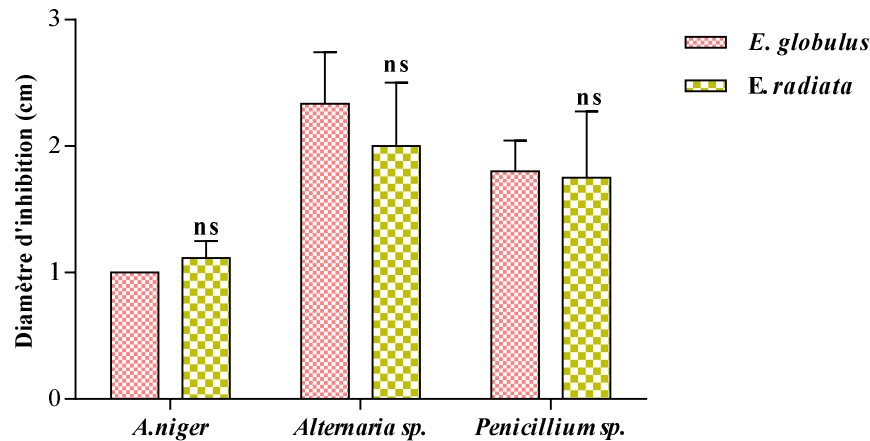
Le graphe 26 présente les résultats de l'activité de l'huile ER sur les souches fongiques.



**Figure 26 :** Diamètres moyens des zones d'inhibition des trois champignons par l'HE d'*E. radiata*

D'après les résultats obtenus, l'effet de l'huile d'*Eucalyptus radiata* est proportionnel à la dilution. Sur *A. alternata* la différence n'est pas significative ( $p > 0,005$ ), cependant sur *A. niger* et *Penicillium* sp., cette différence est significative ( $p \leq 0,005$ ). *A. alternata* s'est avéré le plus sensible à l'huile ER suivi de *Penicillium* sp. Puis d'*A. niger*.

Le graphe 27 représente une comparaison de l'effet antifongique des deux HE *E. globulus* et *E. radiata* sur les trois espèces fongiques.



**Figure 27 :** Comparaison des diamètres moyens des zones d’inhibition des champignons par les HEs d’*E. radiata* et d’*E. globulus*

Les résultats obtenus montrent que les trois champignons sont sensibles aux deux huiles. L’analyse statistique montre qu’il n’y a aucune différence significative ( $p > 0,005$ ) entre l’effet des deux huiles sur les champignons.

Cette différence du pouvoir antifongique de l’huile essentielle d’EG peut être attribuée à sa composition chimique constituée principalement du 1,8-cinéole qui est un oxyde terpénique (Hmiri, et al. 2011). Ces composants acides ont montré un potentiel inhibiteur important de la croissance mycélienne d’*Alternaria solani sorauer* et *Fusarium oxysporum* (Lu et al., 2008). L’activité antifongique offerte par le 1,8 cinéole était faible sur *A.niger* et n’a montré une activité qu’à des concentrations importantes, ceci peut être expliqué par le constituant majeur de l’huile qui n’est peut-être pas le seul composant responsable de la limitation de la croissance fongique. La croissance d’*Aspergillus* peut ne pas être sensible à un seul monoterpène, mais à un mélange de deux composés ou plus (Vilela et al., 2009).

D’après Viuda-Martos et al. (2011) l’un des facteurs affectant le potentiel antifongique des huiles essentielles est la concentration d’application. Une diminution de la concentration des huiles essentielles entraîne une diminution de leur capacité inhibitrice contre toutes les espèces fongiques. Van Hung et al. (2013), rapportent que la croissance mycélienne diminue avec l’augmentation de la concentration de l’huile essentielle. Cela est vérifié dans cette étude, où nous avons remarqué une augmentation significative de l’inhibition de la croissance mycélienne avec des concentrations croissantes. La diversité des composés antifongiques signifie nécessairement qu’il existe plusieurs mode d’action contre les pathogènes.

Les huiles essentielles affectent les cellules fongiques à travers plusieurs mécanismes tels que : la membrane cellulaire, le système enzymatique, le matériel génétique, le flux d'électrons, le transport actif et le contenu cellulaire (Burt et al., 2004 ; Oussalah et al., 2006).

➤ **Détermination de mode d'action de l'activité (fongistatique/ fongicide)**

Les résultats obtenus sur la nature de l'activité des HEs testées à l'égard des souches fongiques ayant présentées des zones d'inhibition après la réalisation de l'aromatogramme, sont présentés dans le tableau suivant.

**Tableau IV** : Nature de l'activité antifongique des huiles essentielles

Champignon		Huile	Effet de l'activité
<i>Alternaria alternata</i>	EG	Pure	Fongicide
		D ½	Fongistatique
	ER	Pure	Fongicide
		D ½	Fongistatique
<i>Aspergillus niger</i>	EG	Pure	Fongistatique
		D ½	Fongistatique
	ER	Pure	Fongistatique
		D ½	Fongistatique
<i>Penicillium sp.</i>	EG	Pure	Fongistatique
		D ½	Fongistatique
	ER	Pure	Fongistatique
		D ½	Fongistatique

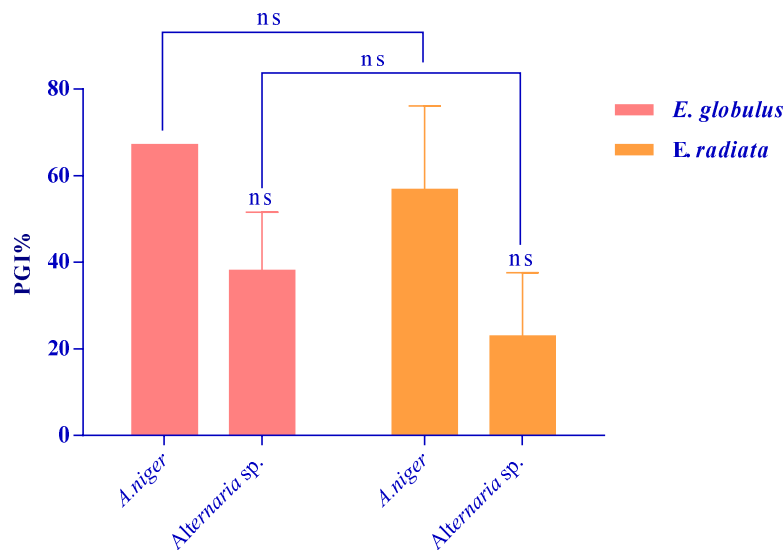
Les résultats obtenus montrent que les deux huiles pure EG et ER ont une activité fongicide *vis-à-vis* *A. alternata* et fongistatique à l'égard d'*A. niger* et de *Penicillium sp.*, la D1/2 des deux huiles ont un effet fongistatique sur les trois champignons.

Ces effets fongicides et fongistatique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus* ont été rapportés sur les mêmes espèces pathogènes et même sur d'autres champignons pathogènes, comme *Alternaria solani* et *Stemphylium solani* (Tomazoni et al., 2017 ; Moutassem et al., 2019). Selon des recherches antérieures, ces effets sont liés à la forte concentration de monoterpènes, sesquiterpènes, phénols aromatiques, oxydes, éthers, alcools, esters,

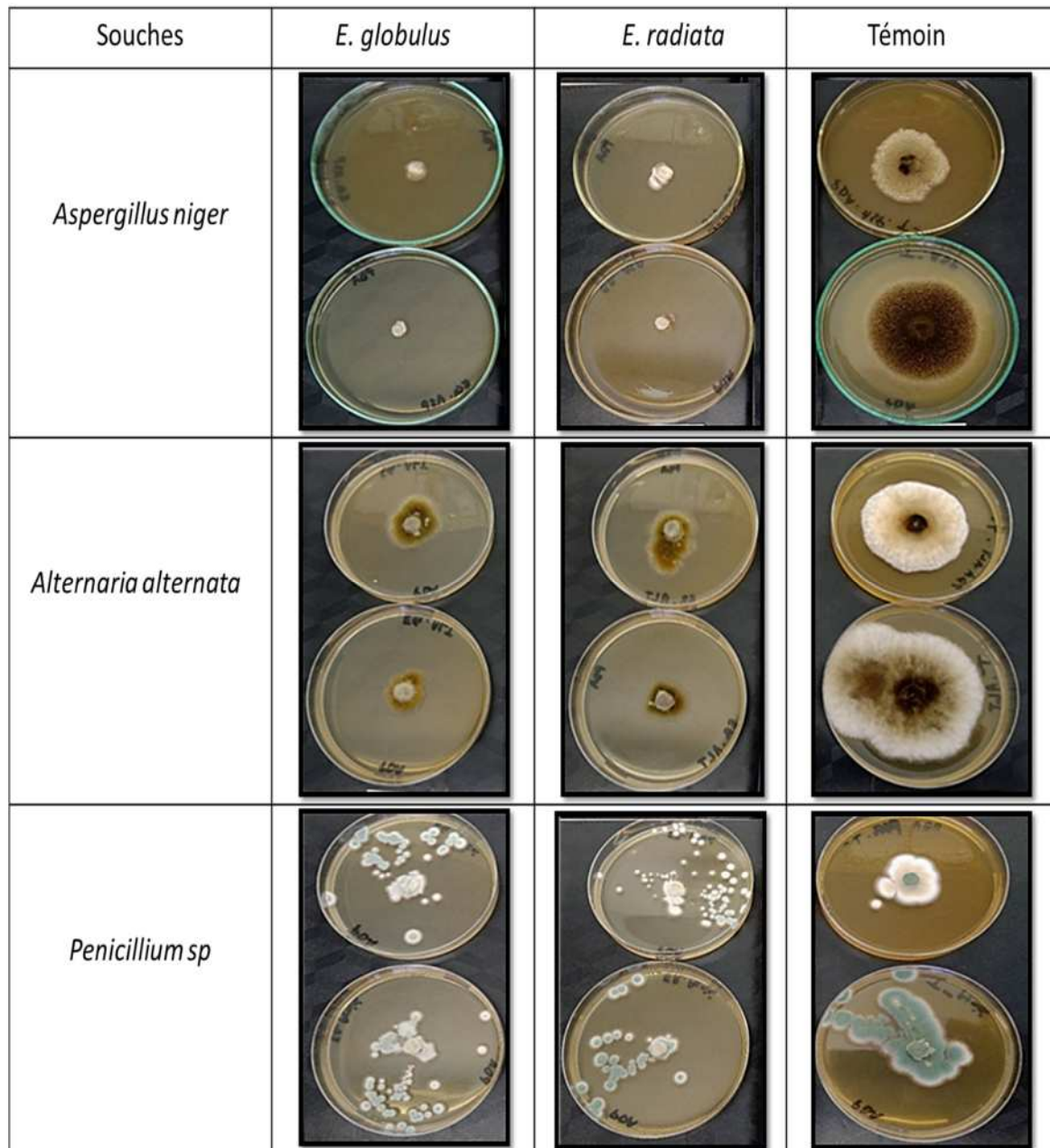
aldéhydes et cétones présents dans cette huile. Cependant, sa composition et ses proportions exactes varient selon les espèces végétales (Spadacino et al., 2021). L'activité fongicide de l'huile d'Eucalyptus est attribuée aux composants principaux tels que : 1,8-cinéole, citronellal, citronellol, acétate de citronellyle, p-cymène, eucalyptol, limonène, linalol, pinène, g-terpinène, a-terpinéol, alloocimène et dendrènes aromatiques (Liu et al., 2008). Ces effets sur la membrane mitochondriale empêchent le métabolisme énergétique mitochondrial, ce qui entraîne des perturbations dans de nombreux processus physiologiques et biochimiques de la cellule (Yoshimura, et al. 2010).

### 2.2.1 Méthode de micro atmosphère

Les figures 28 et 29 représentent l'activité des huiles essentielles d'*E. globulus* et d'*E. radiata* sur les espèces fongiques.



**Figure 28 :** Résultats de l'activité des HEs d'*Eucalyptus* sur *Aspergillus niger* et *A. alternata* par la méthode de Micro-atmosphère



**Figure 29 :** Résultats de l'activité des HE d'*Eucalyptus* sur *Aspergillus niger* et *A. alternata* par la méthode de Micro-atmosphère

Les résultats montrent que les deux huiles d'*E. globulus* et d'*E. radiata* pure ont une activité antifongique sur les deux champignons. On remarque aussi qu'elles ont plus d'effet sur *A. niger* que sur *A. alternata*. En comparant l'activité de l'huile EG et ER sur *A. niger* et *A. alternata* la différence est non significatif.

Les résultats obtenus par la méthode de micro atmosphère sont meilleurs que ceux obtenus par la méthode de diffusion sur agar. Par conséquent, on peut avancer l'hypothèse

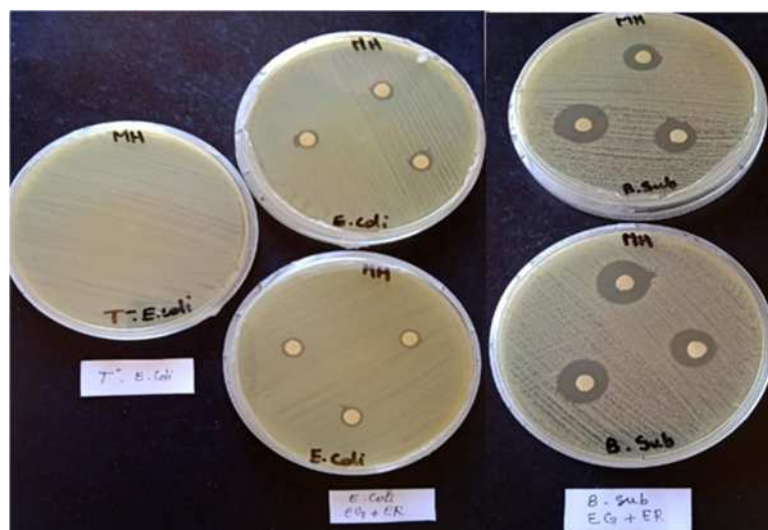
que les extraits des huiles essentielles testées contiennent un mélange de composés volatiles et que ces dernières sont responsables de l'activité antifongique.

Les propriétés antimicrobiennes des huiles essentielles peuvent être le résultat d'un certain équilibre de ses différents constituants. Les huiles essentielles d'eucalyptus sont des mélanges complexes de composés volatils qui présentent une activité antifongique en réduisant ou en inhibant complètement la croissance fongique. Baser et Buchbauer (2010) et Adouani (2021), considèrent que le choix de la technique d'évaluation de l'activité antifongique peut influencer les résultats obtenus. Les recherches de Vilela, et al. (2009) montrent que malgré que les concentrations testées soient les mêmes, le test de micro-atmosphère a montré une inhibition des champignons plus élevée que le test de diffusion sur agar. Zhongyuan et al. (2003), ont noté que l'huile essentielle de citronnelle était inactive contre neuf champignons dans la méthode de dilution, mais qu'elle inhibait la croissance de tous les champignons par la méthode micro-atmosphérique.

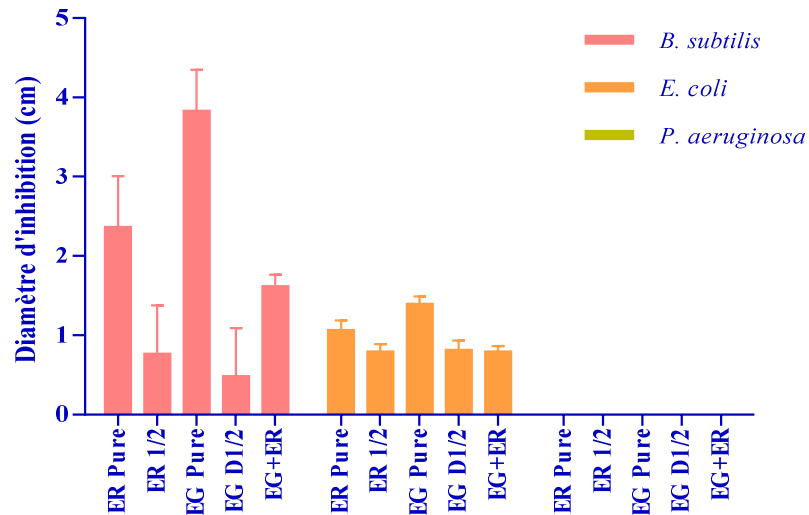
## 2.3 Activité synergique (EG+ER)

### 2.3.1 Activité antibactérienne

Les figures 30 représentent les résultats de l'activité du mélange des huiles essentielles d'*E. globulus* et d'*E. radiata* sur les espèces bactériennes.



**Figure 30** : Activité synergique (EG+ER) sur *E. coli* et *B. subtilis*



**Figure 31 :** Effet des huiles (pures, diluées et mélangées) sur les souches bactériennes

D'après les résultats obtenus, on remarque que le mélange des deux huiles a montré une activité antibactérienne sur les deux souches *E. coli* et *Bacillus subtilis* avec des diamètres moyens de  $0,8 \pm 0,06$  cm et de  $1,61 \pm 0,15$  cm respectivement, par contre il n'a aucun effet sur *Pseudomonas aeruginosa*.

En comparant l'effet du mélange des deux huiles aux huiles toutes seules, on constate que ce mélange donne moins d'effet antibactérien sur les deux souches testées. Dans le cas de nos huiles, il semble y avoir un effet antagoniste entre les composants des deux huiles.

Selon Hyldgaard, et al. (2012), cet effet se produit lorsque des composés bactéricides et bactériostatiques sont utilisés en combinaison : il peut y avoir une compétition au site d'action, réduisant ainsi l'effet antibactérien des huiles. Ce phénomène dépend de la composition des huiles essentielles, puisque de nombreuses études ont montré que certaines huiles essentielles avaient une meilleure efficacité antibactérienne que les mélanges de leurs principaux principes actifs (Burt, S. 2004). Ce résultat peut s'expliquer en considérant que l'activité des composants majoritaires est modulée par l'activité des composants minoritaires et/ou qu'ils sont directement inefficaces mais peuvent altérer les propriétés du mélange.

### 2.3.2 Activité antifongique

Les figures 32 et 33 représentent les résultats de l'activité du mélange des huiles essentielles d'*E. globulus* et d'*E. radiata* sur les espèces fongiques.





Figure 32 : Activité synergique (EG+ER) sur les champignons testés

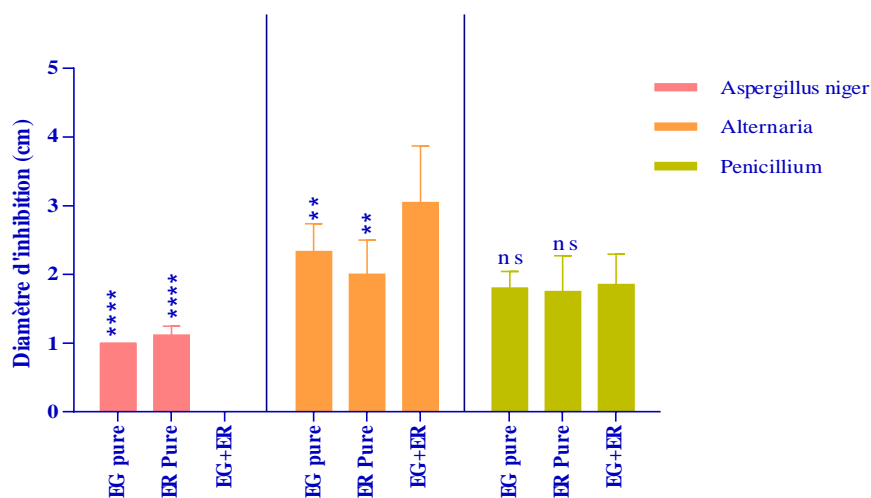


Figure 33 :2 Effet de l'huile (pure, déflué et synergie) sur les champignons

Selon les résultats obtenus, on a constaté que le mélange des deux huiles a un effet synergique significatif ( $p < 0.01$ ) sur *A. alternata* avec un diamètre de  $3,05 \pm 0,082$  cm. Sur *A.niger* le mélange n'a donné aucun effet. Concernant *Penicillium* sp. Aucune différence significative n'a été obtenue entre l'effet antifongique des huiles pures et du mélange.

Les travaux de Chebli et al. (2003) et Vilela et al. (2009), ont montré que la pulégone pure et le 1,8-cinéole présents dans l'*Eucalyptus* inhibent la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées que l'huile essentielle entière (Ouraïni, et al., 2007). L'association des principaux actifs agirait en synergie pour améliorer l'activité antimicrobienne de l'HE. Ces différences qualitatives et quantitatives dans la composition chimique des huiles essentielles peuvent être dues à plusieurs facteurs (Toudonou et al., 2021). Il est clair que l'influence des composés minoritaires n'est pas toujours négligeable.



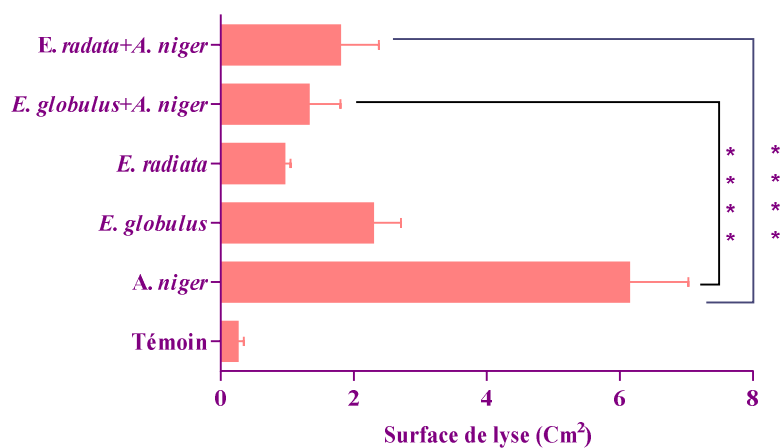
Des phénomènes synergiques entre différents composants peuvent être à l'origine d'une activité beaucoup plus forte (Farah, et al 2001).

### 3 Test d'activité antifongique des huiles sur *Aspergillus niger* in vivo sur organe détaché

Les figures 34 et 35 représentent les résultats du test de l'effet antifongique des huiles *in vivo* sur organe détaché.



**Figure 34 :** Aspect des surfaces de lyse obtenues sur des pommes infectées par *A. niger* et traité par des huiles d'*Eucalyptus*



**Figure 35 :** Les valeurs des surfaces de lyse obtenues sur des pommes infectées par *A. niger* et traité par des huiles d'*Eucalyptus*

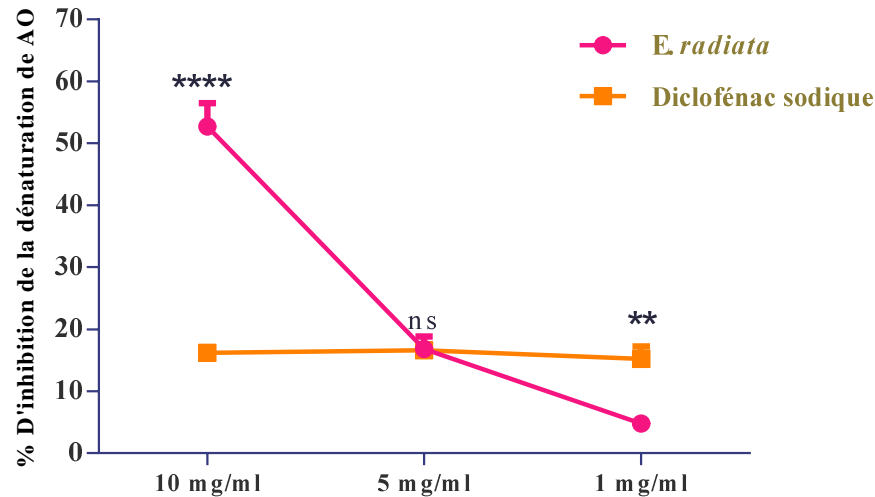
D'après les résultats obtenus, on a remarqué qu'*Aspergillus niger* a significativement ( $p < 0.0001$ ) causé la pourriture de la pomme avec une surface de  $6,138 \pm 0,89$  cm<sup>2</sup> comparée au témoin  $0,256 \pm 0,09$  cm<sup>2</sup>. Le traitement avec les huiles essentielles a permis de réduire significativement ( $p < 0.0001$ ) l'incidence de la pourriture des pommes infectées par *A. niger*. De ce fait on peut affirmer que les deux huiles EG et ER ( $1,324 \pm 0,48$  cm<sup>2</sup> et  $1,797 \pm 0,58$  cm<sup>2</sup>) ont pu protéger la pomme de cet agent phytopathogène.

Dans notre étude, les résultats obtenus lors de traitement des pommes avec l'huile essentielle d'*E. globulus* et d'*E. radiata* montrent une diminution de la gravité de la maladie. L'étude menée par Jin et al., (2011) indique que, l'accumulation de composés phénoliques protège les membranes cellulaires et participe principalement à la lignification des parois cellulaires en empêchant la pénétration et la progression des pathogènes, ce qui explique en partie la réduction de la gravité de la maladie observée après traitement avec différentes huiles essentielles.

L'activité antifongique des huiles essentielles d'*E. globulus* et d'*E. radiata* dans ce travail, constitue une étude préliminaire dans la recherche de nouvelles molécules bioactives pour le traitement des maladies phytosanitaire. Les résultats expérimentaux pour le pouvoir fongicide sont très encourageants, car ils constituent une initiative pour les plantes médicinales d'intérêt agronomique. Nos résultats révèlent également l'efficacité des huiles essentielles d'*Eucalyptus* contre la croissance du mycélium, seulement on doit prendre en considération le mode d'application et la concentration appliquée de l'huile essentielle.

#### **4 Activité anti-inflammatoire**

Le graphe 36 montre les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de l'extrait d'*Eucalyptus radiata* et de diclofénac sodique à différentes concentrations basées sur l'évaluation des pourcentages d'inhibition de la dénaturation de l'Albumine de l'œuf (AO).



**Figure 36 :** Pourcentages d’inhibition de la dénaturation protéique par l’huile essentielle d’*E. radiata* et de diclofénac sodique

Les résultats obtenus montrent que l’activité anti inflammatoire de l’huile d’*Eucalyptus radiata* testé sur la protéine AO est significativement ( $p < 0.0001$ ) plus efficace que le Diclofénac sodique à la concentration 10 mg/ml. A cette concentration, le pourcentage d’inhibition de la dénaturation d’AO par l’huile ER est de  $52,67 \pm 5,40\%$  comparé au standard ( $16,14 \pm 1,46\%$ ). Aux autres concentrations l’activité protectrice de l’HE a diminué, tandis que celle de Diclofénac sodique est restée plus en moins stable ( $16,59 \pm 0,3\%$  et  $16,85 \pm 2,78\%$ ). L’activité anti inflammatoire de l’huile a une concentration de 5mg /ml est presque là même avec celle de Diclofénac sodique ( $15,21 \pm 1,62\%$ ). A la concentration 1mg/ml, l’activité de l’huile diminue encore pour atteindre  $4,73 \pm 0,92\%$  et cet effet est significativement ( $p < 0.01$ ) inférieur à celui obtenu par le Diclofénac sodique.

La dénaturation des protéines est le processus par lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire par l’application d’un stress externe, tel que des acides ou des bases fortes, des sels inorganiques concentrés, des solvants organiques ou de la chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu’elles sont dénaturées. La dégénérescence des histoprotéines est l’une des causes de l’inflammation (Leelaprakash et Mohan Dass, 2010; Bouzid et Zerroug, 2016).

Le pourcentage d’inhibition de la dénaturation protéique par les huiles d’*Eucalyptus radiata* est comparé à celui du Diclofénac sodique. Les résultats ont montré que cette huile à une concentration de 10mg/ml, possède une activité inhibitrice importante en comparaison avec le Diclofénac.

L'activité anti-inflammatoire de l'Eucalyptol, composant principal de l'huile essentielle d'*Eucalyptus*, a été évaluée chez des patients souffrant d'asthme sévère, suggérant l'efficacité de cette molécule (Juergens et al., 2003). Plusieurs études confirment l'effet inhibiteur du 1,8-cinéole sur la production de cytokines. Ils ont démontré que des doses orales de 1,8-cinéole produisaient un effet anti-inflammatoire chez le rat et la souris à des doses de 100 à 400 mg/kg. De plus, les effets analgésiques observés dans les tests à l'acide acétique et au formol, le 1,8-cinéole, s'avère utile dans le traitement des états douloureux localisés (Maiga, 2014). Ces résultats et d'autres, peuvent aider à clarifier les futures applications fonctionnelles de la plante d'*Eucalyptus* et de ses huiles essentielles en thérapie anti-inflammatoire.

## Conclusion

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'activité antibactérienne et antifongique de deux huiles essentielles extraites à partir d'*Eucalyptus globulus* et d'*Eucalyptus radiata* obtenues par la méthode d'entraînement à la vapeur et testées à différentes concentrations, *vis-à-vis* de trois souches bactériennes et de trois souches fongiques.

Les rendements en huiles essentielles obtenus à partir de l'*E. radiata* et de l'*E. globulus* sont de 0,36% et 0,35% respectivement. L'effet antibactérien de nos huiles s'est avéré proportionnel à la dilution, elles ont une activité importante à l'égard des deux souches *Bacillus subtilis* et *E. coli* et tous les champignons testés cependant aucune activité sur *Pseudomonas aeruginosa* n'a été obtenue. Les deux huiles sont plus actives sur les champignons que sur les souches bactériennes. La valeur de la CMI des deux huiles essentielles est inférieure à 0,0625 mg/ml. La valeur de la CMB d'*E. radiata* sur *E. coli* est supérieure à 0,25 mg/ml, la valeur de la CMB d'*E. globulus* sur *E. coli* est supérieure à 2 mg/ml.

Les résultats du test de micro atmosphère des deux huiles se sont avérés plus importants que ceux obtenus par la méthode de la diffusion sur agar. Les résultats *in vivo* ont montré que le traitement avec les huiles essentielles a permis de réduire significativement l'incidence de la pourriture des pommes infectées par *A. niger*. Les résultats obtenus montrent que l'activité anti-inflammatoire de l'huile d'*Eucalyptus radiata* testée sur la protéine AO est significativement plus efficace que le Diclofénac sodique à la concentration 10mg/ml, cependant elle est plus faible aux concentrations 5mg/ml et 1mg/ml.

Ce travail a prouvé que les huiles essentielles d'*E. globulus* et d'*E. radiata* peuvent être utilisées comme agents antibactériens dans plusieurs domaines. Cependant, des études complémentaires seront nécessaires afin de s'assurer de l'efficacité des huiles essentielles. Il serait intéressant :

De continuer les tests sur la CMI des champignons, de tester les huiles sur une large gamme de souches microbiennes.

D'étudier d'autres activités biologiques (antioxydante, antivirale, insecticide, antiparasitaire,...).

Etablir la composition chimique des huiles essentielles ainsi que l'effet de leurs principaux composants.

### Références bibliographique

- Abdellah, F ;Badr,S ;Mohamed.et al; 2013. Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'Eucalyptus camaldulensis et de son hybride naturel (clone 583). [enligne].JournalActa Botanica Gallica, 148(3) ,183-190.
- Adouani, L., Merghadi, I., & Mosbah, C. (2021). Etude des activités biologiques des extraits et l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—a review. Food and chemical toxicology, 46(2), 446-475.
- Bamoniri, A., Ebrahimabadi, A. H., Mazoochi, A., Behpour, M., Kashi, F. J., & Batooli, H. (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran. Food chemistry, 122(3), 553-558.
- Baser K.H.C. et Buchbauer G. (2010). Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. Ed Taylor & Francis Group.994p.
- Baudoux, D. (2017). Aromathérapie: 100 huiles essentielles. Dunod.
- Bechaalany A. G. (2014). Les huiles essentielles. A la découverte de l'aromathérapie, Mode d'utilisation interne et externe 32 huiles essentielles majeures, Composition de 12 aromacomplexes. Éditions Dangles. Z.I. de Bogues, rue Gutenberg, Escalquens, 31750, France. P : 79
- Belsito, E. L., Carbone, C., Di Gioia, M. L., Leggio, A., Liguori, A., Perri, F., & Viscomi, M. C. (2007). Comparison of the volatile constituents in cold-pressed bergamot oil and a volatile oil isolated by vacuum distillation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(19), 7847-7851.
- Benchaar C, Calsamiglia S, Chaves AV, et al (2008) A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim Feed Sci Technol 145:209–28
- Bendali, a., oulebsir, c., djamel, e. H., & djazouli, z. E. (2019) impact de la formulation sur le potentiel antifongique de l'huile essentielle du bigaradier citrus aurantium l.
- Benkherara, S., Bordjiba, O., & Djahra, A. B. (2011). Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de la Saugue officinale: *Salvia officinalis* L. sur

quelques entérobactéries pathogènes. Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie, 23, 72-80.

- Bluma, R., Amaiden, M. R., Daghero, J., & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of applied microbiology*, 105(1), 203-214.
- Bouacheriene R , Benrabia H .2017. Biodiversité et valeur des plantes médicinales dans la phytothérapie: Cas de la région de BEN SROUR (M'sila).Mémoire de master. Université Mohamad Boudiaf - M'SILA. Algérie .
- Boudraa, S., Lalam, A., & Chikhoun, A. E. (2021). Etude de l'effet antifongique de l'huile essentielle encapsulée avec les cyclodextrines.
- Boukhatem, M. N., Ferhat, A., & Kameli, A. (2019). Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: revue de littérature. *Une*, 3(4), 1653-1659.
- Boukhatem.M, Ferhat.M.A, Kameli.A et Mekarnia.M (2017), *Eucalyptus globulus* Labill : un arbre à essence aux mille vertus *Eucalyptus globulus* Labill: a perfume tree with several medicinal purposes, *Phytothérapie* DOI 10.1007/s10298-017-1114- 3. Lavoisier SAS, page1-2.
- Bourkhiss, M. B., Hnach, M., Paolini, J., Costa, J., Farah, A., & Satrani, B. (2010). Propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires des huiles essentielles des différentes parties de *Tetraclinis articulata* (Vahl) Masters du Maroc. *Bulletin de la Société royale des sciences de Liège*.
- Bouyahya A., Abrini J., Bakri Y., Dakka N. (2016) a. Les huiles essentielles comme agents anticancéreux : actualité sur le mode d'action. Lavoisier SAS. DOI :10.1007/s10298-016-1058-z.
- Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A., Talbaoui, A., Khouchlaa, A., Charfi, S., ... & Dakka, N. (2018). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie*, 16(S1), S173-S183.
- Bouzid Dj. and Zerroug M.M. (2016). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don essential oil. *Der Pharmacia Lettre*. 8 (4):41-44.
- Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Ed. TECHNIQUES & DOCUMENTATION, Paris. p. 1120.
- Burt SA, Reinders RD (2003) Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 36:162–7

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Caillet, S., & Lacroix, M. (2007). Les huiles essentielles: leurs propriétés antimicrobiennes et leurs applications potentielles en alimentaire. INRS-Institut Armand-Frappier, RESALA, 1(8).
- Chabenat, H. (2017). Potentialité in vitro de 10 huiles essentielles, seules ou en association, dans le traitement des infections bactériennes cutanées (Doctoral dissertation).
- Chandra, S., Chatterjee, P., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012). Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178-S180.
- Chebli B., Achouri M., Idrissi Hassani L.M., And Hmamouchi M., (2003), Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr, *J. Ethnopharmacol.*, 89, 165-169.
- Chibane B., L., Degraeve, P., Ferhout, H., Bouajila, J., & Oulahal, N. (2019). Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(4), 1457-1474.
- Cox SD, Mann CM, Markham JL (2001) Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Microbiol* 91:492–9
- Daira, N. E. H., Maazi, M. C., & Chefrou, A. (2016). Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) de l'Est Algérien. *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, 85(1), 276-290.
- Damjanović-Vratnica, B., Đakov, T., Suković, D., & Damjanović, J. (2011). Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech Journal of Food Sciences*, 29(3), 277-284.
- Daroui-Mokaddem, H ; 2012. Etude phytochimique et biologique des especes .*Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolumolusatrum* (Apiaceae), *Asteriscusmaritimus* et *chrysanthemumtrifurcatum* (asterarceae). [en ligne].Thèse de doctorat en Biochimie Appliquée. UniversiteBadji Mokhtar-Annaba.P8,14,28
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4022-4034.



- Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, et al (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* 74:101–9
- Dembélé, a., koné, a. Z., cissé, d., touré, h. A., dembélé, b., abou coulivaly, c. H. E. I. C. K., ... & traoré, I. B. (2020). Etude de la sensibilité de quatre souches bactériennes soumises à l'action d'huile essentielle d'eucalyptus camaldulensis au Mali. *Revue malienne de science et de technologie*, 1(24).
- Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, et al (2007) Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 55:4863–70
- Dinzedi MR. 2015. Activités antibactériennes des extraits de *Terminalia catappa* et *Thonningia sanguinea* sur *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus* multirésistants d'origine humaine. Thèse de Doctorat, Université Félix Houphouët-Boigny, Abidjan, Côte d'Ivoire, p.133.
- Domadia P, Swarup S, Bhunia A, et al (2007) Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochem Pharmacol* 74:831–40
- Drider, N. E. H., & Kada, F. (2019). Etude des activités antibactériennes et antifongiques des huiles essentielles de *Salvia officinalis*, *Juniperus phoenicea* et *Mentha pulegium*.
- Erau, P. (2019). L'eucalyptus: botanique, composition chimique, utilisation thérapeutique et conseil à l'officine.
- Farah, A., Satrani, B., Fechtal, M., Chaouch, A., & Talbi, M. (2001). Composition chimique et activités antibactérienne et antifongique des huiles essentielles extraites des feuilles d'*Eucalyptus camaldulensis* et de son hybride naturel (clone 583). *Acta botanica gallica*, 148(3), 183-190.
- Farhat, A. (2010). Vapo-diffusion assistée par micro-ondes: conception, optimisation et application. Thèse de Doctorat en Sciences (option : Sciences des Procédés, Sciences des Aliments), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (France) & Ecole Nationale d'Ingénieurs de Gabès (Tunisie).
- Feyrouz, L. A. R. M. T. (2022). Les huiles essentielles: composition, extraction et utilisation (Doctoral dissertation, Université Mohamed Boudiaf-M'sila).

- Fillatre, Y. (2011). Produits phytosanitaires: Développement d'une méthode d'analyse multi-résidus dans les huiles essentielles par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse en mode tandem (Doctoral dissertation, Université d'Angers).
- Foods\_a review. International. Journal. Of Food Microbiology. 94, 223-253.
- Ghavam, M., Manca, M. L., Manconi, M., & Bacchetta, G. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Scientific reports*, 10(1), 15647.
- Guemache, D., Khaled, F., (2021). Plante médicinales. Santé, culture et perspectives. EDITION IMAL, Algérie. P : 200
- Hayakawa, R., Matsunaga, K., & Arima, Y. (1987). Depigmented contact dermatitis due to incense. *Contact dermatitis*, 16(5), 272-274.
- Heath RJ, Rock CO (2004) Fatty acid biosynthesis as a target for novel antibacterials. *Curr Opin Invest Drugs* 5:146–53
- Hellal, Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*) (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Hmiri, S., Rahouti, M., Habib, Z., Satrani, B., Ghanmi, M., & El Ajjouri, M. (2011). Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus Camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation. *Bulletin de la société royale des sciences de liège*.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, 12.
- Iserin, P., Masson, M., Restellini, J. P., Ybert, E., De Laage de Meux, A., Moulard, F., ... & Botrel, A. (2001). *Larousse des plantes médicinales: identification, préparation, soins*. Editions Larousse, Paris, 15.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8-10), 603-608.
- Jin, P., Wang, S. Y., Gao, H., Chen, H., Zheng, Y., Wang, C.Y. (2012). Effect of cultural system and essential oil treatment on antioxidant capacity in raspberries. *Food Chemistry*, 132(1): 399–405

- Juergens, U., Dethlefsen, U., (2003). Activité anti-inflammatoire du 1,8-cinéol (eucalyptol) dans l'asthme bronchique: essai à double insu contrôlé par placebo. *Médecine respiratoire*, 97: 250- 256.
- Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M. F. (2008). Étude de six huiles essentielles: composition chimique et activité antibactérienne. *Phytothérapie*, 6(3), 160-164.
- Kellal, C., & Lacete, D. (2018). Evaluation de l'activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Origanum compactum* et *Cedrus atlantica*: Application pour la conservation des fruits de pomme (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
- Koziol, N. (2015). Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora*: qualité, efficacité et toxicité (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food chemistry*, 85(4), 633-640.
- Laouer H. 2004. Inventaire de la flore médicinale utilisée dans les régions de Sétif, de Bejaïa, de M'sila et de Djelfa. Composition et activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Ammoïdes pusilla* (Brot) Breistr. et de *Magydaris pastinaceae* (Lamk) Paol. Thèse de Doctorat d'Etat en écologie végétale. Université Ferhat Abbas, Faculté des sciences, Setif, 146p.
- Leelaprakash G and Mohan Dass S. (2010). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*, *International Journal of Drug Development and Research*. 3:189-196
- Lis-Balchin M, (2002). *Lavender: the genus Lavandula*. ed : Taylor and Francis, London. Pp :155-200.
- Liu, S., Ruan, W., Li, J., Xu, H., Wang, J., Gao, Y., Wang, J., 2008. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. *Mycopathologia* 166, 93–102. <https://doi.org/>
- Lobstein, A., Couic-Marinier, F., & Koziol, N. (2018). Huile essentielle d'*Eucalyptus radiata*. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(575), 55-56.

- Lucchesi, M. E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes : conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat en Sciences (option : Chimie), Faculté des Sciences et Technologies, Université de la Réunion, France.
- Lucchesi, M. E., Chemat, F., & Smadja, J. (2004). Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A*, 1043(2), 323-327.
- Maiga, M. A. A. (2014). Etude de la chimie et des activités biologiques de six (6) plantes dans le traitement traditionnel du diabète: *Allium cepa*; *Allium sativum*; *Daucus carota*; *Eucalyptus globulus*; *Psidium guajava* et *Solanum melongena*.
- Martinez, J. L. (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies*, 11, 33-39.
- Matasyoh J .C., Kiplimo J. J., Karubiu N.M. et Hailstorks T.P. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarhnanthus camphorates*. *Food Chemistry*, 101(3): 1183–1187.
- Maurya, A., Prasad, J., Das, S., & Dwivedy, A. K. (2021). Essential oils and their application in food safety. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 653420.
- Mehani, M ; 2015. Activité antimicrobienne des huiles essentielles d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la région d'Ouargla. [En ligne]. Thèse de doctorat: Microbiologie. Ouargla : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Sciences Biologiques, 170 p.
- Mehani, M.,& Segni, L. (2014). Effet antimicrobien des huiles essentielles de la plante *Eucalyptus camadulensis* sur certaines bactéries pathogènes. *Ḥawliyyāt al-‘Ulūm wa-al-Tiknūlijyā*, 281(1766), 1-10.
- Mekonnen, B. Yitayew, A. Tesema, et S. Taddese, « In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis* », *Int. J. Microbiol.*, vol. 2016, 2016.
- Mourey A, Canillac N (2002) Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control* 13:289–92
- Moutassem, D., Belabid L., Bellik, Y., Ziouche, S. and Baali, F. 2019. Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium wilt* and inducing system-ic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55 (3): 202–217.

- Nakahara K., Alzoreky N.S., Yoshihashi T., Nguyen H.T.T. et Trakoontivakorn G. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly*. 37(4) : 249-252.
- Nea, F., Tanoh, E. A., Wognin, E. L., Kemene, T. K., Genva, M., Saive, M., ... & Fauconnier, M. L. (2019). A new chemotype of *Lantana rhodesiensis* Moldenke essential oil from Côte d'Ivoire: Chemical composition and biological activities. *Industrial Crops and Products*, 141, 111766.
- O'Neill, J. (2014). Review on antimicrobial resistance. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations, 2014(4).
- Ouraïni, D., Agoumi, A., Ismaili-Alaoui, M., Alaoui, K., Cherrah, Y., Alaoui, M. A., & Belabbas, M. A. (2007). Activité antifongique de l'acide oléique et des huiles essentielles de *Thymus saturejoides* L. et de *Mentha pulegium* L., comparée aux antifongiques dans les dermatoses mycosiques. *Phytothérapie*, 5(1), 6-14.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat science*, 73(2), 236-244.
- Pierron C. (2014). Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitaliers de France : exemples d'applications en gériatrie gérontologie et soins palliatifs. Thèse de doctorat, Université de Lorraine, France.
- Raaman, N. (2006). *Phytochemical techniques*. New India Publishing.
- Raut J.S. and Karuppayil S.M. 2014. A Status Review on the Medicinal Properties of EssentialOils. *Industrial Crops and Products*. 62: 250-264.
- Safaei-Ghomi, J., & Ahd, A. A. (2010). Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*. *Pharmacognosy magazine*, 6(23), 172.
- Salem, N., Kefi, S., Tabben, O., Ayed, A., Jallouli, S., Feres, N., ... & Elkahoui, S. (2018). Variation in chemical composition of *Eucalyptus globulus* essential oil under phenological stages and evidence synergism with antimicrobial standards. *Industrial crops and products*, 124, 115-125.

- Sharma, A. D., Farmaha, M., Kaur, I., & Singh, N. (2021). Phytochemical analysis using GC-FID, FPLC fingerprinting, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory activities analysis of traditionally used *Eucalyptus globulus* essential oil. *Drug Analytical Research*, 5(1), 26-38.
- Soualeh, N., & Soulimani, R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils, rôles et intérêts. *Phytothérapie*, 14(1), 44-57.
- Spadaccino, G., Frabboni, L., Petruzzi, F., Disciglio, G., Mentana, A., Nardiello, D., & Quinto, M. (2021). Essential oil characterization of *Prunus spinosa* L., *Salvia officinalis* L., *Eucalyptus globulus* L., *Melissa officinalis* L. and *Mentha x piperita* L. by a volatolomic approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 202, 114167.
- Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., & Makridis, P. (2013). Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food control*, 34(2), 539-546.
- Talbaoui, A., Jamaly, N., Aneb, M., Idrissi, A., Bouksaim, M., Gmouh, S., ... & Bakri, Y. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from six Moroccan plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(31), 4593-4600.
- Tomazoni, E.Z., Pauletti, G.F., Ribeiro, R.T.S., Moura, S., Schwambach, J. (2017). In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticulturae*, 223: 72–77.
- Turgis M, Han J, Caillet S, et al (2009) Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control* 20:1073–79
- Van Hung P., Thi Lan Chi P. et Thi Lan Phi N. (2013). Comparison of antifungal activities of Vietnamese Citrus essential oils. *Natural Product Research Formerly Natural Product Letters*, 27(4-5): 506-508,
- Vilela, G. R., de Almeida, G. S., D'Arce, M. A. B. R., Moraes, M. H. D., Brito, J. O., da Silva, M. F. D. G., ... & da Gloria, E. M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1, 8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare. *Journal of Stored Products Research*, 45(2), 108-111.

- Vital, R., Muchembled, J., Deweer, C., Tournant, L., Corroyer, N., & Flammier, S. (2018). Évaluation de l'intérêt de l'utilisation d'huiles essentielles dans des stratégies de protection des cultures. *Innovations Agronomiques*, 63, 1-20.
- Viuda-Martos, M., Mohamady, M. A., Fernández-López, J., Abd ElRazik, K. A., Omer, E. A., Pérez-Alvarez, J. A., & Sendra, E. (2011). In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants. *Food control*, 22(11), 1715-1722.
- Wang, Z., Ding, L., Li, T., Zhou, X., Wang, L., Zhang, H., & He, H. (2006). Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. And *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *Journal of Chromatography A*, 1102(1), 11-17.
- Yoshimura H., Sawai Y., Tamotsu S., And Sakai A., (2010), 1,8-cineole inhibits both proliferation and elongation of BY-2 cultured tobacco cells, *J Chem Ecol.*, 1-9.

**Annexe I : Composition d'un litre des milieux de culture (1L d'eau)**

• **Bouillon nutritif (Liofilchem srl)**

Extrait de bœuf .....	1 g
Extrait de levure .....	2 g
Peptone .....	5 g
Chlorite de sodium .....	5 g
pH .....	6.8 ± 0.2

• **Milieu MH (Gélose de Mueller Hinton)**

Acide hydrolysate de caséine .....	17.5 g
Agar .....	17 g
Amidon soluble .....	1.5 g
Extrait de viande .....	2 g
pH .....	7.3 ± 0.2

• **Milieu PCA (plate count agar) (TM MEDIA)**

Agar .....	9 g
Dextrose .....	1 g
Tryptone .....	5 g
Extrait de levure .....	2.5 g
pH .....	7 ± 0.2

• **Milieu PDA (Potato dextrose agar) (BIOCHEM)**

Agar .....	15g
Dextrose .....	20 g
Filtrat pommes de terre .....	200 g
pH .....	6.8 ± 0.2



- **Milieu TSA (Liofilchem)**

Agar .....	15g
Digestion pancréatique de caséine .....	17g
Digestion papaique de soja .....	3g
Chlorure de sodium .....	5g
Hydrogénophosphate dipotassique .....	2.5g
Glucose monohydraté .....	2.5g
pH .....	7 ± 0.2

**Annexe II : Composition de la solution du tempo phosphate.**

Eaux distillé.....	1L
Phosphate de potassium monobasique (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) .....	36.33 g
Phosphate de potassium dibasique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ).....	23.125 g
pH.....	6.3 ± 0.2

**Résumé :** Ce travail avait pour but d'évaluer l'activité antibactérienne, antifongique et anti-inflammatoire de deux huiles essentielles (*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus radiata*) à des concentrations différentes. L'extraction des deux huiles par l'entraînement à la vapeur d'eau a fourni des rendements de l'ordre de 0.36% et 0.35% respectivement. L'étude de l'activité antibactérienne réalisée par deux méthodes : diffusion sur agar et micro-atmosphère, sur trois souches bactériennes homopathogènes (*Pseudomonas aeruginosa* ; *E.coli* ; *Bacillus subtilis*) et trois espèces fongiques phytopathogènes (*Alternaria alternata* ; *Aspergillus niger* ; *Penicillium sp*). Une expérience ex vivo a été effectuée sur des pommes. Les résultats obtenus ont révélé que l'HE EG et ER pures possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les espèces fongiques et sur toutes les souches bactérienne sauf pour *Pseudomonas aeruginosa*. Cependant la combinaison des deux huiles essentielles a donné une activité antibactérienne synergique moyenne sur *E.coli*; *Bacillus subtilis*. Tandis que l'activité antifongique de cette combinaison à donner un effet synergique très important sur tous les champignons testés. La concentration minimale inhibitrice des huiles ER et EG est <0,0625mg/ml avec une CMB > 0.125mg/ml et CMB > 2 mg/ml respectivement sur *E.coli* ; *Bacillus subtilis*, celles-ci dépendent de l'HE utilisée ainsi que des souches testées. Le teste anti-inflammatoire a révélé que HE ER a un pouvoir remarquable sur la protection de la protéine albumine d'œufs de 52.67%. Le test ex vivo a décelé une activité inhibitrice significative contre *Aspergillus niger*.

**Mots clés :** Huiles essentielles, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus radiata*, Activité anti-inflammatoire, Activité antimicrobienne.

**Abstract :** The aim of this work was to evaluate the antibacterial, antifungal and anti-inflammatory activity of two essential oils (*Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata*) at different concentrations. Extraction of the two oils by steam distillation gave yields of around 0.36% and 0.35% respectively. The antibacterial activity of three homopathogenic bacterial strains (*Pseudomonas aeruginosa*; *E.coli*; *Bacillus subtilis*) and three phytopathogenic fungal species (*Alternaria alternata*; *Aspergillus niger*; *Penicillium sp*) was studied using two methods: diffusion on agar and micro-atmosphere. An ex vivo experiment was carried out on apples. The results showed that pure EG and ER EO had antimicrobial activity against all fungal species and all bacterial strains except *Pseudomonas aeruginosa*. However, the combination of the two essential oils gave average synergistic antibacterial activity on *E.coli* and *Bacillus subtilis*. Where as the antifungal activity of this combination gave a very strong synergistic effect on all the fungi tested. The minimum inhibitory concentration of ER and EG oils is <0.0625mg/ml with a BMC > 0.125mg/ml and BMC > 2 mg/ml respectively on *E.coli*; *Bacillus subtilis*, these depend on the EO used as well as the strains tested. The anti-inflammatory test revealed that HE ER has a remarkable power to protect egg albumin protein by 52.67%. The ex vivo test revealed significant inhibitory activity against *Aspergillus niger*.

**Key words:** Essential oils, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus radiata*, Anti-inflammatory activity, Antimicrobial activity.

**ملخص:** الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات والمضاد للالتهابات لزيت أساسية (*Eucalyptus globulus* و *Eucalyptus radiata*) بتركيزات مختلفة. أعطت استخلاص الزيتين بالتقطير البخار إنتاجية حوالي 0.36% و 0.35% على التوالي. تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لثلاث سلالات بكتيرية متجانسة (*Pseudomonas aeruginosa* ; *E.coli* ; *Bacillus subtilis*) وثلاثة أنواع فطرية ممرضة للنبات (*Alternaria alternata* ; *Aspergillus niger* ; *Penicillium sp*) باستخدام طريقتين: الانتشار على أجار والغلاف الجوي الدقيق. تم إجراء تجربة خارج الجسم الحي على التفاح. أظهرت النتائج أن EG و ER EO النقي لهما نشاط مضاد للميكروبات ضد جميع أنواع الفطريات وجميع السلالات البكتيرية باستثناء *Pseudomonas aeruginosa*. ومع ذلك ، فإن توليفة الزيتين الأساسيين أعطت نشاطاً تآزرياً مضاداً للبكتيريا على *E.coli* و *Bacillus subtilis*. حيث أن الفعالية المضادة للفطريات لهذه التركيبة أعطت تأثيراً تآزرياً قوياً جداً على جميع الفطريات المختبرة. الحد الأدنى للتركيز المثبط لزيت ER و EG <0.0625mg / ml مع EG 0.125mg / ml و BMC 2 mg / ml على التوالي على *E.coli* ; *Bacillus subtilis* ، وتعتمد هذه على EO المستخدمة وكذلك السلالات المختبرة. أظهر الاختبار المضاد للالتهابات أن HE ER لديه قوة ملحوظة لحماية بروتين الزلال في البيض بنسبة 52.67%. أظهر الاختبار خارج الجسم الحي وجود نشاط مثبط كبير ضد *Aspergillus niger*.

**الكلمات المفتاحية:** زيوت عطرية ، أوكالبتوس جلوبولوس ، أوكالبتوس رادياتا ، نشاط مضاد للالتهابات ، نشاط مضاد للميكروبات.

# Introduction

# Synthèse bibliographiques

Matériel  
&  
Méthodes

Résultats  
&  
Discussion

# Conclusion

# Références Bibliographiques



# Annexes