



MEMOIRE

De fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de MASTER en Biologie

Option : Biodiversité et physiologie végétale

Thème

**Extraction des huiles essentielles de
Syzygium aromaticum et d'*Eucalyptus globulus* : Activité
antioxydante et antibactérienne vis-à-vis de deux
pathogènes de l'homme.**

Travail réalisé par:

- HADDADI Karima
- RABHI Houria

Devant le jury composé de:

M^{me} SAHMOUNE F.MAA.UMMTO Présidente

M^{me} TALEB TOUDERT K. MCA. UMMTO Promotrice

M^{me} DAHOUMANE A. MAA.UMMTO Examinatrice



Remerciements

Nos vifs remerciements vont :

A notre promotrice Madame TALEB-TOUDERT K qui a accepté de diriger notre mémoire.

Au membre de jury; Madame SAHMOUNE F. Présidente et Madame DAHOUMANE A. Examinatrice qui ont accepté d'examiner notre travail.

A toute l'équipe de laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie; Mr HOUALI K, Mr BARIZ K, Mme IRATNI G, Melle OUZID Y... de nous avoir aidé dans notre pratique et pour leurs conseils.

Aux ingénieurs de laboratoire de Microbiologie de nous avoir aidé dans notre pratique.

A Melle AMAR KHODJA N. qui nous a beaucoup aidés.

A l'équipe de laboratoire d'Entomologie Appliquée; Melle TINKICHT L. ingénieur de laboratoire, Mr FACI M, Melle LAOUDI T.

A tous qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce projet.

Karima et Houria



Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A l'âme de mes très chers parents,

Tout d'abord et spécialement à ma chère mère qui aurait été fière de ma réussite. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, maman ; ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.

A mon très cher père, que j'ai perdu à jeune âge ; qui s'est tant sacrifié pour moi. J'espère que je serai à la hauteur de son sacrifice. Puisse dieu l'accueillir dans sans vaste paradis.

A l'âme de

ma grande sœur Ouiza, son fils Nagui et mon beau père Mohammed.

*A Mon cher mari **Omar***

de m'avoir soutenu et encouragé tout le long de mon projet, pour ses encouragements, sa confiance et son amour. Ainsi qu'a mes enfants adorables Walid, Salaheddine et Rahim. Puisse Dieu vous garde, éclaire votre route et vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.

A Mes frères et sœurs

Mohammed, Mustapha, Smail, Bahdja et Dhaouia ainsi qu'à tous mes neveux et toutes mes nièces et toute la famille HADDADI.

A Ma belle famille

Surtout ma belle mère qui a contribué à bien mené la préparation de mon travail, mes belles sœurs Fatiha, Djamila, Hafidha, Fazia, mes beaux frères et à toute la famille BENMEZIANE.

A mon binôme Houria et notre chère copine et collègue Lynda; ce travail en témoignage de tous les bons moments qu'on a passés ensemble.

A tous mes amies et mes collègues de la faculté Agro-Bio à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

Karima





Dédicace

*Je dédier ce modeste travail a
Mes parents qui m'ont soutenu et aider dans toutes les circonstances*

*A Mon cher mari Omar
de m'avoir soutenu et encouragé tout le long de mon projet, pour ses encouragements, sa
confiance et son amour. Ainsi qu'à mes enfants adorables Axel et Daline. Puisse Dieu vous garde,
éclaire votre route et vous aide à réaliser vos vœux les plus chers.*

*A Mes frères et sœurs
Malik, Karim, Malika, Ouiza, Nadia et Sabrina ainsi qu'à toutes mes nièces et tous mes neveux et
toute la famille Rabhi.*

*A Ma belle famille
Surtout ma belle mère, mes belles sœurs Ferroudja qui a contribuer a bien mené la préparation de
mon travail, Mekioussa et Ouerida, mes beaux frères et a toute la famille Lariane.*

*A mon binôme Karima et sa famille a notre chère copine et collègue lynda; ce travail en
témoignage de tous les bons moments qu'on a passés ensemble.*

*A toutes mes amies
A tous mes collègues de la faculté Agro-Bio à l'Université Mouloud Mammeri de
Tizi-Ouzou.*



Houria

Sommaire

Liste des abréviations**Liste des figures****Liste des tableaux**

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie I: Etude bibliographique

Chapitre I: Monographies du giroflier (*Syzygium aromaticum*) et l'*Eucalyptus* (*Eucalyptus globulus*)

I. <i>Syzygium aromaticum</i>	3
I-1. Origine du nom.....	3
I-2. Description botanique du giroflier	3
I-3. Systématique	4
I-4. Culture et récolte	4
I-4-1. Culture.....	4
I-4-2. Récolte	5
I-5. Utilisation du clou de girofle.....	6
I-6. Toxicité de girofle	7
II- <i>Eucalyptus globulus</i>	7
II-1. Description botanique d' <i>Eucalyptus</i>	7
II-2. Systématique	10
II-3. Utilisation de l' <i>eucalyptus</i>	11
II-4. Toxicité	13

Chapitre II: Les huiles essentielles

I. Définition.....	14
II. Répartition	14
III. Localisation.....	14
IV. Fonction	15
V. Rôle	16

VI. Composition chimique des huiles essentielles.....	16
V1-1. Les terpènes	16
V1-2. Les composés aromatiques	17
VII. Toxicité des huiles essentielles.....	17
VIII. Conservation des huiles essentielles	17
IX. Propriétés pharmaceutiques et usages des huiles essentielles	18
X. Procédés d'extraction des huiles essentielles	18
X-1. Hydrodistillation	18
X-2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	18
X-3. Hydro diffusion.....	19
X-4. Extraction à froid	19
X-5. Extraction assistée par micro-onde.....	19
X-6. Extraction par fluides supercritique.....	19
X-7. L'enfleurage et la macération	19
X-8. Extraction par ultrasons	19
X-9. Expression.....	19
XI. Caractérisation biochimiques des huiles essentielles	20

Partie II: Etudes expérimentales

Chapitre I: Matériel et méthodes

I-1. Matériel utilisé.....	22
I-1. Matériel biologique	22
I-1-1. Les plantes	22
I-1-2. Les souches bactériennes testées	23
I-2. Produits chimiques et milieux de culture utilisés.....	24
I-3. Appareillage	24
II. Méthodes expérimentales	25
II-1. Extraction des l'huiles essentielles par entrainement à la vapeur d'eau.....	25
II-2. Calcul du rendement	26
II-3.Etude des activités biologiques.....	27

II-3-1. Etude de l'activité antibactérienne	27
II-3-1-1. Revivification et standardisation des souches microbiennes	27
II-3-1-2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution en milieu liquide	29
II-3-2. Etude de l'activité antioxydante	30
II-3-2-1. Test de piégeage du radical libre DPPH	30
II-3-2-2. Calcul des IC50	32
II-3-3. Réalisation des coupes anatomiques	32

Chapitre II: Résultats et discussion

II-1. Description des HEs obtenues	33
II-1-1. Caractéristiques organoleptiques	33
II-1-2. Rendement en huiles essentielles	34
II-1-3. Calcul des densités	35
II-2. L'activité antibactérienne	36
II-2-1. Evaluation par la méthode de diffusion des disques	36
II-2-2. Détermination de la CMI en milieu liquide.....	42
II-3. Activité antioxydante	44
II-3-1. Piégeage du radical libre DPPH	44
II-3-2. Calcul des IC50	47
II- 4. Anatomie des organes des espèces étudiées	50
II- 4-1. Structure des clous de girofle	50
II- 4-2. Structure de la feuille d' <i>Eucalyptus globulus</i>	52
II-4-3. Structure de la tige d' <i>Eucalyptus globulus</i>	54
Conclusion générale	56

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

ATCC: American Type Culture Collection

BN: Bouillon nutritive

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

DO: Densité optique

GN: Gélose nutritive

MH: Gélose Muller Hinton

IC50: Concentration inhibitrice à 50%

RHE: Rendement

µl : Microlitre

g : Gramme

mg: Mille gramme

ml : Millilitre

Ech : Echantillon

% : Pourcentage

UFC : Unité Formant Colonie

HEs: Huile(s) Essentielle(s)

HEc : Huile Essentielle Clou de girofle

HEe : Huile Essentielle *Eucalyptus*

C° : Degré Celsius

T°: Température

h : Heure

mn : Minut

mm : Millimètre

nm : Nanomètre

+ : Positif.

- : Négatif.

***E.coli* :** *Escherichia coli*.

***S.aureus* :** *Staphylococcus aureus*

UMMTO : Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou

Fig: Figure

M: Masse

RHEc : Rendement en huile essentielle du Clou de girofle

RHEe : Rendement en huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

Liste des figures

Liste des figures

Figure 01 : Allure d'un giroflier	4
Figure 02 : Boutons floraux et fleurs de giroflier	6
Figure 03 : Feuilles et fleurs d' <i>Eucalyptus globulus</i>	8
Figure 04 : Ecorce d' <i>Eucalyptus globulus</i>	9
Figure 05 : Fleurs et fruits d' <i>Eucalyptus globulus</i>	9
Figure 06 : Boutons de clou de girofle séchés	22
Figure 07 : Feuilles d' <i>Eucalyptus</i> séchées	23
Figure 08 : Colonies d' <i>E.coli</i> à gauche et <i>S.aureus</i> à droite	24
Figure 09 : Dispositif d'extraction d'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau.....	26
Figure 10 : Forme libre et réduite du DPPH	31
Figure 11 : Huile essentielle de <i>Zyzygium aromaticum</i>	33
Figure 12 : Huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	34
Figure 13 : Les zones d'inhibition en fonction des différentes doses d'HE de <i>Syzygium aromaticum</i>	37
Figure 14 : Les zones d'inhibition en fonction des différentes doses d'HE d' <i>Eucalyptus globulus</i>	38
Figure 15 : L'effet de concentrations croissantes de l'HEc sur la croissance des bactéries.....	39
Figure 16 : L'effet de concentrations croissantes de l'HEe sur la croissance des bactéries.....	39
Figure 17 : CMI de <i>Syzygium aromaticum</i>	43
Figure 18 : CMI d' <i>Eucalyptus globulus</i>	44
Figure 19 : Réduction du DPPH par les HES	45
Figure 20 : Détermination de l'IC50 de l'acide ascorbique	45
Figure 21 : Cinétique d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique	46
Figure 22 : Cinétique de réduction du DPPH par l'HE de <i>S.aromaticum</i>	46
Figure 23 : Cinétique de réduction du DPPH par l'HE d' <i>E globulus</i>	47
Figure 24 : Cinétique de l'activité de réduction du DPPH de <i>S. aromaticum</i>	annexe 02

Liste des figures

Figure 25: Cinétique de l'activité de réduction du DPPH d' <i>E. globulus</i>	annexe 02
Figure 26: Histogramme des valeurs de l'C50 des HEs en mg/ml	48
Figure 27: Bouton floral de <i>S.aromaticum</i> séché	50
Figure 28: Coupe transversale d'un bouton florale de <i>Syzygium aromaticum</i> observée au microscope photonique (Gr: 10x10)	51
Figure 29: Coupe transversale d'un bouton florale de <i>Syzygium aromaticum</i> observée au microscope photonique (Gr: 40x10)	51
Figure 30: Coupe transversale d'une feuille d' <i>Eucalyptus globulus</i> observée au microscope optique (Gr : 10×10).....	53
Figure 31: Coupe transversale d'une feuille d' <i>Eucalyptus globulus</i> observée au microscope optique (Gr : 40×10).....	53
Figure 32: Coupe transversale d'une tige d' <i>Eucalyptus globulus</i> observée au microscope photonique (Gr : 10x10).....	55
Figure 33: Coupe transversale d'une tige d' <i>Eucalyptus globulus</i> observée au microscope photonique (Gr : 40x10).....	55

Liste des tableaux

Tableau I: Quelques usages traditionnels	11
Tableau II: Localisation des huiles essentielles dans les Plantes	15
Tableau III: Le diamètre des zones d'inhibitions	29
Tableau IV: Caractéristiques organoleptiques des HEs étudiées.....	33
Tableau V: Résultat du rendement des HEs des deux espèces étudiées	35
Tableau VI: Résultats statistique <i>E.coli</i>	40
Tableau VII: Résultats statistique <i>S.aureus</i>	41
Tableau VIII: Annexe 03 <i>E.coli</i>	Annexes
Tableau IX: Annexe 04 <i>S.aureus</i>	Annexes
Tableau X: Résultats de la CMI pour l'HEc	42
Tableau XI: Résultats de la CMI pour l'HEe.....	43
Tableau XII: XII: Valeurs des IC50 trouvées	48



Introduction

Introduction

Depuis des milliers d'années, les ressources végétales constituent une source d'intérêt primordial pour l'homme et ses besoins. Elles continuent d'être un moyen thérapeutique utilisé dans le monde entier (Cardoso *et al.*, 2019) car elles représentent une ressource de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* et *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels (Hazzit *et al.*, 2015).

Dans ce cadre, *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus* sont parmi les plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde, en raison de leurs richesses en composants chimiques importants et leurs effets thérapeutiques potentiels. L'*Eucalyptus* est utilisé pour ses vertus médicinales ; parmi ses composés, le 1,8-cinéole ou eucalyptol est sans doute le plus connu, car c'est un expectorant qui peut soulager la toux et lutter contre les problèmes des voies respiratoires et autres complications (Boukhatem *et al.*, 2017). *Syzygium aromaticum* est utilisé pour ses propriétés antiseptiques et anesthésiques (Karkoch, 2012); cette plante a un pouvoir anti-infectieux majeur grâce à l'eugénol pour ses propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques, antiparasitaires et anti-inflammatoire (Koroch, 2007). L'apparition de multi-résistances contre les principales classes d'antibiotiques a conduit de l'événement de l'ère post-antibiotique.

Face à la perte d'efficacité de l'antibiotique, mise en péril par l'émergence de germes multirésistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. L'une des stratégies les plus importantes se base sur l'identification de nouvelles cibles bactériennes, en vue de développer des molécules capables d'inhiber la virulence bactérienne (Brown, 2009).

Les huiles essentielles de *S.aromaticum* et d'*E.globulus* pourraient être considérées comme des antioxydants potentiels compte tenu de leurs propriétés anti-radicalaires de piégeage des radicaux libres et d'action antibactérienne très large puisqu'ils inhibent la croissance des bactéries, ceci est principalement en fonction de leur composition chimique et en particulier de la nature de leurs composés volatils majeurs (Damiani *et al.*, 2014; Luis *et al.*, 2016).

Notre choix s'est porté sur *E.globulus* et *S.aromaticum* car ils ont une grande importance alimentaire et économique et leur consommation manifeste un effet positif sur la santé.

De ce fait, notre travail vise à démontrer la richesse de ces deux plantes médicinales sélectionnées en composés actifs et mettre en évidence leurs capacités antioxydants et antibactériennes en utilisant un ensemble de données générées à partir des études scientifiques précédentes.

L'objectif dans ce travail est l'extraction des huiles essentielles *S.aromaticum* commerciale et d'*E.globulus* de la région de Tizi-Ouzou par entraînement à la vapeur d'eau, et le calcul de leurs rendements ainsi que l'évaluation des activités biologiques de ces HEs.

Le travail présenté est composé de trois parties

La première partie est relative à l'étude bibliographique des plantes et des huiles essentielles de *Syzygium aromaticum* et d'*Eucalyotus globulus*.

La deuxième partie est consacrée au matériel et méthodes utilisés.

La troisième partie aborde l'ensemble des résultats obtenus et leur discussion et enfin une conclusion qui termine ce travail.



Partie I

Etude bibliographique



Chapitre I

**Monographies du *S. aromaticum* et
d'*E.globulus***

I - *Syzygium aromaticum***I-1. Origine du nom**

Selon Penot *et al.* (2014), le clou de girofle provient du giroflier (*Syzygium aromaticum*) appartenant à la famille des *Myrtacées*, originaire de l'Indonésie orientale, dans la partie sud des Philippines et les îles de Moluques, d'Afrique et d'Amérique du sud, principalement dans des pays tropicaux ; mais les clous de girofle utilisés pour l'alimentation viennent en majorité de Madagascar.

Chaque bouton floral de cette plante est un clou de girofle (Barbelet, 2015)

I-2. Description botaniques du giroflier

C'est un grand arbre au tronc gris clair ridé, d'une hauteur moyenne de 10 à 12 mètres, pouvant atteindre jusqu'à 20 mètres de haut, à port pyramidal et érigé (**Fig 01**). Son feuillage est coriace et persistant. Les feuilles sont opposées, pétiolées, ovales, aux limbes lancéolés. La face supérieure est vert rougeâtre et à la face inférieure vert sombre. Elles sont légèrement ponctuées d'environ 10 à 12 centimètre. Elles sont aromatiques et dégagent une forte odeur de clou de girofle au froissement. Les fleurs sont disposées en cymes terminales de 25 fleurs environ, compactes et ramifiées, regroupées en panicules de trois à cinq petites fleurs parfumées, au calice tubulaire blanc cassé, puis rouge (quatre sépales rouges charnus et persistants) et à la corolle blanc rosé (quatre dialypétales blancs) (Ghedira *et al.*, 2010).

Comme le nom de clou l'indique, le bouton floral comporte une partie quadrangulaire, l'hypanthium, longue de 10 à 12 mm pour un diamètre de 2 à 3 mm et une tête globuleuse d'un diamètre de 4 à 6 mm, entourée par les quatre lobes divergents des sépales et constituée des quatre pétales imbriqués qui enferment de très nombreuses étamines recourbées.



Figure 01: Allure d'un giroflier (Wichtl et Anton, 2003).

I-3. Systématique

(Ghedira *et al.*, 2010), classe le clou de girofle comme suit :

Règne	: plantae
Sous-règne	: Tracheobionta
Embranchement	: Magnoliophyta
Sous-embranchement	:Magnoliophytina
Classe	: Magnoliopsida
Sous-classe	: Rosidae
Ordre	: Myrtales
Famille	: Myrtaceae
Genre	: <i>Syzgium</i>
Espèce	: <i>Syzgium aromaticum</i>

I.4. Culture et récolte

I.4.1. Culture

Le giroflier, comme beaucoup d'autres plantes de la famille des Myrtacées, est habitué aux climats tropicaux. Il a également besoin d'humidité, de chaleur, et d'une altitude basse, ne dépassant pas 300 mètres. (Lim, 2014).

Le giroflier est cultivé pour ses clous qui servent d'aromates dans l'alimentation et pour ses feuilles riches en eugénol qui sont utiles dans la préparation de la vanilline artificielle et pour les fruits de giroflier ou antofles pour la confiserie (Minelle, 1959).

Les clous, griffes, feuilles, branches et antofles servent également en pharmacie pour la préparation des médicaments en médecine pour la chirurgie en cosmétique pour la parfumerie et la savonnerie en quincaillerie pour la préparation de certaines peintures et vernis et en droguerie.

I.4.2. Récolte

Le moment le plus favorable à la récolte est déterminé par la couleur rosé du clou de girofle. Cueillis trop tôt, les clous n'auront pas synthétisé la totalité de leurs composants, et cueillis trop tard, ils perdront leurs pétales; lorsque les sépales deviennent rouge vif, ils sont séchés au soleil jusqu'à obtenir une coloration brune. (Barbelet, 2015).

Il faut procéder à plusieurs passages pour un même arbre étant donné que les clous n'arrivent pas à maturité simultanément (les branches basses fleurissent plus tôt que les branches hautes) (Bois, 1999).

Les clous de girofle sont récoltés, après la 7^{ème} ou la 8^{ème} année de culture de l'arbre, deux fois par an et qui peut être exploité durant une centaine d'années et les vieux arbres peuvent donner 50kg de clous frais par an. (Ranoarisoa, 2012).

L'arbre donne en Janvier/Février des boutons floraux, ou clous de girofle, pourpres cramoisis, groupés en cimes terminales. Ils sont cueillis en Juillet avant l'épanouissement de la corolle, quand ils commencent à prendre une teinte rosée, puis de nouvelles inflorescences apparaissent dès le mois d'Août et seront récoltées vers le début de l'année suivante. Les clous de girofle sont mis ensuite à sécher sur des claies au soleil ou à feu doux, pendant trois jours, avant de procéder à l'griffage pour éliminer les pédicelles ou griffes. Au cours du séchage, les clous et les griffes perdent entre 67 et 72 % d'eau (Richard, 1974 ; Richard et Loo, 1992).



Figure 02: Boutons floraux et fleurs de giroflier (Danthu *et al.*, 2014)

I.5. Utilisation du clou de girofle

Traditionnellement, les clous de girofle possèdent des propriétés antiseptiques et anesthésiques qui sont utilisés pour le traitement des maux de dents, de la bouche, de la gorge, de l'inflammation de la muqueuse buccale et de la mauvaise haleine (Karkosh, 2012).

Son HES Possède différentes caractéristiques :

- Elle a un pouvoir Anti-infectieux majeur grâce à l'eugénol pour ses propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques, antiparasitaires et anti-inflammatoire (Koroch, 2007).
- Un pouvoir antiseptique et antalgique dentaire : infections dentaires (Morin *et al.*, 1983).
- Un pouvoir antioxydant, un pouvoir anesthésique.
- Un pouvoir contre les troubles digestifs.

Autres utilisations

En agriculture, Plusieurs travaux ont montré que l'huile essentielle est efficace contre les ravageurs des cultures. Elle possède un effet herbicide et protecteur des cultures contre les insectes et les champignons et un effet insecticide sur les charançons nuisibles des grains en stocks. (Danthu *et al.*, 2014).

Les clous de girofle entiers, mais aussi en poudre, servent à aromatiser les conserves de légumes, le chou rouge ou la choucroute, les compotes de pommes et autres fruits (Georgetti *et al.*, 2003).

I.6. Toxicité du clou de girofle

L'usage abusif du clou de girofle peut devenir toxique. De grandes quantités doivent être évitées pendant la grossesse. Il peut être irritant pour les voies gastro-intestinales et devrait être évité chez des personnes ayant des ulcères gastriques ou le syndrome du colon irritable.

Les surdoses peuvent causer des nausées, des vomissements, des diarrhées et de fortes hémorragies digestives.

La sur-utilisation peut conduire à une insuffisance rénale, des modifications de la fonction hépatique, une dyspnée, une perte de conscience, et même la mort. L'huile de clou de girofle, riche en eugénol peut irriter la peau et les muqueuses. En usage externe elle est potentiellement dermo-caustique. Par voie interne, est un toxique neurologique à très forte dose.

Cette huile est contre-indiquée chez les femmes enceintes, qui allaitent, les enfants, en cas d'eczémas et de fragilité cutanée.

Son emploi dépend de la dose; 100g de clous de girofle en une fois est mentionné toxique (Aouadhi, 2010).

II. *Eucalyptus globulus*

II-1. Description botanique d'*eucalyptus*

Le genre *Eucalyptus* fut décrit et baptisé en 1788 par le botaniste français Héritier, qui a examiné des échantillons d'*Eucalyptus obliqua* parmi les différentes plantes récoltées en Australie (Bingendako M.J, 2004).

Ce genre est l'un des plus importants de la famille des Myrtacées avec environ 600 espèces dont 16 sont utilisés en médecine (Ghedira *et al.*, 2008). Parmi ces espèces se trouve *Eucalyptus globulus* Labil, espèce très cultivée, prit rapidement une grande extension en Algérie entre 1860 et 1870 (Boudy, 1952).

L'*eucalyptus* est un arbre de 30 à 35 m, jusqu'à 100 m dans son milieu naturel. (Goetz, 2008). Selon Balmey et Wilson (2000), les arbres d'*Eucalyptus* ont des feuillages persistants souvent à écorce s'exfoliant (**Fig 04**). Elles présentent deux types de feuilles, souvent très larges et dressées chez les plantes juvéniles puis étroites et pendantes chez les sujets matures. Les fleurs sont généralement en bouquets ombelliformes, rarement solitaires et elles possèdent des sépales soudés en opercule conique qui tombe d'une seule pièce lorsque la fleur s'ouvre ; les étamines sont nombreuses et proéminentes (**Fig 03**)

Le fruit est la capsule anguleuse du calice, il renferme deux types de graines (Koziol, 2015) (**Fig 05**).

De plus les fruits ligneux mesurent de 1,5 à 2,5 cm de diamètre ont une capsule très dure. De nombreuses petites graines s'échappent par des valves qui s'ouvrent sur le dessus du fruit (Daroui-Mokaddem, 2012), avec une teinte marron à maturité et s'ouvrant légèrement par deux fentes croisées pour laisser des graines (Pauline, 2019). Graines : très grosses ressemblant à celle du poireau (Menager, 1952).



Figure 03: Feuilles et fleurs d'*Eucalyptus globulus* (Daroui-Mokaddem, 2012)



Figure 04: Ecorce d'*Eucalyptus globulus* (Koziol, 2015).



Figure 05: Fleurs et fruits d'*Eucalyptus globulus* (Eran, 2019).

II-2. Systématique

D'après la classification phylogénétique APG (2009), la classification de l'*Eucalyptus globulus* est comme suit :

Règne	: plantes
Embranchement	: Spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Eudicots
Sous- classe	: Rosidées
Ordre	: Myrtales
Famille	: Myrtacées
Genre	: <i>Eucalyptus</i>
Espèce	: <i>Eucalyptus globulus</i>

II-3. Utilisation de l'*eucalyptus*

L'*Eucalyptus* a plusieurs vertus thérapeutiques, le **tableau I** en illustre quelques utilisations.

Tableau I: Quelques usages traditionnels d'*E. globulus* (Slimani, 2010).

Parties utilisées	Mode	Usage	Référence
Feuilles	Tisanes des feuilles séchées ou fraîches	Usage interne : traitement des affections des voies respiratoires, plasmique, tonique, astringent, contre les parasites intestinaux, affections des voies urinaires	Ait Youcef (2006) ; Baba Aissa (1999) ; Djerroumi et Nacef (2004) ; Polleti (1982) ; Wichtl et Anton (2003)
	Aérosol (fumigation des feuilles séchées ou fraîches)	Désinfecter les maisons en période de grippe	Ait Youcef (2006); Baba Aissa (1999)
	Feuilles et l'huile d'olive	Usage externe : appliquer en cataplasme sur la tête pour abaisser la fièvre, ou dans des cas d'insolation	Ait Youcef (2006)
	Tisanes des feuilles	Usage interne : traitement du diabète	Ghedira <i>et al.</i> , (2008) ; Goetz (2007)
	Décoction	Bain de bouche pour soigner la carie dentaire, traitement de la gingivite et autres affections liées à la bouche	Ait Youcef (2006) ; Djerroumi et Nacef (2004)
	Décoction	Voie externe : les vapeurs produites et l'application du décocté servent à traiter les engelures	Ait Youcef (2006)
		Usage externe : traitement des brûlés Usage interne : antirhumatismal	Pollet (1982)

Fruits	Aérosol (fumigation)	Par inhalation : traitement de l'asthme	Ait youcef (2006)
Ecorce		Pour adultérer la poudre de cannelle ; balsamique	Ait youcef (2006)
Gomme		Usage interne : poudre administrée contre les diarrhées	Ait youcef (2006)
Plante entière		Pour désinfecter l'atmosphère par l'essence volatile, contre les moustiques	Ghedira <i>et al.</i> , (2008)
Bois		Fabrication du papier poteaux et source d'énergie	Ait youcef (2006), Batish <i>et al.</i> , (2008)

II-4. Toxicité

D'après de nombreuses données scientifiques, l'utilisation d'huile essentielle d'*Eucalyptus* est interdite chez les femmes enceintes à forte dose car pouvant provoquer des brûlures gastriques, des nausées et vomissements, de la tachycardie ainsi qu'une hypertension, des suffocations et une paralysie cérébrale et même des cas de décès (Foggie, 1911 et Vincenzi *et al.*, 2002).

Par voie orale, une dose trop élevée pourrait irriter les reins à cause des mono terpènes : α et β -pinène ainsi que le limonène contenus dans les feuilles (Anton *et al.*, 2003). Le 1,8-cinéole favorise la sécrétion de certaines glandes exocrines. Cela lui confère ses propriétés expectorantes par stimulation des glandes à mucines des muqueuses respiratoires. Cela explique également que les huiles essentielles riches en 1,8-cinéole vont stimuler les glandes digestives et vont augmenter les sécrétions gastriques, d'où une apparition d'ulcères gastriques lors d'intoxications aux huiles essentielles d'*Eucalyptus*.

Plusieurs cas d'intoxications aux huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Eucalyptus radiata* (de composition proche) ont été rapportées, notamment chez l'enfant. Les signes d'intoxications seront: nausées, vomissements, diarrhées, brûlures épigastriques, suivis de vertiges, ataxie, désorientation, perte de connaissance voire coma. Parfois, des bronchospasmes ont aussi été observés. Certains cas de convulsions ont aussi été rapportés chez des enfants.



Chapitre II

Les huiles essentielles

I. Définition

Les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexes renfermant des principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation.

Ce sont des substances huileuses, d'odeur et de saveurs généralement fortes, extraites à partir de différentes parties de certaines plantes aromatiques. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous-produits du métabolisme secondaire (Belaiche, 1979; Valnet, 1984; Wichth et Anton, 1999).

Les HEs, ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et ont donné naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie: l'aromathérapie (Bruneton, 1999).

II. Répartition

Les huiles essentielles sont largement répandues dans le règne végétal et surtout chez les végétaux supérieurs, il y aurait 17500 espèces aromatiques. (Bouhdid *et al.*, 2012).

Elles sont presque exclusivement de l'embranchement des Spermaphytes.

Les genres qui sont capables de les élaborer sont rassemblés dans un nombre restreint de familles telles que les : Lamiacées (Labiées), Pinacées (Conifères), Rutacées, Myrtacées, Poacées, Apiacées (Ombellifères), Lauracées, Astéracées (Composées), Pipéracées, Cupressacées et Rutacées (Benazzeddine, 2010).

Elles peuvent être stockées dans divers organes : fleurs, feuilles, écorces, bois, racines, rhizomes, fruits ou graine (Bouaine, 2017).

Les huiles essentielles peuvent être stockées dans tous les organes végétaux, végétatifs et reproducteurs (**Tableau II**).

III. Localisation

Selon Bouamer *et al.*, (2004), les HEs sont élaborées par des glandes sécrétrices qui se trouvent sur presque toutes les parties de la plante; elles sont sécrétées au sein du cytoplasme de certaines cellules où se rassemblent sous formes de petites gouttelettes comme la plupart des substances lipophiles

D'après Ghenaiet, et Etaouide (2016), la synthèse et l'accumulation des huiles essentielles sont généralement associées à la présence de structures histologiques spécialisées, le plus souvent situées sur ou à proximité de la surface du végétal. Il existe en fait quatre structures sécrétrices :

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

Tableau II: Localisation des huiles essentielles dans les Plantes (Garneau, 2005).

Partie de la plante	Plante
Feuilles	Romarin-sauge, sapin
Tiges	Citronnelle, lemon-grass
Ecorces	Cannelier, orange
Racines	Angelica, vétiver
Rhizomes	Gingembre, acorus, curcuma
Bulles	Oignon
Bois	Santal, quinquina
Fleurs	Jasmin, rose
Graines	Anis, aneth, muscade
Boutons floraux	Clou de girofle
Baies	Genévrier
Fruits	Citron, bleuet, persil

IV. Fonction

Les huiles essentielles émises par les plantes sous forme de vapeur ont des fonctions multiples dans la nature :

- Dans les interactions « végétaux animaux » (Bruneton, 1997) les HEs interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent.
- Coévolution des plantes avec les organismes vivants, tels que parasites, pathogènes et prédateurs, mais aussi pollinisateurs et disséminateurs. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires. (Randrianarivelo, 2010).
- Les travaux de Croteau en 1977 puis ceux de Croteau et Hooper (1978) ont montré que les composants volatils auraient un effet mobilisateur d'énergie lumineuse et de régulateur thermique au profit de la plante.

Certains terpènes jouent un rôle important et varié dans la relation des plantes avec leur environnement (Mahmout, 1992).

- Les HEs constituent «les déchets» du métabolisme cellulaire de la plante (Sallé, 1991) et servent à attirer les insectes pour permettre la fécondation (pollinisation) ou alors à les éloigner de la plante.

Elles constituent enfin un moyen de défense de la plante vis-à-vis des prédateurs tels que les microorganismes (bactéries et champignons) et les herbivores. Dans la nature, les huiles essentielles jouent un rôle important dans la protection. (Bakkali *et al.*, 2008)

V. Rôle

Depuis les temps les plus reculés, le monde végétal offre les éléments nécessaires à la survie de l'espèce humaine. En effet, les plantes demeurent la principale source de principes actifs dont le rôle et l'utilisation sont très variés (Elabed et Kambouche, 2003).

Les huiles essentielles sont connues pour être douées de propriétés antiseptiques et anti microbiennes. Beaucoup d'entre elles, ont des propriétés antitoxiques, antivenimeuses, antivirales, anti-oxydantes, et antiparasitaires. Plus récemment, on leur reconnaît également des propriétés anticancéreuses (Valnet, 2005).

VI. Composition chimique des huiles essentielles

La composition chimique des huiles essentielles révèle qu'il s'agit de mélanges complexes et variables de constituants appartenant exclusivement à deux groupes caractérisés par des origines biogénétiques distinctes : les terpénoïdes et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane (Pinto *et al.*, 2009).

VI-1. Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure cyclique ou de chaînes ouvertes. On distingue :

- **Les terpénoïdes** sont des terpènes avec une ou plusieurs fonctions Chimiques (alcool, aldéhydes, cétones, acide, etc...).
- **Les monoterpènes** sont volatils entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des HEs, parfois plus de 90%.
- **Les sesquiterpènes** il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes.

Elle contient plus de 3000 molécules (Hellal, 2011).

VI-2. Les composés aromatiques

Ils sont moins fréquents dans les huiles essentielles et généralement responsables des caractères organoleptiques des huiles essentielles. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthol, l'estragole et bien d'autres (Pinto *et al.*, 2009).

VII. Toxicité des huiles essentielle

La majorité des huiles essentielles, à de très fortes doses, causent des effets toxiques. Par leur composition chimique riche, les huiles essentielles doivent être utilisées avec une extrême prudence, du fait qu'elles peuvent présenter de très graves dangers lors d'une utilisation aléatoire autonome, surtout que le consommateur est attiré par la facilité d'emploi de ces essences en absorption interne ou en application externe (Kehal, 2013).

Parmi les propriétés indésirables, on peut souligner entre autres: les propriétés vésicantes, nécrosantes, allergiques, hépatotoxiques, neurotoxiques, etc...

Les H.Es restent toujours notoires grâce à leurs diverses propriétés médicinales en l'occurrence les propriétés anti-inflammatoires, antiseptiques, antivirales, stimulantes, toniques, calmantes, etc. (Kabera *et al.*, 2002).

VIII. Conservation des huiles essentielles

Les huiles essentielles sont fragiles et volatiles (Anton et Lobstein, 2005). Elles doivent être conservées dans des flacons colorés, hermétiquement fermés, à l'abri de l'air, de la lumière et des variations de température. L'espace d'air dans un bocal favorise leur oxydation, c'est pour cela qu'on préfère plusieurs petits contenants lors de l'embouteillage et l'achat. Il faut bien refermer les flacons après usage, car les huiles essentielles sont volatiles (Baudoux, 2002 ; Abadlia et Chebbour, 2014).

Si les conditions citées ci-dessus sont respectées, les HEs peuvent être conservées jusqu'à 2 à 5 ans en maintenant les flacons en position verticale.

IX. Propriétés pharmaceutiques et usages des huiles essentielles

En raison de leurs diverses propriétés, les HEs sont devenues une matière d'importance économique considérable avec un marché en constante croissance. En effet, elles sont commercialisées et présentent un grand intérêt dans divers secteurs industriels comme en pharmacie, en Aromathérapie, en Agro-alimentaire, en Cosmétologie et parfumerie.

Par leurs pouvoirs antiseptiques, analgésique, antispasmodique, apéritif, les essences issues des plantes sont utilisées en grande partie dans la préparation d'infusion (menthe, verveine, thym,...) et sous la forme de préparations galéniques (Sallé, 1991). Plus de 40% de médicaments sont à base de composants actifs de plantes, par exemple gastralgine est un digestif anti-acide qui se compose d'HE de carvi.

De même, elles permettent par leurs propriétés aromatisants de masquer l'odeur désagréable de médicaments absorbés par voie orale. Aussi beaucoup de médicaments vendus en pharmacie sont à base d'HEs comme par exemple les collyres, les crèmes, les élixirs, etc... (Richard, 1992).

X. Procédés d'extraction des huiles essentielles

Différentes méthodes sont mises en œuvre pour l'extraction des huiles essentielles. Cette diversité est due à la variété des matières premières et à la sensibilité considérable de certains de leurs constituants. (Garnero, 1977). Parmi les méthodes d'extraction, citons :

X -1. Hydrodistillation

Le principe consiste à immerger directement la matière végétale à traiter dans un ballon rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes vont se condenser sur une surface froide et l'HE sera alors séparée par différence de densité (Bruneton, 1993).

X -2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

Dans ce type de distillation, le matériel végétal ne macère pas directement dans l'eau. Il est placé sur une grille perforée au travers de laquelle passe la vapeur d'eau. La vapeur endommage la structure des cellules végétales et libère ainsi les molécules volatiles qui sont ensuite entraînées vers le réfrigérant. L'HE étant plus légère que l'eau, elle reste en surface. On obtient ainsi deux phases non miscibles qu'on peut séparer par décantation. (Bachelot *et al.*, 2006). Cette méthode apporte une amélioration de la qualité de l'H.E en minimisant les altérations hydrolytiques.

X -3. Hydro diffusion

Le principe de cette méthode réside dans l'utilisation de la pesanteur pour dégager et condenser le mélange «vapeur d'eau-huile essentielle» dispersé dans la matière végétale (Meyer-warnod, 1984).

X-4. Extraction à froid

Ce procédé consiste à broyer, à l'aide de presses, les zestes frais pour détruire les poches afin de libérer l'essence. Le produit ainsi obtenu porte le nom d'essence, car il n'a subi aucune modification chimique (Roux, 2008).

X-5. Extraction assistée par micro-onde

Dans ce procédé, la matière végétale est chauffée par micro-onde dans une enceinte close dans laquelle la pression est réduite de manière séquentielle. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau propre à la plante. Ils sont ensuite récupérés à l'aide des procédés classiques : condensation, refroidissement, et décantation (Hemwimon *et al.*, 2007).

X-6. Extraction par fluides supercritique

L'extraction par fluides supercritiques a pris ces dernières années, beaucoup d'essor concernant l'extraction des extraits végétaux. Le principal avantage de cette technique est celui de combiner les caractéristiques des gaz et des liquides pendant le processus d'extraction (Piochon, 2008).

X-7. L'enfleurage et la macération

L'enfleurage, consiste à déposer des pétales de fleurs odorantes sur des couches de graisses non odorantes: On obtient ainsi des pommades parfumées.

L'enfleurage peut également se pratiquer à chaud sur des graisses fondues. C'est le cas pour la violette, les fleurs d'oranger et le cassis. La macération est une technique qui consiste à extraire des espèces chimiques d'une substance à l'aide d'un solvant avec lequel la substance reste longtemps en contact. (Paris et Moyse, 1967).

X-8. Extraction par ultrasons

Le matériel végétal mis en contact avec le solvant (eau ou solvant organique) est immergé dans un bain à une agitation constante (Kimbaris, 2006).

X-9. Expression

L'expression ou pression à froid est spécifique à l'extraction des huiles essentielles des agrumes : citrons, oranges, mandarines, ...etc. C'est une méthode assez simple qui consiste à

briser mécaniquement par abrasion les poches à essence localisées au niveau de l'écorce ou du péricarpe du fruit pour en recueillir le contenu (Willem, 2004).

XI. Caractérisation biochimiques des huiles essentielles

a- Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

C'est une méthode appropriée pour la séparation et l'identification des composants d'une HE ; elle réalise à la fois une analyse qualitative et quantitative (Paris et Godon, 1979).

L'échantillon est vaporisé et injecté en tête de colonne. L'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile. La CPG est basée sur le partage de produit analysé entre une phase gazeuse mobile et une phase (liquide ou solide) immobilisée sur la surface d'un support inerte (Skoog *et al.*, 2003).

Les constituants des mélanges appelés généralement «solutés» sont inégalement retenus par la phase stationnaire lors du transit dans la colonne. De ce phénomène appelé «rétention», les solutés injectés se déplacent avec une vitesse inégale entre eux et inférieure à celle de la phase mobile, ceci les conduit à sortir de la colonne les uns après les autres. On enregistre d'abord un signal dit ligne de base en présence du gaz vecteur seul, puis un pic au passage de chaque soluté séparé (Tranchant, 1995).

b- CPG/SM couplage de Chromatographie en phase gazeuse et Spectrométrie de masse

Le spectromètre de masse permet l'identification et la quantification des composés. Il existe de nombreux type de spectromètre de masse ; tous ont en communs trois éléments : une source, un analyseur et un détecteur. La source est la partie du spectromètre de masse où sont produits des ions gazeux à partir des molécules introduites. En couplage avec le chromatographe en phase gazeuse, où les composés élués arrivent au spectromètre à l'état gazeux. Les sources utilisées sont dites à «ionisation électronique» ou à «ionisation chimique». La source est maintenue à une température élevée.

Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse est aujourd'hui une des techniques parmi les plus utilisées de la chimie analytique. L'association des deux techniques fournit un instrument d'analyse particulièrement performant. (Cavalli, 2002).

Le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence (Longevialle, 1981 ; Constantin, 1996).

Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes (Pradeau et Cohen, 1992).

- **Ionisation** : les molécules présentes dans l'échantillon se volatilisent sous l'effet du vide et de la haute température (200°C), il en résulte un mélange d'ions issus de la fragmentation de l'échantillon de départ ;
- **Accélération** : Les ions formés se dirigent vers le dispositif de séparation sous l'effet d'un champ magnétique augmentant ainsi leurs énergies cinétiques.
- **Séparation** : Les ions seront distribués suivant leur rapport masse/charge ;
- **Détection** : après séparation, les ions sont recueillis par un détecteur sensible aux charges électriques transportées ;
- **Traitement du signal** : le signal de sortie de l'appareil conduit au spectre de masse qui constitue la représentation conventionnelle de l'abondance des ions en fonction de leurs rapports : masse/charge.



Partie II

Etudes expérimentales



Chapitre I

Matériel et méthodes

I. Matériel utilisé

La partie expérimentale a été réalisée au sein des Laboratoires d'entomologie et de microbiologie au département de Biologie à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou pendant la période allant de février 2022 à mai 2022.

I-1. Matériel biologique

I-1-1. Les plantes

Le matériel végétal est constitué de deux plantes, *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus*.

Le premier a été acheté au marché de Drâa Ben Khedda. Disponible sur le marché tout au long de l'année, pour son importance, dans la tradition culinaire algérienne ainsi que son utilisation dans la médecine traditionnelle. Il se trouve sous forme séchée (**Fig 06**).



Figure 06: Boutons de clou de girofle séchés (originale, 2022).

Le second a été récolté au village Oumaden dans la wilaya de Tizi-Ouzou (Nord Algérien) au mois de juin 2021. Le séchage de cette plante a été effectué dans un endroit sec et à l'abri du soleil pendant sept jours (**Fig 07**).



Figure 07: Feuilles d'*Eucalyptus* séchées (originale, 2022).

I-1-2. Les souches bactériennes testées

Deux souches référencées fréquentes en pathologie humaine ont été sélectionnées. Il s'agit d'une bactérie à Gram- (*E.coli*) et une autre à Gram+ (*S.aureus*) caractéristiques référencées.

Ces souches proviennent du laboratoire de microbiologie, département de biologie à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

***Escherichia coli* (ATCC 25922)**

E.coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un Coccobacilles à Gram négatif et mobile avec ciliature peritriche (Kayser *et al.*, 2005).

Elle se développe dans le tube digestif de l'homme et d'animaux à sang chaud. C'est une bactérie indicatrice de contamination fécale des eaux potables et des aliments. Elle provoque des Diarrhées, gastro-entérites et des Infections urinaires (**Fig 08**).

***Staphylococcus aureus* ATCC Mu 50**

Cette espèce appartient à la famille des *Staphylococcaceae*. C'est un Cocci en grappes de raisin à Gram positif et immobile.

Elle est ubiquitaire dont le réservoir est localisé sur la peau et les muqueuses. Elle provoque des intoxications alimentaires, infections cutanées et des muqueuses, des septicémies et des pneumonies (**Fig 08**).

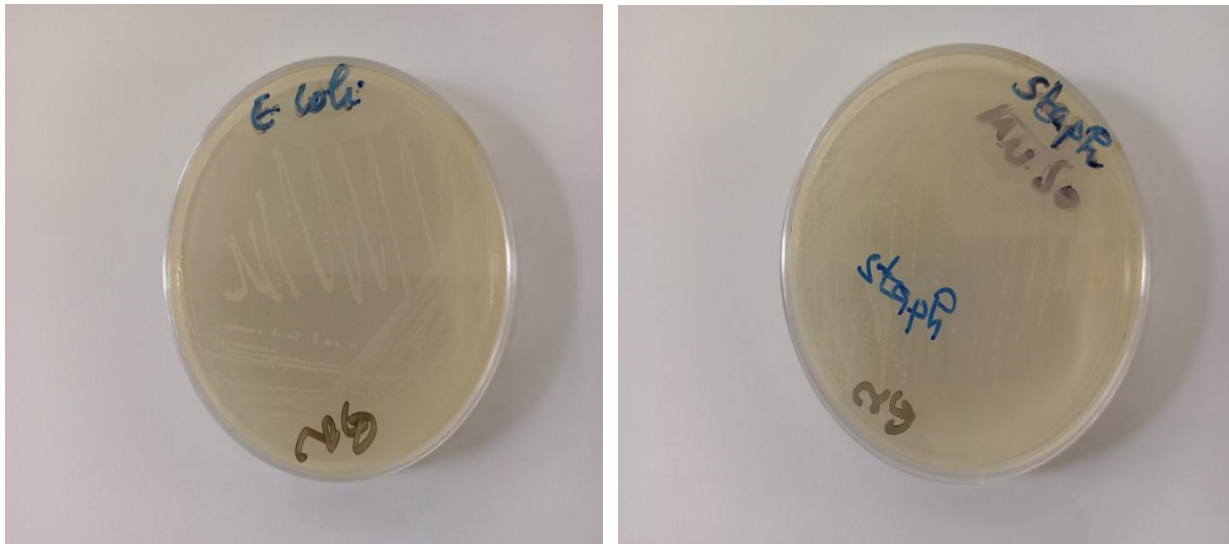


Figure 08: Colonies d'*Escherichia coli* (à gauche) et *Staphylococcus aureus* (à droite)

I.2. Produits chimiques et milieux de culture utilisés

➤ Produits chimiques

- Éthanol à 96%, eau distillée, tween 80 et eau de javel.
- Le vert d'iode et le rouge Congo, Acide ascorbique et le DPPH.

➤ Milieux de culture

Suivant les méthodes employées, et selon les souches, nous avons utilisé les milieux de cultures suivants:

- Gélose nutritive et gélose Mueller Hinton.
- Milieu liquide BHIB, milieu liquide Mueller Hinton et l'eau physiologique.
- La composition de ces milieux est décrite dans l'**annexe 01**.

I-3. Appareillage

Le matériel utilisé dans notre étude expérimentale est le suivant :

Autoclave, four Pasteur, étuve, bain-marie thermostaté, balance analytique, balance de précision, agitateur, vortex, spectrophotomètre, bec benzène et réfrigérateur.

➤ **Verreries**

- Bêchers et fioles, burette, éprouvette, erlenmayer, entonnoir, boîtes de Pétri stérile, tubes à vis stériles, flacons stériles en verre, pipettes Pasteur, ampoule de décantation.

➤ **Autres**

- Ciseau, pince, micropipettes, embouts, spatule, papier aluminium, papier filtre, para film et portoir.

II. Méthodes expérimentales

II-1. Extraction des huiles essentielles par entraînement à la vapeur d'eau

Le matériel végétal est soumis à un entraînement à la vapeur au moyen d'un dispositif illustré par la **figure 07**. Cette technique se base sur le pouvoir que possède la vapeur d'eau à entraîner les huiles essentielles. Le dispositif se trouve supporté par une grille ou une plaque perforée placée à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli d'eau. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les plantes en entraînant les molécules aromatiques vers un système de refroidissement.

L'opération d'extraction dure trois heures à partir du début d'ébullition. Elle consiste à introduire 250 g de masse végétale dans une plaque perforée, à une distance adéquate du fond de l'alambic, rempli au 1/3 d'eau distillée. Les vapeurs chargées d'huile essentielle passent à travers le tube vertical puis dans le serpentin de refroidissement et l'huile essentielle se sépare par décantation. (Hajji, 1985). Les phénomènes intervenant lors de l'entraînement à la vapeur seraient des phénomènes d'osmose et de diffusion libre (Gunther, 1972) (**Fig 09**).

En fonction de sa densité, l'HE peut être recueillie à deux niveaux :

- ✓ Au niveau supérieur du distillat, si elle est plus légère que l'eau, ce qui est fréquent (c'est le cas d'*Eucalyptus*).
- ✓ Au niveau inférieur, si elle est plus dense que l'eau (c'est le cas des clous de girofle).

Les huiles essentielles ainsi obtenue sont stockées dans des flacons en verre ambré ou foncé au réfrigérateur (-4°C), dans de petits contenants. Les flacons sont bien fermes et stockés en position verticale.



Figure 09: Dispositif d'extraction d'huile essentielle par entrainement à la vapeur d'eau (laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie, 2022).

II-2. Calcul du rendement et de la densité

Le rendement en huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile obtenue extraite et la masse de matière végétale traitée (Kapadiya et Desai, 2017). Le rendement est exprimé en pourcentage (%) et calculé par la formule suivante :

$$\text{RHE} = (M1/M0) \times 100$$

RHE: Rendement en huile essentielle en %.

M1: Masse de l'huile essentielle obtenue en (g).

M0: Masse de la matière végétale en (g).

La densité relative d'une huile essentielle est le rapport de la masse d'un certain volume d'une HE, à la masse d'un volume égal d'eau distillée.

Mesure de densité est le rapport $P = m/V$ m = masse d'huile, V = volume d'huile.

II-3. Etude des activités biologiques

II-3-1. Etude de l'activité antibactérienne

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antibactérienne de deux plantes médicinales à savoir *S.aromaticum* et *E.globulus* sur deux espèces bactériennes (*E.coli* et *S.aureus*) par deux méthodes :

- La diffusion des disques en milieu solide pour la détermination des diamètres de la zone d'inhibition.
- La méthode de micro dilution qui a pour but la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à partir d'une gamme de concentration de produit dans le milieu de culture.

II-3-1-1. Revivification et standardisation des souches microbiennes

a- Préparation de l'inoculum

- Préparation des pré-cultures

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir de cultures jeunes de 18 à 24h. Des souches bactériennes sont réactivées par ensemencement de l'espèce bactérienne dans un milieu liquide (BHIB) à l'aide d'une anse à boucle. Après incubation pendant 24 heures à 37°C.

• Repiquage des souches

Un deuxième repiquage est réalisé par des stries serrées dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive puis, incubées à 37°C pendant 24 heures (Moroh *et al.*, 2008).

• Préparation des suspensions bactériennes

Après 24 heures d'incubation à 37°C, 3 à 5 colonies bien isolées et identiques sont prélevées et déchargées dans 5 ml d'eau physiologique stérile (0.9% NaCl). Une agitation est ensuite effectuée au vortex pendant quelques secondes. La standardisation de la suspension à 10^8 UFC/ml, est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 620 nm. Ajuster l'inoculum, soit en ajoutant des cultures s'il est trop faible ou eau physiologique stérile s'il est trop fort. La densité optique de la suspension doit être comprise entre [0,08 et 0.1] (10^8 UFC/ml) (Fauchère et Avril, 2002). L'ensemencement doit se faire après 15min de la préparation (Bonnet *et al.*, 2017).

b- Etude de la sensibilité des souches aux HEs**Les agents antibactériens testés**

Les HEs testées durant notre étude sont issues des plantes appartenant à la famille des Myrtacées à savoir HEC et HEE.

c- Test *in vitro*

Pour évaluer l'activité antimicrobienne des HEs, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé en utilisant des disques stériles en cellulose: appelée aromagramme (Sharififar, 2007). Le principe de la méthode est tiré à partir du titrage des antibiotiques (Benjlali *et al.*, 1986).

1- Protocole

Le milieu de culture gélosé Mueller Hinton (M.H) est coulé aseptiquement (entre deux bec benzènes) et en surfusion, dans des boîtes de Pétri à raison de 15 ml par les boîtes de 90 mm de diamètre et les laisser ensuite refroidis et solidifiés sur la paillasse. À partir d'une suspension bactérienne diluée et standardisée à 10^6 UFC/ml soit au 1/10, 200µl ont été prélevées puis étalés d'une façon uniforme à l'aide d'un râteau à la surface du milieu gélosé MH. Laisser sécher pendant 5 min.

Quatre doses d'HE pure ont été testées (0.5; 1; 1.5 et 2µl) à raison de trois répétitions par dose et par souche bactérienne.

- Dépôt de disques

Cette étape consiste à déposer à l'aide d'une pince stérile des disques stériles de papier wattman n°3 (6 mm de Ø) imbibés d'HE de chaque extrait à la surface de la géloseensemencée par la souche bactérienne testée.

Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser (migration des HEs) à température ambiante pendant 20 mn puis incubées à 37°C pendant 24 h. Cette méthode permet de mettre en évidence l'effet antimicrobien de l'huile essentielle sur la souche étudiée (Amhis *et al.*, 2001). L'activité antibactérienne de l'huile essentielle de *Syzygium aromaticum* et *Eucalyptus globulus* a été mise en évidence par l'emploi d'un antibiotique (la gentamicine) en tant que témoin positif et de l'eau distillée stérile comme témoin négatif.

- Incubation

Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 37°C pendant 24h. Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des disques imbibés d'HEs selon un gradient de concentration.

- Lecture

La lecture est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C. L'activité antibactérienne est déterminée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. Elles sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle et exprimés en millimètre (le diamètre du disque 6mm est inclus). Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi *et al.*, 2006). Les résultats peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis des HEs et classé selon les zones d'inhibition, (Ponce *et al.*, 2003) (**Tableau III**).

Tableau III: Le diamètre des zones d'inhibitions (Ponce *et al.*, 2003).

Sensibilité	Le diamètre d'inhibition « D »
Non sensible (-) ou résistante	diamètre < 8 mm
Sensible (+)	diamètre compris entre 9 à 14 mm
Très sensible (++)	diamètre compris entre 15 et 19 mm
Extrêmement sensible (+++)	diamètre > 20 mm

II-3-1-2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) par la méthode de dilution en milieu liquide

1- Principe

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la dernière ou la plus faible concentration d'un agent antimicrobien qui peut inhiber visiblement la croissance d'un microorganisme (Oussou *et al.*, 2008; Derwich *et al.*, 2010).

2- Méthode

Préparation de la gamme de dilution

Dans un premier temps, mélanger 4600µl de MHB avec 400 µl d'HE à tester et deux gouttes de tween 80 puis réaliser une série en cascade de dilution de demi en demi (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) mg/ml (Oussou et al., 2004), à partir d'une solution mère d'un volume initial de 5000 µl. Ajouter ensuite 13µl d'inoculum (10^8 UFC) dans chaque tube. Mélanger au vortex après chaque opération.

Le dernier tube correspond au contrôle négatif ou témoin qui contient uniquement 2500µl de MHB et deux gouttes de tween 80.

- Incubation

La galerie ainsi préparée sera incubée à 37°C pendant 24h.

- Lecture

La lecture ont été effectuée à l' œil nu en sachant que la CMI est la concentration la plus faible de l'extrait à laquelle aucun trouble n'est observé (Eloff, 1998).

II-3-2. Etude de l'activité antioxydante

Le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle est développé comme substitut dans la conservation alimentaire. Il a été testé en employant la méthodes du piégeage du radical libre DPPH qui est fréquemment utilisée pour mesurer le pouvoir antioxydant des produits naturels et synthétiques (Obame *et al.*, 2007).

II-3-2-1. Test de piégeage du radical libre DPPH

➤ Principe

Le principe est fondé sur le pouvoir des antioxydants qui jouent le rôle de piègeurs de radicaux libres. En présence de molécules dites antioxydants, le radical libre DPPH (2,2 diphényl 1 picrylhydrazyl), caractérisé par sa couleur violette, se réduit en (2,2 diphényl 1 picryl hydrazine) de couleur jaune, ce qui conduit à la diminution de l'absorbance (Maataoui *et al.*, 2006) (**Fig 10**).

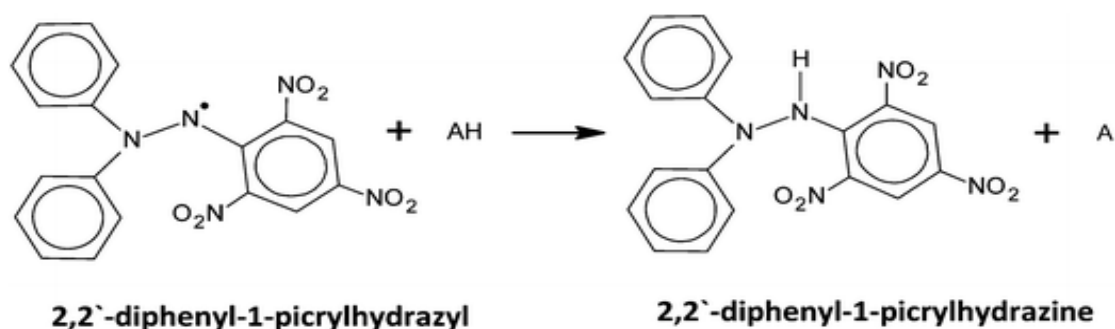


Figure 10: Forme libre et réduite du DPPH (Prakash, 2001; Molyneux, 2004).

➤ Mode opératoire

Cette activité a été testée par la méthode décrite par Blois (1958).

Pour chaque extrait, nous avons préparé une gamme de dilution (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 et 1/64) des HEs dans du méthanol. 400µl de DPPH (0.04g/l) est ajouté à 400l du mélange de chaque dilution. La lecture de l'absorbance est faite à 515nm après 30 min d'incubation à l'obscurité et à température ambiante.

Parallèlement, un contrôle négatif (témoin) est préparé en mélangeant 400µl de méthanol avec 400µl de la solution méthanolique de DPPH. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique dont nous avons préparé la même série de dilution que les extraits. L'absorbance des deux contrôles a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

A l'œil nu, la présence de l'activité antioxydante contre le DPPH s'observe par le changement de la couleur de ce dernier du violet au jaune. La mesure de la valeur exacte de cette activité a été calculée et exprimées en pourcentage d'inhibition (I %) en appliquant la formule suivante :

$$I \% = [(Abs\ contrôle - Abs\ échantillon) / Abs\ contrôle] \times 100$$

Abs contrôle: Absorbance du contrôle négatif à 515 nm.

Abs échantillon: Absorbance de l'échantillon à 515 nm.

II-3-2-2. Calcul des IC50

L'IC50 (concentration Inhibitrice de 50 %) appelée aussi EC50 (Efficient Concentration 50) est la concentration des extraits testés nécessaires pour réduire 50% de radical libre DPPH.

L'IC50 est déterminée à partir de la courbe de régression linéaire ($y = ax + b$) des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration des échantillons testés (Molyneux, 2004).

Ainsi, l'échantillon qui présente l'IC50 la plus faible est celui dont l'activité anti-radicalaire la plus importante.

II-3-3. Réalisation des coupes anatomiques

Afin de localiser les sites de sécrétion des huiles essentielles pour les clous de girofle et l'*Eucalyptus*, des coupes anatomiques transversales au niveau des clous de *Syzygium aromaticum* et les feuilles fraîches d'*Eucalyptus globulus* ont été réalisées.

Pour cela, nous avons adopté la méthode de la double coloration qui consiste à placer les coupes dans l'eau distillée pendant 5mn puis les placer dans de l'eau de javel pendant 20mn afin de vider les cellules de leurs contenus. Les coupes sont ensuite rincées à l'eau distillée pendant 5mn et mises dans l'acide acétique à 5% pendant deux à trois minutes pour éliminer toute trace d'eau de javel. Après rinçage à l'eau distillée pendant 5mn, nous avons procédé à une première coloration à l'aide du vert d'iode (colore sélectivement la lignine en vert bleu) pendant 5mn. Les coupes sont ensuite rincer et mises dans le deuxième colorant le rouge de Congo (colore sélectivement la cellulose en rose) pendant 10mn; les coupes sont ensuite rincées à l'eau distillée sont prêtes à être observées au microscope photonique à différent grossissement.



Chapitre II
Résultats et discussion

II-1. Description des HEs obtenues

II-1-1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles des deux espèces, à savoir *S.aromaticum* (Fig 11) et *E.globulus* (Fig 12) obtenues par entrainement à la vapeur d'eau sont consignés dans le **tableau IV**.

Tableau IV: Caractéristiques organoleptiques des HEs étudiées.

Plante	Aspect	Couleur	Odeur	Saveur
<i>S.aromaticum</i>	Liquide	Jaune	Forte et agréable	Aromatique et Brulante
<i>E.globulus</i>	Liquide	Incolore	Forte et aromatique	Rafraichissante



Figure 11: Huile essentielle de *Zyzygium aromaticum*



Figure 12: Huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

II-1-2. Rendement en huiles essentielles

Les rendements des HEs extraites par entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle de laboratoire (Laboratoire de Biochimie Analytique et Biotechnologie) à partir des Clous de girofle (RHEc) et des feuilles d'*Eucalyptus* (RHEe) ont été calculés et mentionnés dans le **tableau V**.

Calcul du rendement d'HE des Clous de girofle

$$RHEc = (M1/M0) \times 100$$

$$RHEc = (14.01/250) \times 100$$

$$RHEc = 5.60\%.$$

Calcul du rendement d'HE d'*Eucalyptus*

$$RHEe = (M1/M0) \times 100$$

$$RHEe = (2.01/250) \times 100$$

$$RHEe = 0.80\%.$$

Tableau V: Résultat du rendement des HEs des deux espèces étudiées.

Plante	Rendement (%)	Densité
<i>S.aromaticum</i>	5.60	1.04
<i>E.globulus</i>	0.80	0.88

Le rendement en huiles essentielles extraite de *S.aromaticum* obtenu dans la présente étude est de 5,60%. Cette valeur est supérieure à celles obtenus par Boukhatem (2017), Banouh et Azzouz (2019), Adli (2015), Atmani et Baira (2015) et Medfouni et Hafsi (2018); qui sont respectivement de 3,302%, 3,4%, 0,84%, 3,5% et 4%.

Bien que certaines études ont révélé des rendements supérieurs à nos résultats. Ils sont de 11,56% (Haddouche et Dernani, 2018), 10,60% (Adli 2015) 11,407% (Louni 2013).

Pour l'*E.globulus*, le rendement en huile essentielle obtenu dans notre étude est de 0,80% bien supérieur à celui obtenu par Boudjehem (2019) (0,64%), Boukhalfoun (2012) avec une valeur de 0,11% ; et à ceux de Rabiati (2014) qui a obtenu un rendement de 0.43%. Cependant nos résultats sont inférieurs à celui obtenu par Bey ould si said (2014) pour la même espèce, qui a obtenu une teneur en huile essentielle de 2,53 % et Raho et al. (2012) avec une valeur de 1,2%.

Les variations des teneurs en huiles essentielles peuvent être attribuées à plusieurs facteurs notamment le degré de maturité des plantes, l'interaction avec l'environnement (type de climat, sol, etc...), le moment de la récolte et la méthode d'extraction (Laib, 2012).

II-1-3. Calcul des densités

II-1-3-1. Calcul de la densité d'HE des Clous de girofle

$$D_c = M_{HEc} / M_e$$

$$D_c = 1.0394 / 1$$

$$D_c = 1.04.$$

II-1-3-2. Calcul de la densité d'HE d'*Eucalyptus*

$$De = M_{HEc} / M_c$$

$$De = 0.8792 / 1$$

$$De = 0.88.$$

II-2. Activité antibactérienne

II-2-1. Evaluation par la méthode de diffusion des disques

L'effet des HEs sur la croissance des deux agents pathogènes a été évalué par l'appréciation du diamètre de la zone d'inhibition engendrée en présence de chacune des souches étudiées.

Les résultats montrent que la présence d'HE exerce des effets variables sur la croissance des deux bactéries testées et ce en fonction de l'espèce végétale considérée et de la concentration utilisée.

L'effet antibactérien des deux huiles testées s'est révélé fort intéressant. En effet, l'échelle des valeurs de la CMI établie, a permis de distinguer la sensibilité des deux agents pathogènes à la présence des deux HEs. Cette sensibilité s'est manifestée par de faibles zones d'inhibition (inférieure à 20mm) quel que soit la concentration d'huile essentielle utilisée. Ainsi, les diamètres des zones d'inhibition enregistrés ne dépassent pas les 18,33mm pour *E.coli* et 17,67mm pour *S.aureus* et ce à la plus forte dose de 2µl dans le cas de *Syzygium aromaticum* (**Fig 13**), et 11,5mm pour *S.aureus* et 10,5mm pour *E.coli* dans le cas de l'utilisation d'HE d'*E.globulus* (**Fig 14**).

La lecture des résultats obtenus nous indiquent clairement que les effets des deux HEs augmentent en fonction de la concentration utilisée. En effet, le diamètre de la zone d'inhibition est proportionnel à la concentration testée. Il est tout à fait possible de prévoir des effets plus significatifs si les concentrations testées étaient plus élevées.

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibitions des HEc et HEE sont traduites par les histogrammes des **figures 15** et **16** respectivement.

Syzygium aromaticum

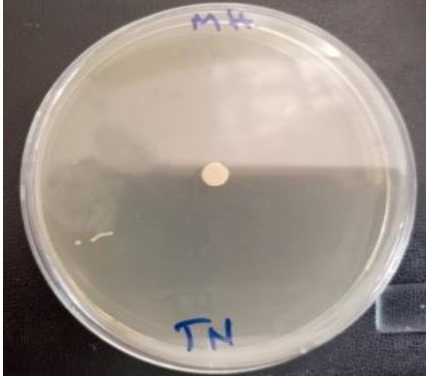
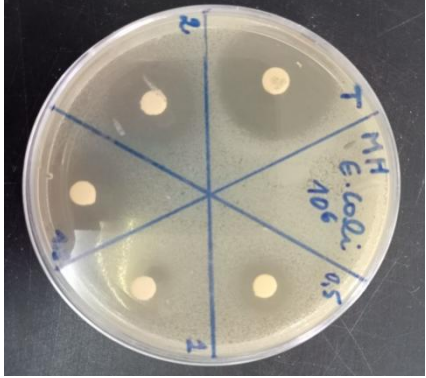
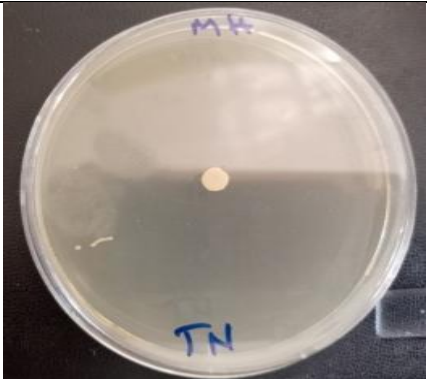
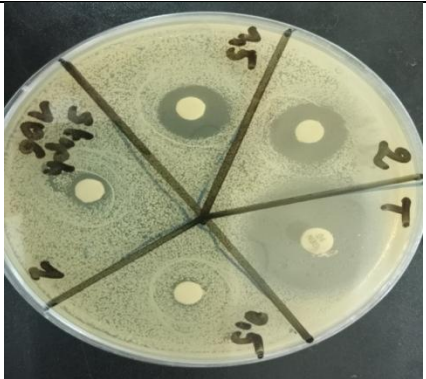
<p><i>E.coli</i></p>	 <p>TN</p>	 <p>TP + Echantillons</p>
<p><i>S.aureus</i></p>	 <p>TN</p>	 <p>TP + Echantillons</p>

Figure 13: les zones d'inhibition en fonction des différentes doses d'HE de *Syzygium aromaticum*.

Eucalyptus globulus

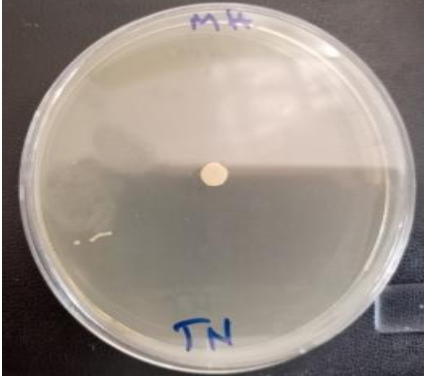
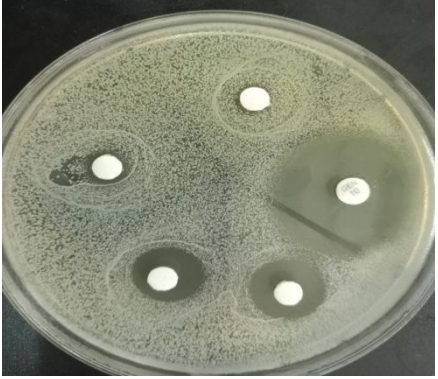
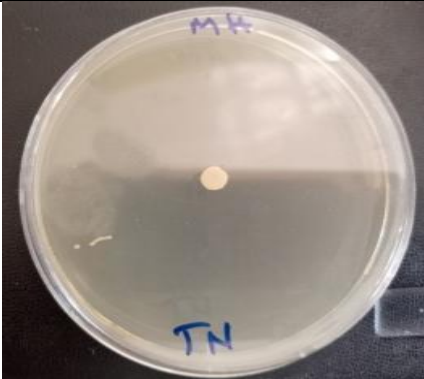
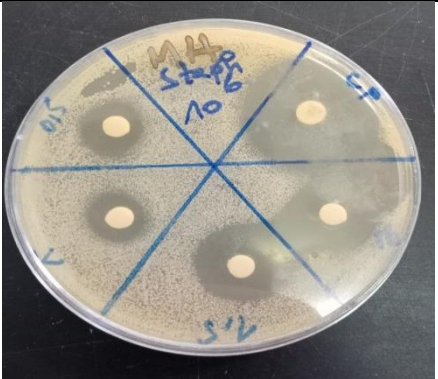
<p><i>E.coli</i></p>	 <p>TN</p>	 <p>TP + Echantillons</p>
<p><i>S.aureus</i></p>	 <p>TN</p>	 <p>TP + Echantillons</p>

Figure 14: les zones d'inhibition en fonction des différentes doses d'HE d'*Eucalyptus globulus*.

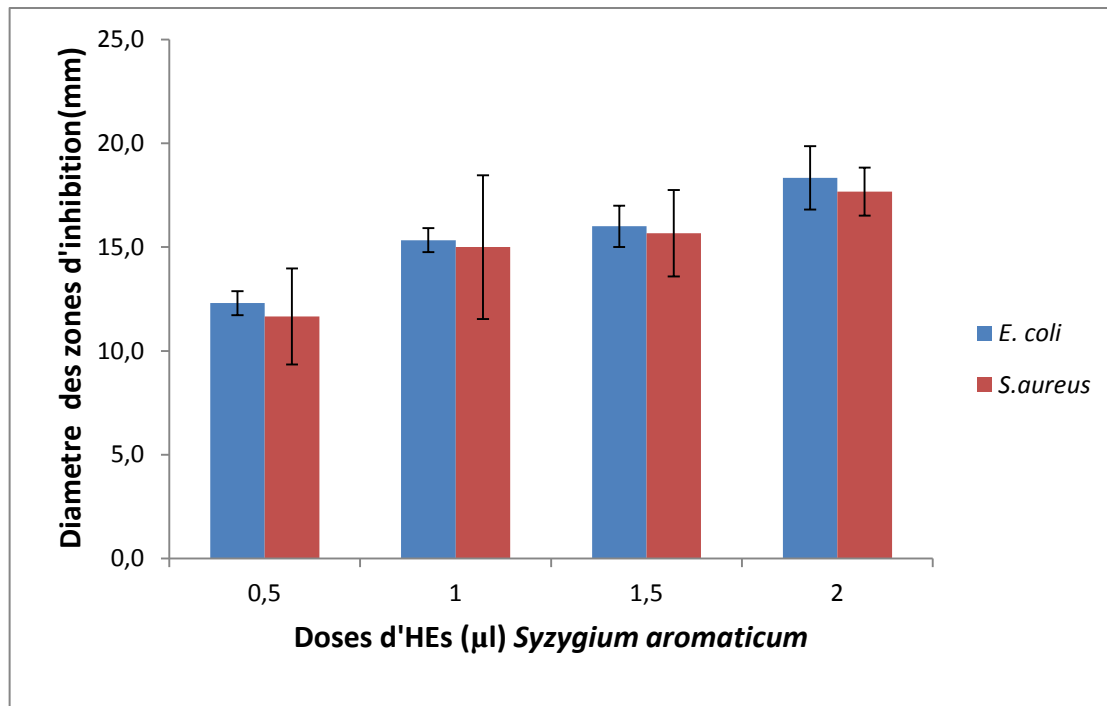


Figure 15: Effet de concentrations croissantes de l'HEc sur la croissance des bactéries.

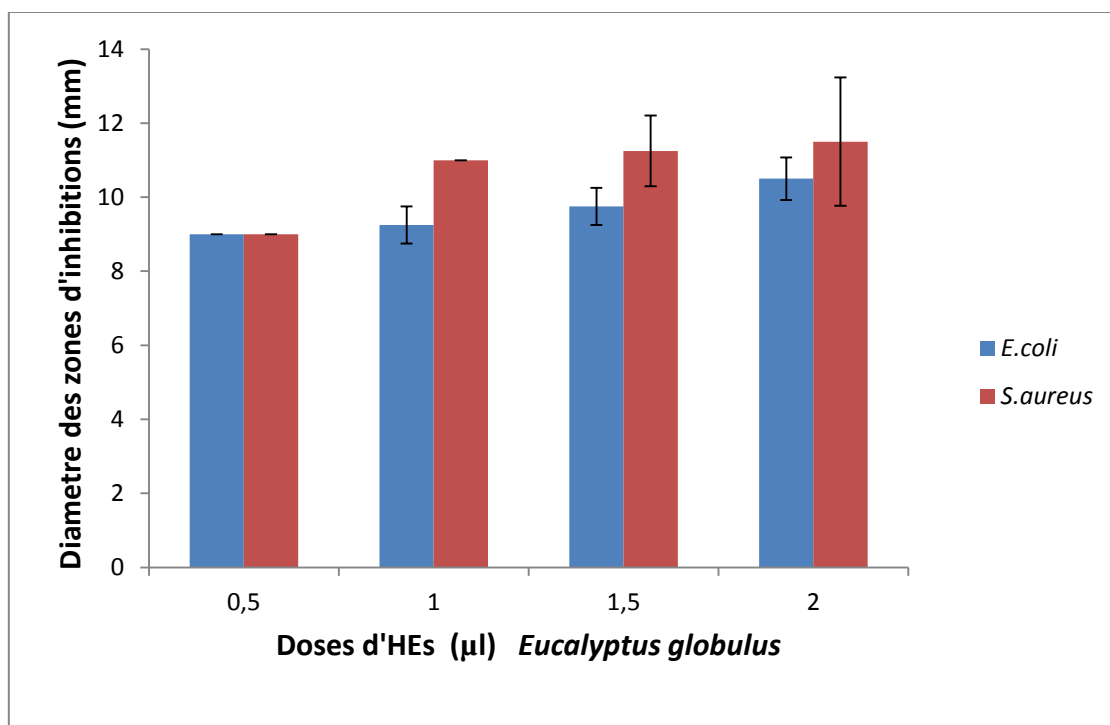


Figure 16: Effet de concentrations croissantes de l'HEe sur la croissance des bactéries.

Analyse statistique

Pour la souche *E.coli*

Les résultats sont groupés dans le **tableau VIII annexe 03**.

L'analyse de la variance à deux critères de classification a montré une différence hautement significative pour le facteur dose ($P=0,000$; $F=168,033$; $ddl=1$).

Pour le facteur huile ($P=0,000$; $F=199,033$; $ddl=4$) et pour l'interaction du facteur huile et dose ($P=0,00001$; $F=14,7$; $ddl=4$).

Tableau VI: Résultats statistique *E.coli*.

M±E Doses	<i>S.aromaticum</i>	Groupes homogènes	<i>E.globulus</i>	Groupes homogènes
0	0±0,000	E	0±0,000	E
0,5	12,333±2,309	C	9±0,000	C
1	15,333±0,577	B	9,333±0,577	C
1,5	16±1	B	9,667±0,577	C
2	18,33±1,582	A	10,333±0,577	C

Pour la souche *S.aureus*

L'analyse de la variance à deux critères de classification a montré une différence hautement significative pour le facteur dose ($P=0,000$; $F=44,182$; $ddl=1$).pour le facteur huile ($P=0,000$; $F=94,636$; $dd=4$) et pour l'interaction facteur dose x facteur huile ($P=0,012$; $F=4,182$; $ddl=4$)

Les résultats sont illustrés dans le **tableau IX annexe 04**.

Tableau VII: Résultats statistique *S.aureus*

M±E Doses	<i>S.aromaticum</i>	Groupes homogènes	<i>E.globulus</i>	Groupes homogènes
0	0±0,000	C	0±0,000	C
0,5	11,667±0,00	B	9±0,000	B
1	15±0,000	A	11±0,000	B
1,5	15,667±1	A	11±0,000	B
2	17,667±1,732	A	11±1	B

La bibliographie recèle de nombreuses informations relatives à différents résultats de recherches menées sur la bioactivité des HEs sur de nombreux germes pathogènes.

Les huiles essentielles agissent aussi bien sur les bactéries à Gram positives que sur les bactéries à Gram négatives. Toutefois les bactéries à Gram négatives paraissent moins sensibles à leur action. Ceci pourrait être lié à la structure de leur paroi cellulaire (Burt, 2004).

Bakkali *et al.* (2008) ont rapporté que l'activité antimicrobienne est due à la cytotoxicité des HEs qui endommagent la membrane cytoplasmique des bactéries lorsqu'elles diffusent à travers la paroi cellulaire.

May *et al.* (2000) ont rapporté que la croissance des bactéries résistantes aux antibiotiques peut être inhibée par certaines huiles essentielles comme celles des *Rutacées*, de *Lamiacées*, des *coniférales* et de *Myrtacées* comme c'est le cas d'ailleurs de *Staphylococcus aureus* résistant à la methicilline.

Les huiles provenant de *Rutacées*, de certaines *Lamiacées* et *Myrtacées* pourraient se révéler efficace contre les Staphylocoques dorés (May *et al.*, 2000).

Les résultats obtenus certifient qu'*E.coli* et *S.aureus* sont très sensible à l'huile essentielle des clous de girofle car le taux d'inhibition de la croissance des colonies bactérienne est de 18,33mm et de 17,67mm respectivement, alors que pour l'huile essentielle d'*Eucalyptus aureus*, ces deux souches sont sensibles avec un diamètre d'inhibition de 10,5mm pour *E.coli* et de 11,50mm pour *S.aureus*. Nos résultats sont conforme à celui de Hassani *et al.*, (2017) qui ont constaté un effet bactéricide important de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* sur *E.coli* et *S.aureus*. Ces auteurs ont conclu à l'efficacité de l'huile

essentielle de la Lamiacées citée avec des taux d'inhibition respectifs de 73,33% pour *S.aureus* et 87,77% pour *E.coli* avec une concentration de 10µl d'HE.

D'après Vieira *et al.*, (2017), HEs de feuilles d'*E.globulus* portugais, présente une absence d'activité anti microbienne contre la souche d'*E.coli* Gram négatif et une très forte activité contre *S.aureus* Gram positif avec une zone d'inhibition de 9 et 36 mm de diamètre respectivement. Une autre étude faite par Djelloul *et al.*, (2017), en testant l'huile essentielle de feuilles d'*E.globulus* algérienne dans la région d'El Kala sur les mêmes souches bactériennes a montré une absence d'effet anti bactérien sur *S.aureus* avec un léger effet inhibiteur vis-à-vis d'*E.coli*

Dans le même ordre d'idée, les résultats relatifs à une même étude avec l'HE d'*E.globulus* de provenance australienne n'ont montré aucun effet vis-à-vis des deux souches testées (2mm pour *E.coli* et 8mm pour *S.aureus*).

II-2-2. Détermination de la CMI en milieu liquide

Les résultats de la CMI sont représentés dans les **tableaux X et XI** et les **figures 17 et 18**.

Tableau X: Résultats de la CMI pour l'HEc.

Extrait	<i>S.aromaticum</i>							
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Concentration (mg/ml)								
<i>E.coli</i>	++	+	+	-	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	++	++	+	+	-	-	-	-

Tableau XI: Résultats de la CMI pour l'HEe.

Extrait	<i>E.globulus</i>							
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
<i>E.coli</i>	++	++	+	+	-	-	-	-
<i>S.aureus</i>	++	+	+	-	-	-	-	-

Les CMI obtenues correspondent à 5mg/ml pour *S.aromaticum* et de 10mg/ml pour *E.globulus*.

D'après ces résultats, le pouvoir inhibiteur des HEs a diminué avec la diminution de la concentration des HEs qui pourrait s'expliquer par la diminution des substances bioactives.

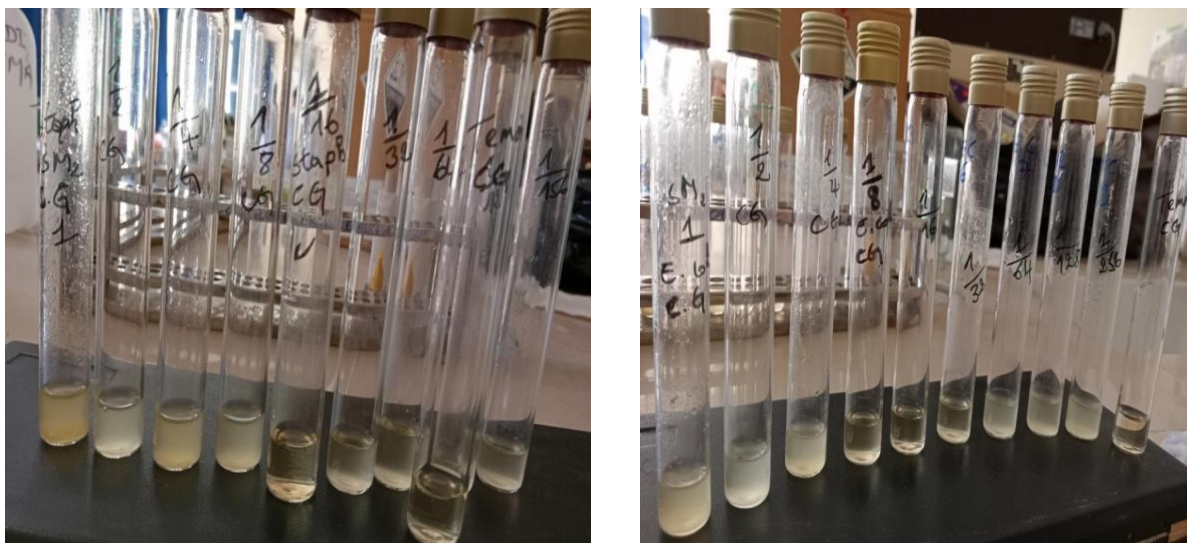


Figure 17: CMI de *Syzygium aromaticum*



Figure 18: CMI d'*Eucalyptus globulus*.

II-3. Activité antioxydante

II-3-1. Piégeage du radical libre DPPH

Nous avons étudié le pouvoir antioxydant des HEs des deux plantes testées par la capacité de piégeage de radical DPPH, afin de savoir quelle est la plante qui présente l'activité la plus élevée. L'activité antioxydante des HEs a été évaluée par le test du DPPH, utilisé pour la rapidité des résultats et pour le ciblage des molécules douées d'activités antioxydante présentes dans les extraits végétaux (Yi et al, 2008).

L'activité antioxydante du DPPH est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 515nm. L'activité anti radicalaire est détectée par la réduction du radical DPPH qui s'exprime par le virement de couleur violette au jaune qui est dû à sa réduction à une forme non radicalaire DPPH-H par un antioxydant (AH) donneurs d'hydrogènes présent dans l'extrait végétal comme le montre les équations suivantes (Maisuthisakul *et al.*, 2007, Da Silva Pinto et al., 2008) (**Fig 19**).

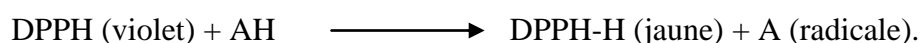




Figure 19: Réduction du DPPH par les HEs.

Nous avons étudié l'activité antioxydante des HEs des deux plantes testées à partir des valeurs de l'absorbance obtenues et calculé ensuite les pourcentages d'inhibition.

Les valeurs obtenues ont permis de tracer une courbe ayant une allure exponentielle qui représente les variations du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations des HEs utilisées.

L'acide ascorbique est le standard le plus souvent employé dans cette méthode. Les résultats obtenus ont été représentés par une droite de régression linéaire avec un coefficient de corrélation (R^2) égale à 0.933 (**Fig 20**) et par une courbe de cinétique de réduction de DPPH (**Fig 21**).

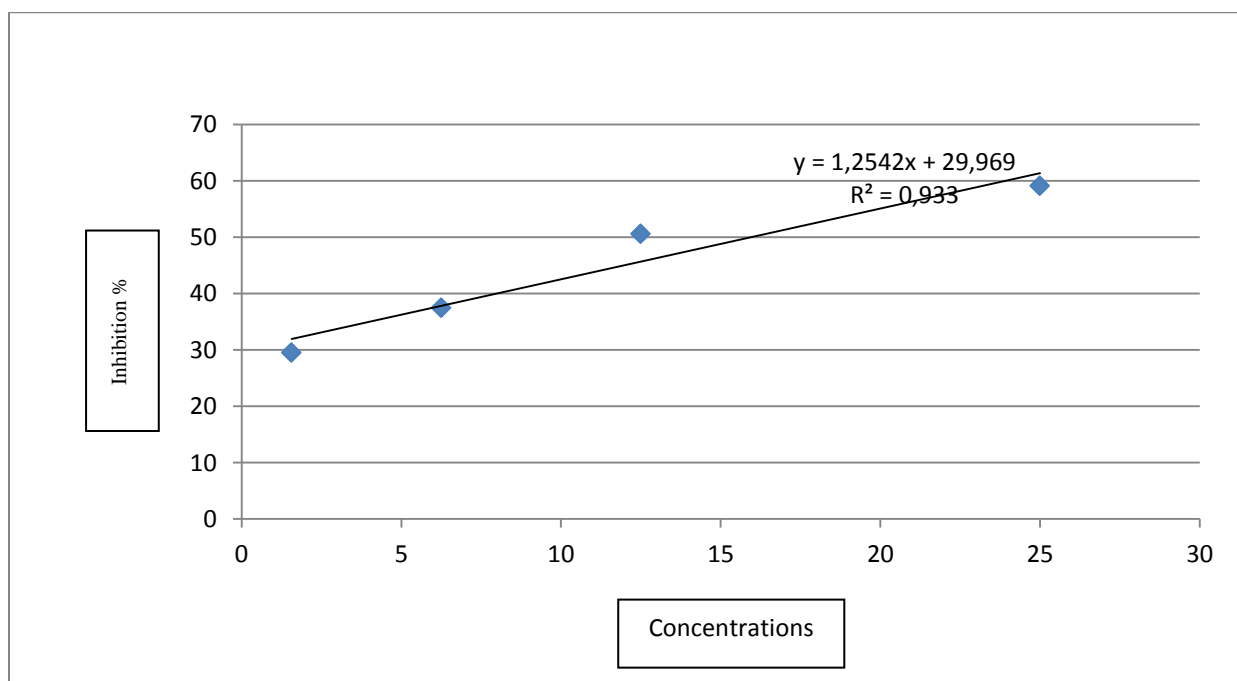


Figure 20: Détermination de l'IC₅₀ de d'acide ascorbique.

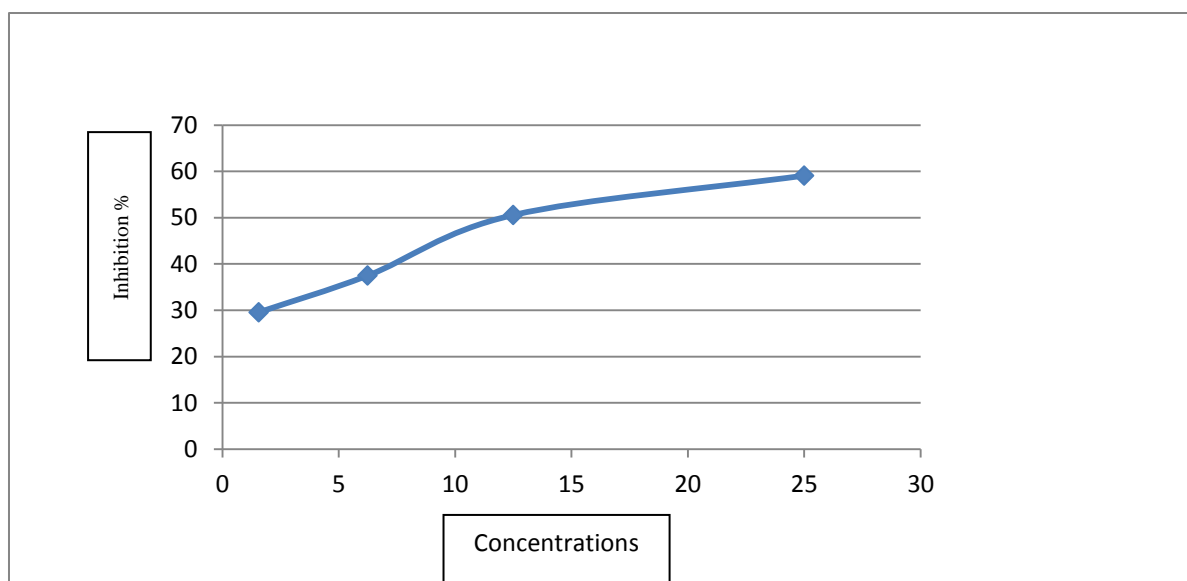


Figure 21: Cinétique d'inhibition du DPPH par l'acide ascorbique.

La droite de régression obtenue avec les concentrations de l'HE de *S.aromaticume* est linéaire avec un coefficient de corrélation (R^2) de 0,958, cela montre une forte corrélation positive entre le taux d'inhibition du radical libre (DPPH) et les concentrations d'huile essentielle utilisées. Ce qui démontre une activité anti-oxydante importante de *S.aromaticum* (Fig 22).

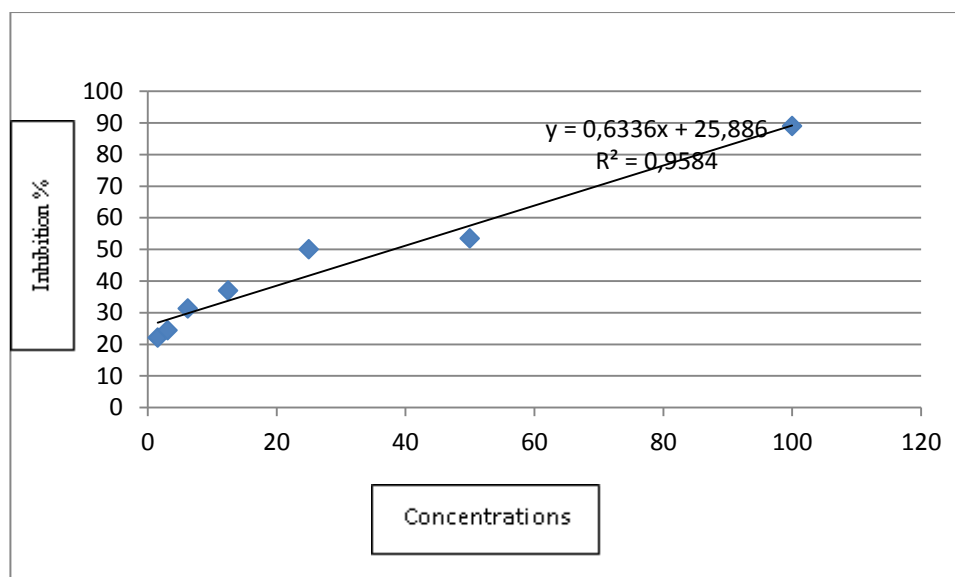


Figure 22: Détermination de l'IC50 de l'HE de *S.aromaticum*.

La droite de régression obtenue avec les concentrations de l'HE d'*E.globulus* est linéaire avec un coefficient de corrélation (R^2) de 0,740, ce qui montre une moyenne

corrélation positive entre le taux d'inhibition du radical libre (DPPH) et les concentrations d'huile essentielle utilisées (**Fig 23**). Ce qui démontre une activité anti-oxydante d'*E.globulus* moins importante que celle de *S.aromaticum*. Les courbes d'inhibitions des HEc et HEe sont représentées par les **figures 24** et **25** (voir **annexe 02**).

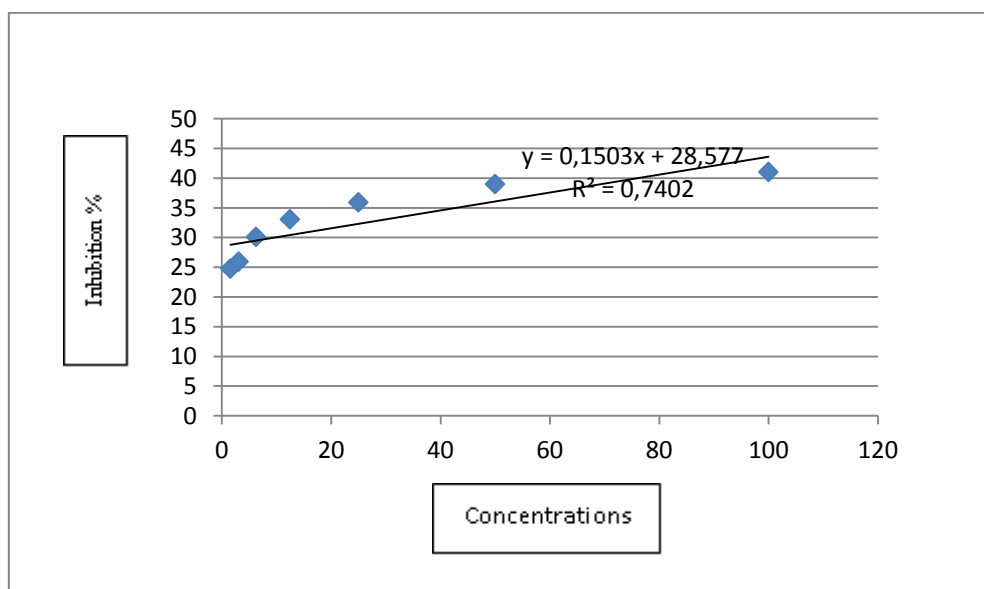


Figure 23: Détermination de l'IC50 de l'HE d'*E globulus*.

D'après la droite d'étalonnage de HEc et HEe dans les **figures 21** et **22**, l'activité antioxydante des HEc est trois fois plus forte que celle des HEe.

A une concentration de 25mg/ml d'HEc, la réduction du DPPH est de 50,01%, comparativement à celle de l'acide ascorbique dont le pourcentage d'inhibition est de 59,09%.

L'HEe a montré un pouvoir de piégeage du radical libre DPPH faible pour la même concentration. Elle présente une activité antioxydante de 35,91%, inférieures à celle de l'acide ascorbique (59,09%) et de *S.aromaticum* (50,01%).

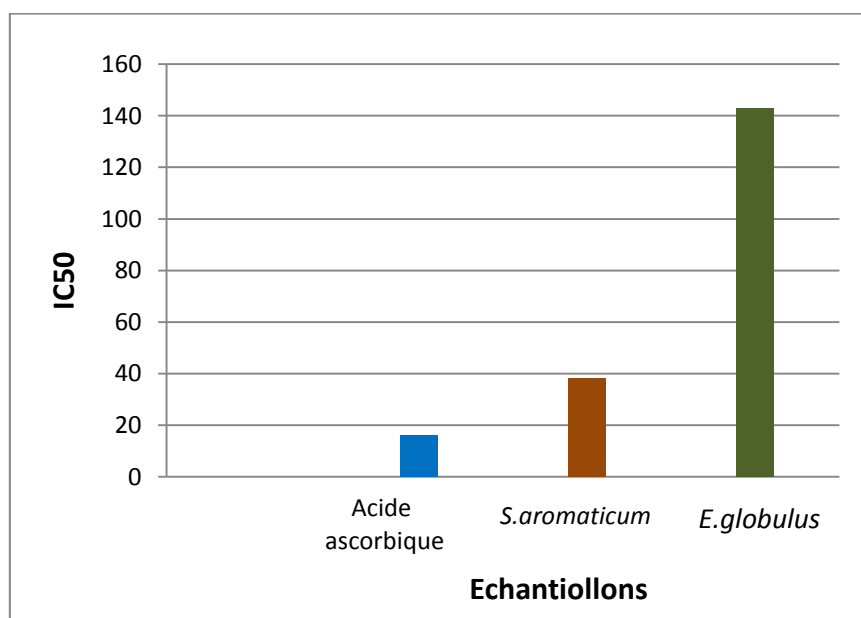
II-3-2. Calcul des IC50

Les valeurs des IC50 déterminées graphiquement en mg/ml sont regroupées dans le **tableau XII** et illustrées par la **figure 26**. L'activité antioxydante est inversement proportionnelle à l'IC50, c'est-à-dire plus la valeur d'IC50 est faible, plus l'activité antioxydante est importante.

Tableau XII: Valeurs des IC50 d'acide ascorbique et des HEs de *S.aromaticum* et *E.globulus*.

Echantillons	IC50 (mg/ml)
Acide ascorbique	15,98
<i>Syzygiumaromaticum</i>	38,10
<i>Eucalyptus globulus</i>	142,86

En comparant l'IC50 des deux plantes testées à celle obtenue avec l'acide ascorbique, nous constatons que l'activité antioxydante de l'HEc (IC50 = 38,10mg/ml) est proche de la capacité du piégeage du radical DPPH de l'acide ascorbique (IC50 = 15,98mg/ml). Par ailleurs, l'activité antioxydante de l'HEe (IC50 = 142,87mg/ml) à une faible capacité de piégeage du radical DPPH huit fois moins.

**Figure 26:** Valeurs des IC50 des HEs en mg/ml.

HE de *S.aromaticum* est dotée d'une activité antioxydante importante, avec une IC50 de 38,10mg/ml; cette valeur est supérieure à celle trouvée par Adli (2015) qui est de (25.60ug/ml), Dieynaba (2017) (0.024ug/ml) et aussi Medfouni et Hafsi (2018) (6.15ug/ml).

D'après Kermiche, (2014) l'HE d'*Eucalyptus globulus* a une activité antioxydante d'IC50=470µg/ml qui est inférieure comparativement à celle obtenues dans ce travail.

Une autre étude de Guddah et Soualat (2019) montre que l'extrait aqueux possède un effet anti radicalaire (d'IC50=18,9 µg/ml).

Les variations de la valeur d'IC50 peuvent être attribuées à plusieurs raisons, notamment à la composition chimique de la plante (polyphénols et flavonoïdes) qui est

tributaire des facteurs génétiques et environnementaux (Abou Elella *et al.*, 2014). De même, le pouvoir antioxydant de ces fractions est dû à la richesse en composés phénoliques ou les groupements hydroxyles peuvent servir comme donneurs d'électrons.

Ce sont surtout les phénols et les polyphénols qui sont responsables de ce pouvoir (Richard et Peyron, 1992).

L'IC50 de HE d'*E.globulus* à démontre une activité antioxydante faible qui serait probablement due à la variation de la nature et du pourcentage des composés phénoliques dans l'extrait des feuilles.

Des études ont prouvé que la présence des groupements hydroxyles libres dans la structure des composés phénoliques permet le transfert d'un proton vers le radical DPPH. D'un autre côté, nous notons qu'il y a une corrélation entre la concentration du polyphénols et l'activité anti oxydantes, ce qui confirme que ces polyphénols sont des antioxydants puissants capable d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer l'oxydation des macromolécules (Termel *et al.*, 2016).

Une étude de Bey- ouled- Si Said *et al.* (2016) réalisé en Algérie a révélé que le pouvoir anti radicalaire est de 69,47% en raison de la richesse des feuilles d'*E globulus* en polyphénols.

Une autre étude coréenne a déterminé un pourcentage anti radicalaire de 76.2%. Ce dernier est dû probablement à la présence de 48.2% d'Eucalyptol (1,8cinéole) (Nile *et al.*, 2018).

Qasim rahman *et al.* (2017) ont étudié l'activité antioxydante par le test de DPPH et les résultats ont montré qu'une teneur de 223.83 mg/L des tanins de nature phénoliques présentent dans l'extrait de feuilles d'*E globulus* piègent à 97,63% le radical libre.

II-4. Histologie des boutons floraux de *S.aromaticum* et des feuilles et d'*E.globulus***II-4-1. Structure de girofle**

La partie utilisée est le bouton floral (**Fig 27**).

Le clou de girofle comporte une partie quadrangulaire de 10 à 12mm de long et de 2 à 3mm de large, correspond à l'hypanthium et une tête globuleuse limitée par 4 sépales divergents entourant les 4 pétales imbriqués qui cachent les nombreuses étamines encore recourbées, de couleur brun cannelle. Les fleurs blanches sont disposées à l'extrémité des rameaux en petites cymes compactes. Chaque fleur comporte 4 sépales épais rougissant à maturité et 4 pétales blanc-rosé caducs lors de l'épanouissement des nombreuses étamines.

Les fruits nommés "antofles" sont des baies vert olive avec une chair pourpre, ne contenant souvent qu'une seule graine.

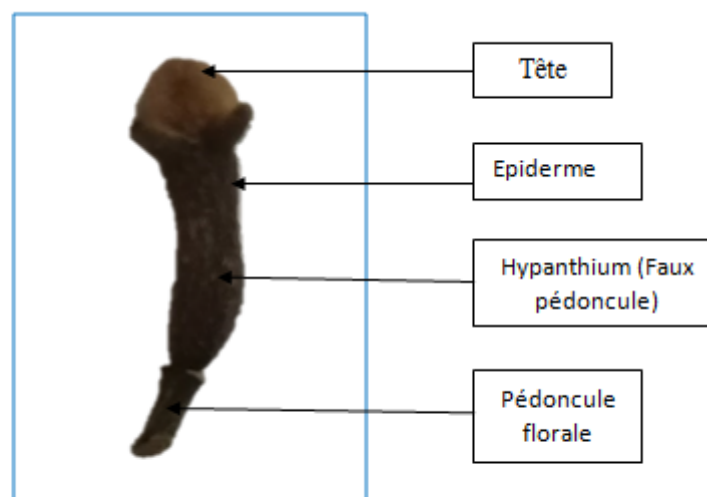


Figure 27: Bouton floral de *S.aromaticum* séché.

La coupe transversale réalisée au niveau du bouton floral montre un système libéro-ligneux périphérique et un cordon libéro-ligneux central. Les poches sécrétrices d'huile essentielle sont localisées à la périphérie (**Fig 28 et 29**).

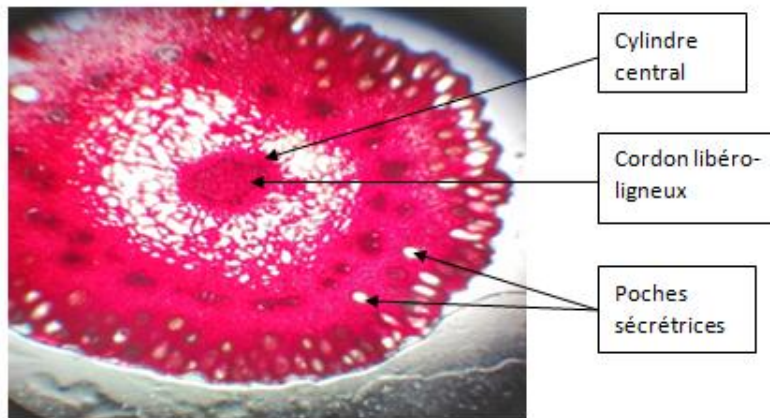


Figure 28: Coupe transversale d'un bouton florale de *Syzygium aromaticum* observée au microscope photonique (Gr: 10x10).

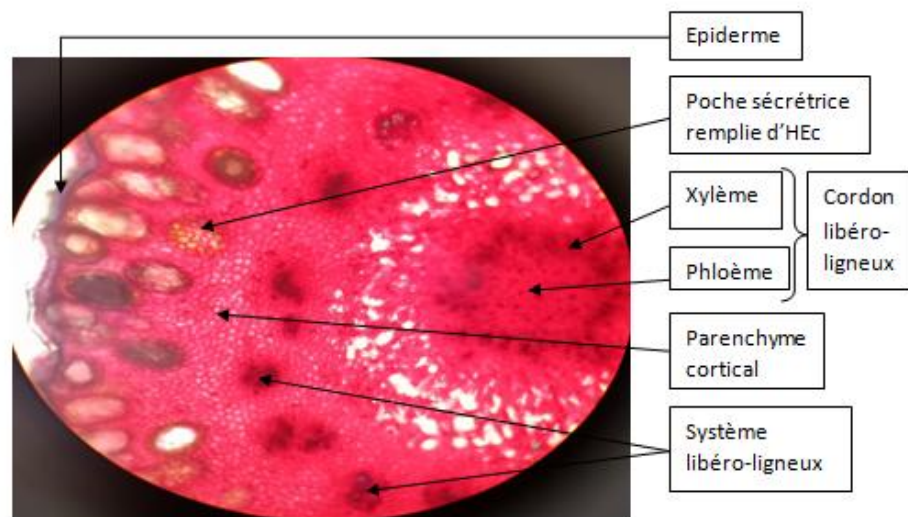


Figure 29: Coupe transversale d'un bouton florale de *Syzygium aromaticum* observée au microscope photonique (Gr: 40x10).

II-4-2. Structure de la feuille d'*Eucalyptus globulus*

L'observation microscopique des coupes transversales a permis de distinguer au niveau du limbe, l'épiderme, le mésophile, le système vasculaire et les glandes sécrétrices (**Fig 30 et 31**).

- L'épiderme est une assise à rôle protecteur à paroi pectocellulosique sur les faces latérales et internes. Sur les faces adaxiales et abaxiales se distingue la cuticule imprégnant l'épiderme pourber de stomates.
- La mésophile est formé d'un parenchyme palissadique chlorophyllien à cellules allongées à paroi pectocellulosique.
- Le parenchyme lacuneux juxtapose le parenchyme palissadique, formé de cellules plus au moins arrondies.

Au centre de l'organe (la feuille), la nervure principale est essentiellement formée d'un faisceau cribro-vasculaire dont le xylème est orienté vers la face ventrale du limbe et le phloème vers la face dorsale. Le xylème est un complexe tissulaire formé de cellules parenchymateuses (parfois de fibres) assurant la conduction de la sève brute.

Le phloème est conducteur de sève élaborée. Il est hétérogène et formé d'éléments conducteurs associées à des cellules parenchymateuses et des fibres.

Dans le phloème s'observent des canaux sécréteurs minant des cavités entourées de cellules sécrétrices d'huile essentielle.

Le faisceau libéro-ligneux est entouré de sclérenchyme. La coupe transversale montre un canal sécréteur protégé par un amas de cellules sclérenchymateuses. Le canal sphérique est entouré d'une rangée de cellules sécrétrice.

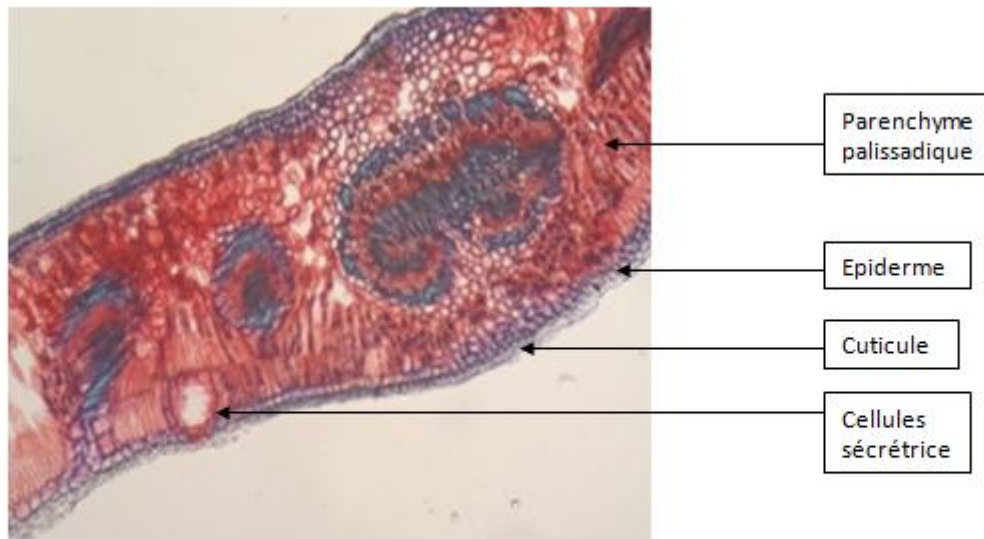


Figure 30: Coupe transversale d'une feuille d'*Eucalyptus globulus* observée au microscope optique (Gr: 10×10).

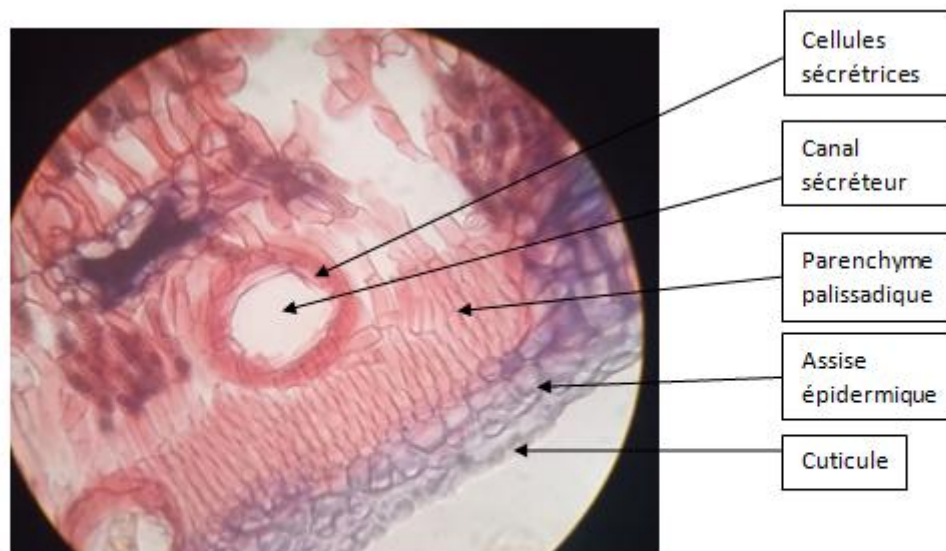


Figure 31: Coupe transversale d'une feuille d'*Eucalyptus globulus* observée au microscope optique (Gr: 40×10).

II-4-3. Structure de la tige d'eucalyptus

La tige est formée d'un épiderme, d'une zone corticale (écorce) et le cylindre central parsemé de canaux sécréteurs et au centre la moelle.

L'épiderme est une assise protectrice formée de cellules à paroi pécto-cellulosique sur les faces latérales et internes et sur la face externe apparait un dépôt de cutine.

La zone corticale est parenchymateuse sous l'épiderme apparait un collenchyme et un anneau de sclérenchyme dans la partie profonde de la zone corticale.

Le cylindre central est formé de tissus conducteurs. Dans chaque faisceau s'observent vers l'intérieur de la tige, les vaisseaux ligneux du xylème et vers l'extérieur, les tubes cribles du phloème. La moelle parenchymateuse occupe le centre de la tige.

Les canaux sécréteurs nombreux et de faible diamètre sont moelleux et se localisent au niveau des pôles phloémiens de la plupart des faisceaux cribro-vasculaire (**Fig 32 et 33**).

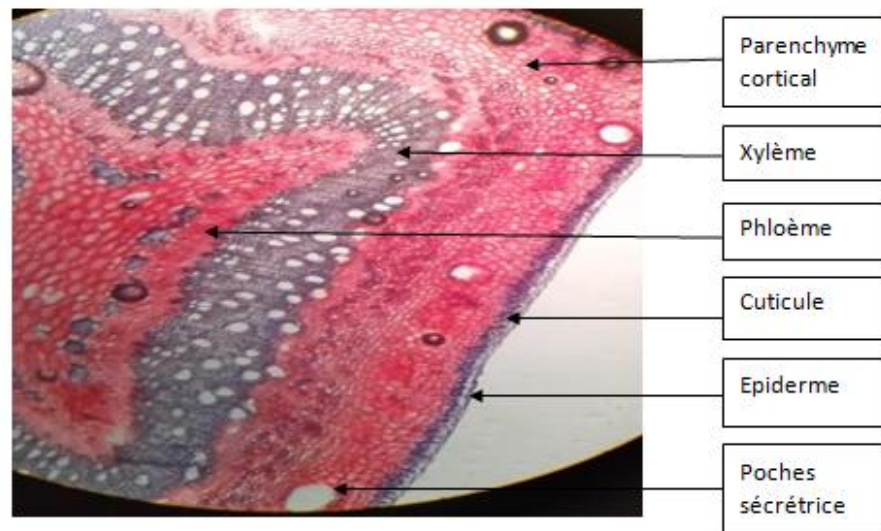


Figure 32: Coupe transversale d'une tige d'*Eucalyptus globulus* observée au microscope photonique (Gr : 10x10).

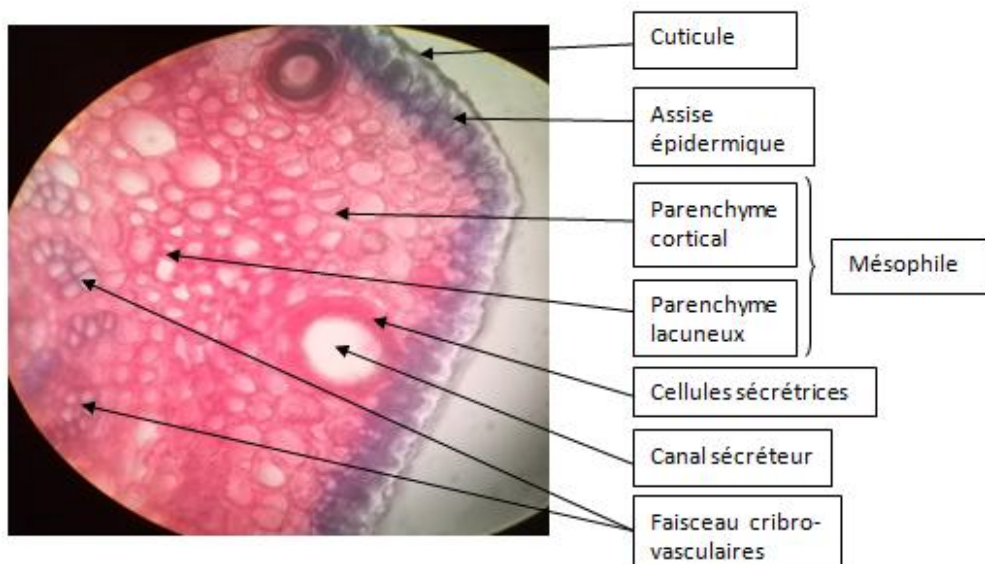


Figure 33: Coupe transversale d'une tige d'*Eucalyptus globulus* observée au microscope photonique (Gr : 40x10).



Conclusion

Conclusion et perspectives

Au terme de notre étude d'extraction des huiles essentielles et la détermination des rendements de *S.aromaticum* et d'*E.globulus* ont permis l'obtention d'un bon rendement d'HE par *Syzygium aromaticum* comparé à l'*Eucalyptus globulus*.

L'activité antibactérienne *in vitro* des huiles essentielles des deux plantes étudiées sur les deux souches bactériennes testées à savoir *Escherichia-coli* et *Staphylococcus aureus* qui ont été très sensible à l'HE de *S.aromaticum* et sensible à l'HE d'*E.globulus*.

Le pouvoir antioxydant par la méthode de DPPH à piéger les radicaux libres a confirmé les propriétés antioxydantes puissante pour l'HE_C et moindre pour l'HE_e avec des IC50 estimé à 38,10; 142,87mg/ml pour les HE_C et l'HE_e respectivement.

Les coupes anatomiques du bouton floral du clou de girofle, des feuilles et de la tige d'*Eucalyptus* ont montré l'existence de nombreuses cellules sécrétrices chez *S.aromaticum* et de poches sécrétrices chez *E.globulus*.

Les plantes médicinales resteront toujours une source fiable de principes actifs d'intérêt thérapeutique. Face à la phobie des molécules de synthèse chimique, leur utilisation est en progression constante.

Les plantes médicinales malgré leurs effets thérapeutiques doivent être utilisées avec la plus grande prudence car elles peuvent être toxiques.

En perspective, il serait fort intéressant de compléter cette étude *in vitro* en utilisant des doses plus élevées en HE.



Références bibliographiques

Abadlia M et Chebbour A.H. (2014). Contribution à l'étude des huiles essentielles de la plante *menthapiperita* et tester leurs effets sur un modèle biologique des infusoires. Master en biologie végétal, spécialité: métabolisme secondaire. Université Constantine 1, Algérie. 80p.

Abou-Elella F.M and Farouk Mohammed Ali R. (2014). Antioxidant and anticancer activities of different constituents extracted from Egyptian pricklypear cactus (*Opuntia ficusindica*) peel. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 3(2): 1-9

Adli D.E.H. (2015). Effet prophylactique de l'administration d'un extrait de *Syzygium aromaticum* (clou de girofle) chez les rats wistar en croissance intoxiquée au plomb et au manganèse. Etude biochimique, histologique et neurocomportementale. Thèse de doctorat en biologie, option biochimie. Université d'Oran 1 Ahmed ben Bella. 165p.

Aït Youssef M. (2006). *Eucalyptus globulus* L. In «Plante Médicinale de Kabylie», Ed.: Paris, France. 126-130.

Amhis W., Benslimane A., Tiouit D. et Naim M. (2001). Tests de sensibilité utiles au traitement antibiotique. *Médecine du Maghreb* n°91. 1-25.

Atmani H. et Baira K. (2015). Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique et l'étude des caractères Physico-chimique de l'huile essentielle du clou de girofle *Syzygium aromaticum* L. Master en Sciences Biologiques, option : Métabolisme secondaire et Molécules bioactive. Université Frères Mentouri 1 Constantine, Algérie. 80p.

Aouadhi S. (2010). Atlas de risques de la phytothérapie traditionnelle à l'étude de 57 plantes recommandées par les herboristes. Master en toxicologie. Tunis. 191p.

Anton R., Bernard M. et Wichtl M. (2003). Plantes thérapeutiques: tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Paris: Cachan, France : Editions Tech & Doc; Editions médicales internationales. 692p.

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

Références Bibliographiques

Atta A.H. et Alkofahi A.S. (1998). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 60(2): 117-24.

Baba Aïssa F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles: flore d'Algérie et du Maghreb. Plus de 800 plantes de la flore d'Algérie et du Maghreb, ainsi que des substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed.: Librairie Moderne-Rouiba, EDAS, Alger, Algérie. 368p.

Bachelot C., Blaise A., Corbel T. et Le Guernic A. (2006). Les huiles essentielles: extraction et comparaison. U.C.O Bretagne Nord. 1-18.

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

Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. et Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446-475.

Baudoux D. (2002). L'Aromatherapie. Se soigner par les huiles essentielles (Amyris, Bruxelles ed.), 231 p

Balmey M. et Wilson G. (2000). Les guides du naturaliste .Toutes les fleurs de Méditerranée: les fleurs, les graminées, les arbres et arbustes. Editeur : Delachaux et Niestlé. Lausanne, Paris. 151-152. 560 p.

Banouh R. et Azzouz A. (2019). Evaluation de l'activité antibactérienne, antifongique et activité antioxydante de l'huile essentielle de clou de girofle (*Syzygium aromaticum*). Master en Sciences Biologiques, Spécialité: Biochimie Appliquée. Université Akli Mohand OULHADJ-Bouira. 78p.

Barbelet S. (2015). Le giroflier : historique, description et utilisations de la plante et de son huile essentielle. Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie. Université de LORRAINE, France. 120 p.

Batish D.R., Pal Singh H., Kohli R.K. et Kaur S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*, 256(12): 2166-2174

Belaiche P. (1979). L'aromatogramme. Traité de phytothérapie et d'aromathérapie. Tome I. Maloine S.A. Editeur. Paris, France. 204p.

Benazzeddine S.-A. (2010). Effet insecticide de cinq huiles essentielles vis- à - vis de *Sitophilusoryzae* (Coleoptera; Curculionidae) et *Tribolium confusum* (Coleoptera; Curculionidae). Ingénieur d'État en Sciences Agronomiques, spécialité : Protection des végétaux zoophytiatrie, option : Phytopharmacie. Ecole Nationale Supérieure Agronomique El-Harrach d'Alger, Algérie. 51p.

Benjlali B., Tantaoui E.A. et Esmaili-Alaoui M. (1986). Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, tome XX(2): 155-167.

Bey Ould Si Said Z. (2014). Activités biologiques des huiles essentielles des feuilles et du fruit d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Magister en Biologie, option : Alimentation et Technologie Alimentaire. Université Abderrahmane Mira – Bejaïa. 105p.

Bey-Ould Si Said Z., Haddadi-Guemghar H., Boulekbache-Makhlouf L., Rigou P., Remini H., Adjaoud A., Khoudja N.K. et Madani K.(2016). Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistillated extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*, 89 : 167–175.

Bingendako M.J. (2004). Identification et Zonage des *Eucalyptus Globulus* au Rwanda, Consultant pour Chemonics International Inc., sous le projet ADA. 31p.

Blois M.S. (1958).Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical.Nature, 4617 (181): 1119-1200.

Bonnet R. (2004). Growing group of extended-spectrum-beta-lactamases : the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 : 1-14.

Bois D. (1999). Les plantes alimentaires chez tous les peuples et à travers les âges : histoire utilisation, culture. Volume III : plantes à épices, à aromates, à condiments. Editeur : Cme Et La Snhf, Paris, France. 1-11.

Références Bibliographiques

Bouaine A. (2017). Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles extraites des deux plantes aromatiques et médicinales: Lentisque et Myrte. Master en Sciences et Techniques : Chimie des Molécules Bio Actives. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès. 44 p.

Boudjehem W.H. (2019). Etude de l'activité antimicrobienne de quelques huiles essentielles pour le contrôle des agents phytopathogènes. Master en Sciences Agronomiques, spécialité : Phytopharmacie et protection des végétaux. Université 8 mai 1945-Guelma, Algérie. 84p.

Boudy P.L.J. (1952). Guide du forestier en Afrique du Nord. Edit La Maison rustique, Paris, France. 1 vol. (XI-505 p).

Bouhdid S., Abrini J., Baudoux D., Manresa A. et Zhiri A. (2012). Les huiles essentielles de l'origan compact et de la cannelle de Ceylan: pouvoir antibactérien et mécanisme d'action. Journal de Pharmacie Clinique, 31(3): 141-148.

Boukhalfoun L. (2012). Extraction des composés actifs chez *Eucalyptus globulus*. Magister en biologie, spécialité: Biotechnologie végétale. Université Saad DAHLEB-Blida. 86 p.

Boukhatem M.N., Ferhat M.A., Kameli A. et Mekarnia M. (2017). *Eucalyptus globulus* (Labill.): un arbre à essence aux mille vertus. Phytothérapie, 2: 203-214.

Burt S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International journal of foodmicrobiology, 94(3): 223-253.

Brunneton J. (1993). Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} Edition : Technique et documentaire, Lavoisier, Paris France. 484, 489, 548, 555,634 p.

Bruneton J. (1997). Elément de phytochimie et de pharmacologie. Ed lavoisier, Tech. Et Doc., Paris, France. 405-426.

Bruneton J. (1999). Pharmacognosie - Phytochimie - plantes médicinales. Techniques et Documentations. Lavoisier, 3^{ème} édition, Paris, France. 1120.

Cardoso J. C., Oliveira M. E. B., and Cardoso F.C. (2019). Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. *Horticultura Brasileira*. 37(2): 124–132

Cavalli J. F. (2002). Caractérisation par C.P.G. /K., C.P.G. /S.M. et R.M.N. du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat, Université de Corse, Pascal Paoli, France, 261 p.

Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M. et Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Lebensmittel-Wissenschaft und - Technologie. Food science and technology*, 39(7): 756-761.

Constantin E. (1996). Spectrométrie de masse. Lavoisier Tec & Doc, Paris, France. 1-14.

Croteau R. (1977). Site of monoterpenes biosynthesis in *Marjorana hortensis* leaves. *Plant Physiology*, 59(3): 519-520.

Croteau R. et Hooper C.L. (1978). Metabolism of monoterpenes: Acetylation of menthol by a soluble enzyme preparation from peppermint (*Menthapiperita*) leaves. *Plant Physiology*, 61(5): 737-742.

Danthu P., Penot E., Ranoarison K.M., Rakotondravelo J.C., Michel I., Tiollier M., Michels T., Normand F., Razafimamonjison G., Fanja Fawbush F. et Jahiel M. (2014). The clove tree of Madagascar: a success story with an unpredictable future. *Bois et Forêts des Tropiques*, Montpellier : CIRAD, France. 320 (2): 83-96.

Daroui-Mokaddem H. (2012). Etude phytochimique et biologique des espèces *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Smyrniolumolusatrum* (Apiaceae), *Asteriscus maritimus* et *Chrysanthemum trifurcatum* (Asterarceae). Thèse de Doctorat en Biochimie, option : Biochimie Appliquée. Université BADJI Mokhtar-Annaba .198p.

Da Silva Pinto M., Maria Lajolo F. et Genovese M.I. (2008). Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Food Chemistry*, 107(4): 1629–1635.

Références Bibliographiques

Derwich E., Benziane Z. et Boukir A. (2010). Chemical Composition and In Vitro Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Cedrus atlantica*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 12(3): 381- 385.

De Vincenzi M., Silano M., De Vincenzi A., Maialetti F. et Scazzocchio B. (2002). Constituents of aromatic plants: eucalyptol. *Fitoterapia*, 73(3): 269-275.

Djelloul R., Mokrani K. et Hacini N. (2017). Study of the Antibacterial Activity of the Extract from the Essential Oil of *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* on Three Bacterial Strains. *International Journal of Applied Environmental Sciences*, 12(1): 47-56.

Djerroumi A. et Nacef M. (2004). 100 plantes médicinales d'Algérie. In : Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Saugé) et la mise en évidence de leurs activités biologiques. Ed.: Palais du livre. 131-115.

El Abed D. et Kambouche N. (2003). Les huiles essentielles gagnent du terrain à l'officine. *Actualités pharmaceutiques*.

Eloff J. (1998). A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica*, 64(8): 711–713.

Erau E. (2019). L'Eucalyptus : botanique, composition chimique, utilisation thérapeutique et conseil à l'Officine. Thèse de doctorat en pharmacie. Université d'Aix-Marseille, France. 40-77.

Fauchère J.L. et Avril J.L. (2002). Bactériologie générale et médicale. In : détermination "in vitro " du pouvoir antibactérien des huiles essentielles d'eucalyptus, myrte, clous de girofle et sarriette, et leur application à la conservation de la viande fraîche type hachée. Ellipses Ed.Paris, France.141-325.

Foggie W.E. (1911) Eucalyptus Oil Poisoning. *British Medical Journal*, 1(2616): 359-360.

Fouché J.G., Marquet A. et Hambuckers A. (2000). Les plantes médicinales, de la plante aux médicaments. Observatoire du monde des plantes, Sart-Tilman, Liège, Belgique. 1-18

Références Bibliographiques

Garneau F.X. (2005). Le matériel végétal et les huiles essentielles Huiles essentielles: de la plante à la commercialisation. Manuel pratique : Ed. Corporation la sève. Université de Chicoutimi, Québec.

Garnero M.J. (1977). Problèmes rencontrés au cours de l'étude de la composition chimique des huiles essentielles. In Parfumes cosmétiques aromes.14: 31-40.

Georgetti S. R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzolini A. E. et Fonseca M. J. (2003). Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. American Association of Pharmaceutical Scientists, issuing body, 5(2): 111-115. Article 20.

Ghenaiet I. et Etaouid et S. (2016). Etude de l'impact des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* Sur *Rhyzopertha dominica* : Aspect toxicologique et biomarqueur. Master en Biologie Appliquée, option : Toxicologie Xénobiotiques et Risques Toxicologiques. Université De Larbi TEBESSI, Tébessa, Algérie. 46 p.

Ghedira K., Goetz P. et Le Jeune R. (2008). *Eucalyptus globulus* Labill. Phytothérapie, 6(3): 197-200.

Ghedira K., Goetz P. et Le Jeune R. (2010). *Syzygium aromaticum* (L.)Merr.& Perry (Myrtaceae) Giroflier. Phytothérapie, 8(1): 37-43.

Goetz P. (2007). Phytothérapie du diabète. Phytothérapie, 5(4): 212-217.

GoetzP. et Jeune R. (2008). *Eucalyptus Globulus* Labill. Phytothérapie, 6: 197-20.

Haddouche N. et Dernani H. (2018). Etude de l'activité antibactérienne et hémolytique de l'huile essentielle de *syzygium aromaticum* (clou de girofle). MASTER en Sciences Biologiques, Spécialité : Physiologie cellulaire et physiopathologie. Université Akli Mohand OULHADJ-Bouira. 95p.

Hajji S. (1985). Comparative study of an essential oil obtained by two different methods of extracting: hydrodistillation and hydrodiffusion. In 1. Colloque International sur les Plantes

Aromatiques et Médicinales du Maroc, [Morocco]. Centre Nat. de Coordination et de Planification de la Recherche Scientifique et Technique. 229-230.

Hariram Nile S. et Keum Y.S. (2018). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities of *Eucalyptus globulus* Labill. Indian Journal of Experimental Biology, 56: 734-742.

Hassani A., Sehari N., Sehari M., Bouchenafa N.1., Labdelli F. et Kouadrie M. (2017). Etude des propriétés insecticides et bactéricides de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. dans la lutte contre les ravageurs des semences et denrées stockées. Revue Écologie-Environnement, (13) : 5-11.

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*). Magister en Biologie, option : Biochimie Appliquée et Biotechnologies. Université Mouloud MAMMERRI-Tizi-Ouzou. 120p.

Hemwimon S., Pavasant P. et Shotiprux A. (2007). Microwave assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda Citrifolia*. Separation and Purification Technology, 54(1): 44-50.

Kapadiya S. et Desai M.A. (2017). Isolation of essential oil from buds of *Syzygium aromaticum* using hydrodistillation: multi-response optimization and predictive modeling. International Journal of Advance Research in Science and Engineering, 6: 405- 418.

Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J. et Zinkernagel R.M. (2005). Bacteria as human pathogens Medical microbiology, Georg Thieme Verlag, New York, NY.282-296.

Kermiche N. et Chougui M. (2014). Les activités antifongiques et antioxydantes des huiles essentielles d'*Artemisia herba alba* et *Eucalyptus globulus*. Master en Biologie et Physiologie Végétale, option: métabolisme secondaire des plantes. Université de Constantine 1. 74p.

Koroch A., Ranarivelo L., Behra O., Juliani H.R. et Simon J.E. (2007). Quality Attributes of Ginger and Cinnamon Essential Oils from Madagascar. In: Janick J. and Whipkey A. (eds)

Issues in new crops and new uses. Botanicals and Medicinals. American Society of Horticultural Science (ASHS) Press, Alexandria, Virginia.338-341.

Koziol N. (2015). Huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus*, d'*Eucalyptus radiata* et de *Corymbia citriodora*: qualité, efficacité et toxicité. Thèse de Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Université de Lorraine, France.107p.

Laib I. (2012). Etude des activités antioxydante et antifongique de l'huile essentielle des fleurs sèches de *Lavandula officinalis* : Application aux moisissures des légumes secs. Nature & Technologie. 52p.

Lim T.K. (2014). *Syzygium aromaticum* Edible Medicinal and Non Medicinal Plants. Volume 8, Flowers. Springer.460- 482.

Longevialle P. (1981). Spectrométrie de masse des substances organiques, Masson (Edit.) Paris, France. 3-14 et 83-98. 13.

Louni M. (2013). Extraction, caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'huile essentielle de clou de girofle. Master en Chimie, Option : Chimie Pharmaceutique. Université Mouloud MAMMERRI-Tizi-Ouzou. 65p.

Maataoui B.S., Hmyene A. et Hilali S. (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits du figuier de barbarie *Opuntia ficus indica*. Lebanese Science Journal, 7(1): 3-8.

Mahmout Y. (1992). Contribution à l'étude de quelques aromates et condiments utilisés au Tchad. Thèse de Doctorat, spécialité: Chimie organique, minérale, analytique et industrielle. Université des Sciences et Techniques de Languedoc, Montpellier II, France. 140p.

Maisuthisakul P., Suttajit M. et Pongsawatmanit R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. Food Chemistry, 100(4): 1409-1418.

Medfouni R. et Hafsi N. (2018). Contribution à l'étude phytochimique et les activités biologiques d'une plante médicinale *Syzygium aromaticum*. Master en Sciences Biologiques, option : Biochimie Appliquée. Université Larbi BEN MHIDI, Oum El Bouaghi, Algérie. 35p.

Menager H. (1952). Les Eucalyptus dans le Gharb (Marc occidental). Journal d'Agriculture Traditionnelle et de Botanique Appliquée. 321-322.

Meyer-warnod B. (1984). Natural essential oils: extraction processes and applications to some major oils. Perfumer & Flavorist, 9(2): 93-104.

Minelle J. (1959). L'Agriculture à Madagascar. Librairie Marcel Rivière et Cie (eds.), Paris France.380p.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenyl picryldrazyl (DPPH.) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Sciences and Technologies (SJST), 26 (2):211-219.

Morin J., Malhuret R. et Bastide P. (1983). Utilisation des huiles essentielles en thérapeutique. Phytoterapie, 7: 9-24.

Moroh J.L.A., Bahi C., Dje K., Loukou Y.G. et Guede Guina F. (2008). Study of the antibacterial activity of Morindamorindoides (Baker) milne-redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège, Belgique. 77: 44 – 61.

Obame Engonga L.C., Koudou J., Chalchat J.-C., Bassolé I., Edou P., Ouattara S.A. et Traore A. (2007). Volatile components, antioxidant and antibacterial activities of *Dacryodesbuettneri* H. J. Lam. essential oil from Gabon. Scientific Research and Essay, 2 (11): 491-495.

Oussou K.R., Coffi K., Guessend N., Yolou S., Mireille Dosso M., N'Guessan Y. T., Figueredo G., Chalchat J.-C. et Koukoua G. (2004). Activités antibactériennes des huiles essentielles de trois plantes aromatiques de Côte-d'Ivoire. Comptes- Rendus Chimie, 7(10-11) : 1081–1086.

Oussou K.R., Yolou S., Boti J.B., Guessend K.N., Kanko C., Ahibo C. et Casanovad J. (2008). Etude chimique et activité anti-diarrhéique des huiles essentielles de deux plantes aromatiques de la pharmacopée ivoirienne. European Journal of Scientific Research, Euro Journals, 24(1) : 94-103.

Références Bibliographiques

Paris R.R. et Moysé H. (1967). Matière médicale - Tome II. Pharmacognosie spéciale spermaphytes (suite): angiospermes monocotylédones - dicotylédones - apétales et dialypétales. / collection de précis de pharmacie Masson et Cie. 511 p.

Penot E., Ranoarison K.M., Rakotondravelo J., Isabelle M., Michels T., Normand F., Razafimamonjison G., Fawbush F. et Jahiel M. (2014). Le giroflier à Madagascar : une «success story »... à l'avenir incertain. Bois et forêts des tropiques, 1-35.

Pinto E., Vale-Silva L., Cavaleiro C. et Salgueiro L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. Journal of Medical Microbiology, 58(11): 1454–1462.

Piochon M. (2008). Étude des huiles essentielles d'espèces végétales de la flore laurentienne: composition chimique, activités pharmacologiques et héli-synthèse. Thèse de l'UQAC (Mémoire de maîtrise) en Maîtrise en ressources renouvelables. Université du Québec, Canada. 200p.

Poletti A. (1982). Plantes médicinales. In Fleurs et plantes médicinales. Volume 3. Tome 2. Delachaux et Niestlé (**Edit.**). 622 p.

Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C. et Roura S.I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie, Food Science and Technology, 36(7): 679–684.

Pradeau D. et Cohen Y. (1992). L'Analyse pratique du médicament. Cachan : Editions médicales internationales. 1 vol. 1067 p.

Prakash A. (2001). Antioxidant activity. Medallion Laboratories Analytical Progress, 19(2): 2.

Rabiai M. (2014). Étude physicochimique et évaluation de l'activité biologique d'une huile essentielle et l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus* de la région M'SILA. Master en Chimie organique et produits naturels. Université DE M'SILA, Algérie. 62p.

Références Bibliographiques

Randrianarivelo R. (2010). Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante endémique de Madagascar *Cinnamosmafragrans*, Alternative aux antibiotiques en crevetticulture. Thèse de doctorat en ès Sciences, option Biochimie (Biotrchnologie-Microbiologie). Université d'Antananarivo, Madagascar. 170p.

Ranoarisoa K.M. (2012). Evolution historique et Etat des lieux de la filière girofle à Madagascar. Ingénieur Agronome, option Agriculture. Université d'Antananarivo, Madagascar. 110p.

Richard H. (1974). Quelques épices et aromates et leurs huiles essentielles Publisher: MASSY : Centre de Documentation des Industries Utilisatrices de Produits Agricoles ; CDIUPA, au CERDIA, Paris,France. No. 2.162 p.

Richard H. et Loo A. (1992). Nature, origine et propriétés des épices et aromates bruts. In Richard H (Coordonnateur) Epice et Aromates. Technique Et Documentation, Lavoisier, Paris, France. 339 p.

Roux D. 2008 : Conseil en aromathérapie. 2ème édition, Pro-Officina. 187 p.

Saad Abed Karkosh A. (2012). Study of in vitro antibacterial activity of the essential oils of Cloves (*Syzygium aromaticum*) and the effect of temperature on antibacterial activity. Euphrates Journal of Agriculture Science, 4(1): 15-19.

Sallé J.L. (1991). Les huiles essentielles, synthèse d'arômes et introduction à la sympathicothérapie. Ed. Frison-Roche, Paris, France. 9-45.

Sharififar F., Moshafi M. H., Mansouri S. H., Khodashenas M. et Khoshnoodi M. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zatariamultiflora* Boiss. Food Control, 18(7):800-805.

Skoog D.A., Holler F.J. et Nieman T.A. (2003). Principes d'analyse instrumentale. Edition De Boeck Supérieur, (1^{ère} édition). 956 p.

Références Bibliographiques

Slimani S. (2010). Activité antioxydante et antibactérienne des extraits phénoliques d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Magister en Sciences Alimentaires, option : Contrôle de Qualité des Aliments, Certification et Méthodes de Validation. Université Abderrahmane Mira- Bejaïa. 148p.

Tranchant J. et Arpino P. (1995). Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson (4^{ème} Edit.), Paris, France. 700 p.

Valnet J. (1984). Aromathérapie: traitement des maladies par les essences des plantes. Maloine S.A. 10e éd., Paris, France. 544 p.

Vieira M., Bessa L.J., Martins M.R., Arantes S., Teixeira A.P.S., Mendes Â., da Costa P.M et Belo A.D.F. (2017). Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* LABILL. And Seven Mediterranean Aromatic Plants. Chemistry & Biodiversity. 14(6): 1-12.

Wichtl M. et Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques- Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Tec et Doc - Lavoisier, Editions médicales internationales - Lavoisier (EM Inter), 2^{ème} édition Paris, France. 119- 121.

Willem J.P. (2004). Les huiles essentielles, médecine d'avenir. Ed : Estem, Paris, France. 318p.

Yi Z., Yu Y., Liang Y. et Zeng B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. LWT, 41: 597-603.



Annexes

Annexe 01:**Composition des solutions et milieux de culture utilisés****• Eau physiologique stérile**

Composition en g/l :

Chlorure de sodium (NaCl) 9g

Eau distillée 1000ml

pH=7

Stérilisation à 121°C/15min.

• Gélose Mueller Hinton (MH)

Composition en g/l

Extrait de

viande.....3g

Hydrolysat acide de caséine17,5g

Agar.....18g

pH=7,4

Stérilisation à 120°C/15 min

• Gélose nutritive (GN)

Composition en g/l

Peptone10g

Extrait de

viande.....3g

Extrait de levure3g

Chlorure de sodium5g

Agar.....18g

pH=7,2±0,2

Stérilisation à 120°C/15 min.

Annexe 02:

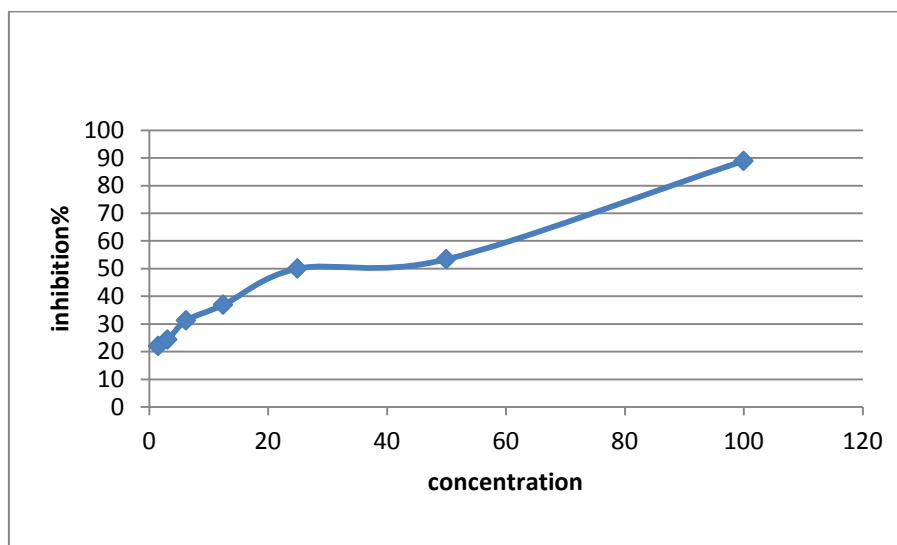


Figure 24: Cinétique de l'activité de réduction du DPPH par l'HE de *Syzygium aromaticum*.

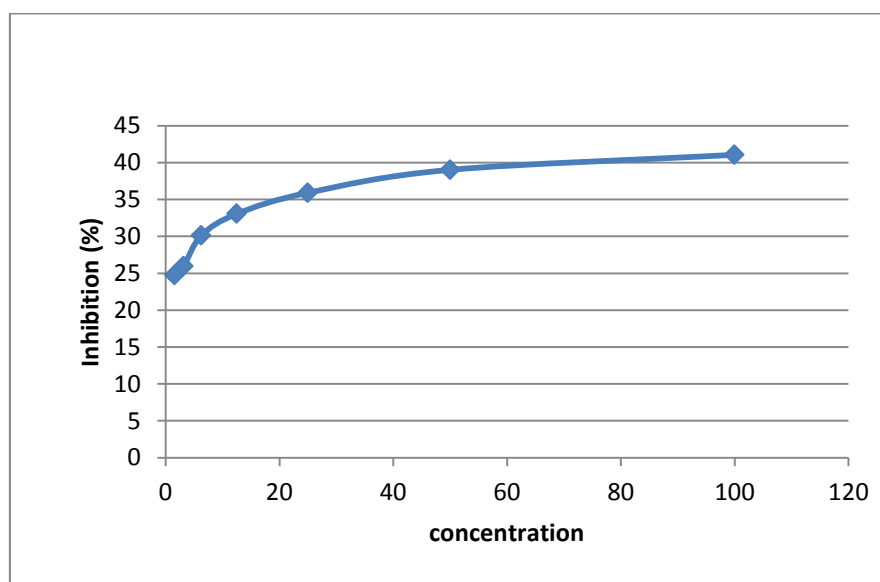


Figure 25: Cinétique de l'activité de réduction du DPPH par l'HE d'*Eucalyptus globulus*.

Annexe 03:*E.coli***Tableau VIII:** Analyse de la variance à deux facteurs.**ANALYSE DE VARIANCE**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1042,967	29	35,964				
VAR.FACTEUR 1	168,033	1	168,033	168,033	0		
VAR.FACTEUR 2	796,133	4	199,033	199,033	0		
VAR.INTER F1*2	58,8	4	14,7	14,7	0,00001		
VAR.RESIDUELLE 1	20	20	1			1	9,97%

Annexe 04:*S.aureus***Tableau IX:** Analyse de la variance à deux facteurs.**ANALYSE DE VARIANCE**

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
VAR.TOTALE	1010,8	29	34,855				
VAR.FACTEUR 1	97,2	1	97,2	44,182	0		
VAR.FACTEUR 2	832,8	4	208,2	94,636	0		
VAR.INTER F1*2	36,8	4	9,2	4,182	0,01277		
VAR.RESIDUELLE 1	44	20	2,2			1,483	14,54%

Résumé

Les huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* provenant du village Oumaden dans la Wilaya de Tizi-Ouzou et *Syzygium aromaticum* du marché local de Draâ ben Khedda ont été extraites par entraînement à la vapeur d'eau.

Les rendements en huiles essentielles sont de 5.60% pour *S.aromaticum* et 0.80% pour *E.globulus*.

L'activité antibactérienne appréciée en boîte de pétri a révélé que l'huile essentielle de *S.aromaticum* est la plus active.

Le pouvoir anti oxydant évalué par la méthode du DPPH a montré des IC50 respectives de 142.86mg/ml pour *E.globulus* et 38.10mg/ml pour *S.aromaticum*.

Cette étude complétée par la réalisation de coupes anatomiques a montré la présence de poches sécrétrices dans les feuilles et tiges d'*E.globulus* et de cellules à huiles essentielles dans le bouton floral de *S.aromaticum*.

Mots clés : huile essentielle, *Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus globulus*, activité antimicrobienne, activité antioxydante.

Abstract

The essential oils of *Eucalyptus globulus* from the village of Oumaden in the Wilaya of Tizi-Ouzou and *Syzygium aromaticum* from the local market of Draâ ben Khedda were extracted by steam stripping.

The yields in essential oils are 5.60% for *S.aromaticum* and 0.80% for *E. globulus*.

The antibacterial activity assessed in petri dishrevealed that the essential oil of *S.aromaticum* is the most active.

The anti oxidant power evaluated by the DPPH method showed respective IC50 of 142.86mg/ml for *E.globulus* and 38.10mg/ml for *S.aromaticum*.

This study completed by the realization of anatomical sections showed the presence of secretory pockets in the leaves and stems of *E. globulus* and essential oil cells in the floral bud of *S.aromaticum*.

Key words: essential oil, *Syzygium aromaticum*, *Eucalyptus globulus*, antimicrobial activity, antioxidant activity.