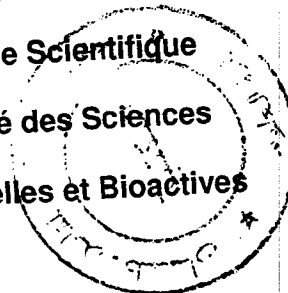


République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD DE TLEMCEM Faculté des Sciences

Département de Chimie Laboratoire des Substances Naturelles et Bioactives



MEMOIRE

Présenté pour obtenir le diplôme de :

MASTER en Chimie

Option : Molécules Bioactives : Synthèse et Applications

Etude Comparative des Propriétés Physico-chimiques et de l'Activité Antioxydante de l'Huile Essentielle Obtenue par Hydrodistillation et l'Huile Essentielle Commerciale d'*Eucalyptus Globulus*

Présenté par : Mr KHALDI Boumediene

Président du jury : Mme MERAD Nouria
Examineur : Mr TABTI Boufeldja
Mr DIB Amine
Encadrant : Mme BENYAROU MERIEM

MC-A Université de Tlemcen
Pr Université de Tlemcen
Pr Université de Tlemcen
Pr Université de Tlemcen

Promotion : Année Universitaire 2015-2016



REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie « DIEU » le tout puissant, maître des cieux et de la terre qui m'a donné, la force et le courage pour réaliser ce travail.

A mon président du jury.

Mme MERAD Nouria, MC-A à la Faculté des sciences.

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury et juger ce travail. Pour votre confiance.

Veillez agréer l'expression de mon profond respect.

A mon encadrant.

Mme BENYAROU Meriem, Professeur à la Faculté des Sciences.

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce sujet. Pour votre aide compétente et vos conseils. Pour votre encouragement tout on long de ce travail. Veuillez croire en ma

profonde reconnaissance.

A mes Examineurs.

Mr TABTI Boufeldja, Professeur à la Faculté des Sciences.

Mr DIB Amine, Professeur à la Faculté des Sciences.

Pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail, Pour votre gentillesse, votre accueil et

votre disponibilité, Veuillez croire à l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements.

DEDICACE

Je dédie ce travail à :

La mémoire de mes parents.

Ma femme.

Mes trois enfants, Imad, Bouchra, Wième.

Mes frères.

Mes amis,

Mes collègues de travail.

Merci, pour votre aide, encouragement et soutien précieux.

LISTE DES ABREVIATIONS

HE	Huile essentielle.
E	<i>Eucalyptus</i> .
HEE	Huile essentielle extraite (obtenus par hydrodistillation).
HEC	Huile essentielle commerciale.
LASNABIO	Laboratoire des substances naturelles et bioactives.
COSNA	laboratoire de Chimie Organique, Substances naturelles et Analyses.
CPN	Laboratoire de Produits Naturelles de l'université de Corse.
CPG	Chromatographie en phase gazeuse.
CPG/SM	Chromatographie en phase gazeuse couplé par la spectrométrie de masse.
°C	Degré Celsius.
pH	Potentiel Hydroxyde.
I_s	indice de saponification.
I_A	indice d'acide.
I_E	indice d'ester.
KOH	hydroxyde de potassium.
CO₂	dioxyde de carbone.
m	Mètre.
cm	Centimètre.
ml	millilitre.
mg	milligramme.
Nm	Nanomètre.
AFNOR	Association Française de Normalisation.
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power.
DPPH	1,1-diphényle-2-picryl-hydrazyl.
IC50	Concentration d'inhibition correspondant à 50 % de la concentration.
VMHD	Vacuum Micro wave HydroDistillation.

LISTE DES FIGURES

- Figure1 Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.
- Figure2 Montage d'hydrodistillation de l'huile essentielle.
- Figure3 Entraînement à la vapeur d'eau.
- Figure4 Principe de l'extraction au CO₂.
- Figure5 Extraction par micro-ondes.
- Figure6 Extraction par soxhlet.
- Figure 7 Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.
- Figure 8 Classification botanique (*Eucalyptus globulus* de Tlemcen).
- Figure 9 feuille, Fleurs, Fruits d'*Eucalyptus*.
- Figure 10 HE d'*Eucalyptus globulus*.
- Figure 11 Structure de base des flavonoïdes
- Figure 12 Arbre d'*Eucalyptus globulus* de la région de SAF-SAF.
- Figure 13 Feuilles et HEC d'*eucalyptus globulus*.
- Figure 14 Montage d'hydrodistillation (clevenger).
- Figure 15 Refractomètre Abbe 1T.
- Figure 16 Balance analytique.
- Figure 17 Spectrophotomètre UV/visible (DPPH).
- Figure 18 Représentation schématique du test au DPPH.
- Figure 19 Spectrophotomètre UV/visible (FRAP).
- Figure 20 DPPH : Absorbance HEE et Absorbance HEC.
- Figure 21 graphe du % d'inhibition en fonction de la concentration de l'HE.
- Figure 22 FRAP : Absorbance HEE et Absorbance HEC.
- Figure 23 graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'HE.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 Composition chimique d'une H.E.
- Tableau 2 Les principaux composants.
- Tableau 3 Les différents groupes de tanins.
- Tableau 4 Principales classes de flavonoïdes.
- Tableau 5 Conditions opératoires de l'extraction.
- Tableau 6 Matériels utilisées.
- Tableau 7 Caractéristiques organoleptiques de l'HE.
- Tableau 8 Résultats de La densité.
- Tableau 9 Résultats des indices.
- Tableau 10 Caractéristiques physico-chimiques d' HE *d'eucalyptus globulus*.
- Tableau 11 Composition chimique de l'huile essentielle de *E. globulus*.
- Tableau 12 Composition chimique de l'huile essentielle d'*E. globulus* de la kabylie (Algérie).
- Tableau 13 DPPH Absorbance.
- Tableau 14 DPPH % d'inhibition.
- Tableau 15 FRAP Absorbance.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE -----	1
Chapitre I : LES HUILES ESSENTIELLES -----	3
1. INTRODUCTION -----	3
2. DEFINITION -----	3
3. LES METHODES D'EXTRACTION ; obtention de l'HE -----	4
3.1. Introduction -----	4
3.2. Extraction par Hydrodistillation -----	5
3.3. Extraction par La distillation à la vapeur : -----	5
3.4. Technique d'Extraction au CO2 supercritique -----	6
3.5. Extraction assistée par micro-onde -----	7
3.6. Extraction par Soxhlet : -----	8
4. Analyses des Huiles Essentielles -----	8
4.1. Propriétés physico-chimiques -----	8
4.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG) -----	9
4.3. Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM) -----	9
5. Composition chimique d'une huile essentielle -----	10
6. Toxicité des huiles essentielles : -----	11
Chapitre II : ETUDE BOTANIQUE DE L' <i>EUCALYPTUS</i> -----	13
1. INTRODUCTION -----	13
2. <i>L'EUCALYPTUS GLOBULUS</i> (gommier bleu) -----	14
2.1. Généralités -----	14
2.2. Classification botanique -----	14
2.3. Description botanique -----	14
2.4. Huile essentielle d' <i>Eucalyptus Globulus</i> -----	15
2.4.1. Caractéristiques de l'HE d' <i>Eucalyptus Globulus</i> -----	16
2.4.2. Composition chimique de l'HE d' <i>Eucalyptus Globulus</i> -----	16
Chapitre III: L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE -----	19
1. INTRODUCTION -----	19
2. RADICAUX LIBRES -----	19
2.1. Définition -----	19
2.2. Origine des radicaux libres -----	19
3. ANTIOXYDANTS -----	20
3.1. Définition -----	20
3.2. Importance -----	20
3.3. Propriétés -----	20
3.4. -Classification des antioxydants -----	21
4. ÉVALUATION DE POUVOIR ANTIOXYDANT -----	21
4.1. Principe de la méthode de DDPH -----	21
4.2. Principe de la méthode de FRAP -----	22

Chapitre IV: MATERIEL ET METHODE	23
1. INTRODUCTION	23
2. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES	25
2.1. Principe	25
2.2. Mode opératoire	26
2.3. Calcul du rendement	26
3. CARACTERISTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES	27
3.1. Étude des propriétés organoleptiques	27
3.2. Étude des propriétés physico-chimiques	27
3.2.1. les propriétés physique	27
3.2.2. Les propriétés chimiques	29
4. CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES	30
4.1. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)	30
4.1.1. Conditions opératoires	30
4.1.2. Chromatographie en phase gazeuse	31
4.1.3. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse	31
4.2. Evaluation de l'activité antioxydante	31
4.2.1. Méthode du DPPH	32
4.2.2. Méthode du FerricReducing Antioxydant Power (FRAP)	33
Chapitre V :RESULTATS ET DISCUSSIONS	36
1. INTRODUCTION	36
2. EXTRACTION DE L'HE <i>D'EUCALYPTUS GLOBULUS</i>	36
3. ETUDE ANALYTIQUE DE L'HE <i>D'EUCALYPTUS GLOBULUS</i>	36
3.1. Caractéristiques organoleptiques	36
3.2. Les propriétés physico-chimiques	37
3.3. Analyses qualitatives et quantitatives par (CG) de l'HE	38
3.4. l'activité antioxydante	41
CONCLUSION GENERALE	45

INTRDUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours, l'homme a eu recours aux plantes pour se maquiller, se parfumer, mais aussi pour se soigner sans connaître réellement les propriétés de ces plantes, ni avoir la moindre connaissance scientifique expliquant leurs vertus. Ce n'est qu'au Moyen Age que les Huiles Essentielles ont été réellement découvertes grâce aux premières distillations et plus tard, aux progrès de la science et particulièrement à l'apparition de la chimie. Cette médecine traditionnelle est le précurseur de la phytothérapie et de l'aromathérapie. Aujourd'hui malgré les efforts des chimistes de synthétiser de nouvelles molécules, plus de 25 % des médicaments prescrits dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes [1].

Concentrées en molécules actives, les huiles essentielles présentent une efficacité contre les virus, bactéries, parasites mais aussi face aux affections respiratoires, douleurs, états inflammatoires, baisse d'immunité. Elles peuvent être utilisées en diffusion, par voie orale ou cutanée [2].

Les Huiles Essentielles sont des produits de composition complexe, renfermant des produits volatils contenus dans les végétaux obtenus à partir d'une matière première végétale, fleur, feuille, bois, racine, écorce, fruit, ou autre ; soit par entraînement à la vapeur d'eau, soit par hydrodistillation.

Les plantes capables de synthétiser une essence (en quantité suffisante pour être considérées comme des plantes aromatiques) sont peu nombreuses. Dans le règne végétal, seulement 10 % des plantes entrent dans ce cadre ; les principales familles botaniques contenant des plantes aromatiques sont les *Lamiacées*, *Myrtacées*, *Astéracées*, *Apiacées*, *Rutacées*, *Cupressacées*, *Abiétacées* [3].

Nous ciblerons notre travail sur une de ces familles, les *Myrtacées*. Cette grande famille (plus de 3.000 espèces dont un grand nombre est aromatique) est localisée notamment autour du bassin méditerranéen, en Amérique du sud et en Australie. Pour cela on a choisi l'*eucalyptus* qui est un grand arbre originaire d'Australie et qui est largement répandu en Algérie. Ses feuilles, très riches en huile essentielle, sont utilisées pour traiter de nombreuses infections, respiratoires et digestives, et constituent un bon remède contre le rhume, l'asthme, la rhinite, la sinusite, la bronchite ou encore l'état grippal et il peut être utilisé pour la désinfection de plaies. L'*eucalyptus* est connu comme l'arbre à la fièvre [4].

Chapitre I
LES HUILES ESSENTIELLES

INTRODUCTION GENERALE

Notre objectif dans ce travail est de faire :

- L'extraction des huiles essentielles *Eucalyptus globulus* de la région de Tlemcen en Algérie
- Les analyses physico-chimiques et le pouvoir antioxydant d'HE *Eucalyptus globulus* extraite par hydrodistillation et l'HE *Eucalyptus globulus* commerciale
- Une étude comparative entre les deux huiles.

Le travail présenté est composé de :

Chapitre I : Les huiles essentielles.

Chapitre II : Etude botanique.

Chapitre III : Matérielles et méthodes.

Chapitre IV : Résultats et discussions.

En fin une Conclusion générale.

1. INTRODUCTION

Depuis longtemps, les hommes avaient cherché le moyen de séparer les éléments huileux des produits aromatiques. Ils réussirent en soumettant la matière à l'action de la chaleur. Les substances aromatiques étaient transformées en vapeur, il suffisait de les recueillir et de les refroidir pour les obtenir sous forme liquide. Ce procédé qui se faisait à feu nu, prit le nom de distillation.

Aujourd'hui encore, la science confirme les différentes vertus des plantes aromatiques et de leurs huiles essentielles et leurs extraits bruts dont les domaines d'application sont très variés et qui sont très utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs et dans les cosmétiques, les parfumeries, les industries de savon et de détergents. Elles rentrent également dans la composition de plusieurs médicaments [5].

2. DEFINITION

C'est un liquide concentré, très complexe et hydrophobe. Il est obtenu par extraction mécanique, distillation à la vapeur d'eau ou distillation à sec de plantes aromatiques, fleur, feuille, bois, racine, écorce, fruit,...). Une huile essentielle est donc l'essence distillée de la plante aromatique. Issue du feuillage de la plante, l'huile essentielle possède une composition chimique variable selon les chimiotypes, les sols, les climats, les périodes, les heures de récoltes et les conditions du stockage. Elles ont des propriétés et des modes d'utilisation particuliers et donnent naissance à une branche nouvelle de la phytothérapie : l'aromathérapie [6].

L'huile essentielle est composée d'une centaine de molécules terpéniques et aromatiques particulièrement actives sur le métabolisme humain. Parce que les huiles essentielles sont à la mode, le marché offre de nombreux choix aux consommateurs mais il faut prendre garde à la qualité car seules les huiles essentielles chémotypées (c'est-à-dire botaniquement et biochimiquement définies) sont adéquates à la pratique de l'aromathérapie.

- **Essence** : molécules odoriférantes contenues dans la plante.
- **Huile essentielles** : extrait naturel obtenu par entraînement à la vapeur d'eau d'un végétale.
- **Huile** : caractère visqueux et hydrophobe.
- **Essentielle** : caractère principal typique de la fragrance.

Les huiles essentielles sont extrêmement volatiles et perdent rapidement leurs propriétés, lorsqu'elles sont exposées au soleil, à la lumière et à la chaleur, elles

Chapitre I : LES HUILES ESSENTIELLES

absorbent une grande quantité d'oxygène à l'air, en même temps leur odeur se modifie, leur point d'ébullition augmente et leur solubilité diminue. Pour une meilleure protection elles doivent être conservées dans des flacons en verre coloré bien fermés à l'abri de l'air et de la lumière [7-8-9].

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses activités biologiques. En phytothérapie, elles sont utilisées pour leurs propriétés antiseptiques contre les maladies infectieuses d'origine bactérienne [10].

Les huiles essentielles permettent aux plantes de s'adapter à leur environnement et assurer leur ultime défense, elles jouent plusieurs rôles écologiques [11-12].

3. LES METHODES D'EXTRACTION ; obtention de l'HE

3.1. Introduction

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des huiles essentielles. Le choix de la méthode la mieux adaptée se fait en fonction de la nature de la matière végétale à traiter, des caractéristiques physico-chimiques de l'essence à extraire, de l'usage de l'extrait et l'arôme du départ au cours de l'extraction.

Le principe d'extraction des huiles essentielles d'origines végétales restent identiques quel que soit le type d'extraction utilisé. Le but est d'emporter avec la vapeur d'eau les constituants volatils des produits bruts. La vapeur détruit la structure des cellules végétales, libère les molécules contenues et entraîne les plus volatiles en les séparant du substrat cellulosique [13].

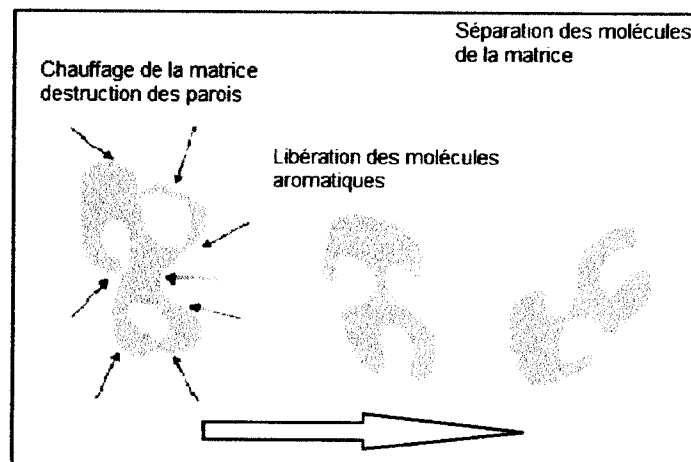


Figure 1 : Les étapes de l'obtention d'une huile essentielle.

La plupart des huiles essentielles sont obtenues par hydrodistillation et entraînement à la vapeur d'eau, généralement pour toutes les essences qui ne sont pas sensiblement altérées par l'eau à 100C°.

.La différence entre distillation et évaporation, est l'intérêt porté aux produits séparés. Dans la distillation, c'est la phase vapeur qui a de la valeur car elle contient le ou les constituants à séparer, alors que dans l'évaporation, c'est le résidu solide ou liquide obtenu par vaporisation du solvant, qui est le produit intéressant [14].

3.2. Extraction par Hydrodistillation

L'hydrodistillation : le matériel végétal est en contact direct avec l'eau. Lorsque le végétal est broyé on parle de turbo distillation [15].

L'hydrodistillation consiste à immerger directement le matériel végétal à traiter (intact ou éventuellement broyé) dans un alambic rempli d'eau qui est ensuite porté à ébullition. Les vapeurs hétérogènes sont condensées sur une surface froide et l'huile essentielle se sépare par différence de densité. Les inconvénients de cette méthode sont :

- La calcination du matériel végétal, ce qui entraîne une modification de la composition et des caractéristiques chimiques de l'huile essentielle [16].
- Le non maitrise de la température du récipient contenant le mélange (eau + organes végétaux).
- La modification de l'odeur, de la couleur et de la composition de l'huile essentielle au cours de la distillation [17].

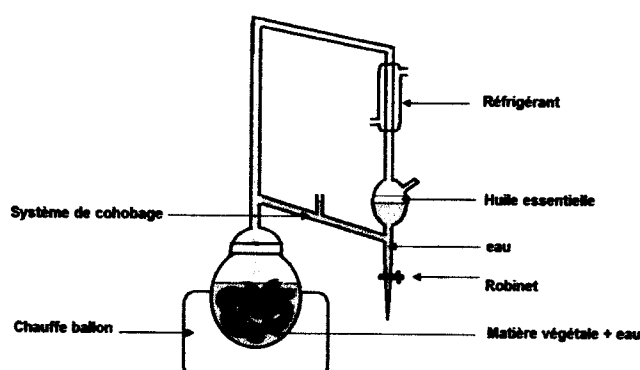


Figure 2 : Montage d'hydrodistillation de l'huile

3.3. Extraction par La distillation à la vapeur

La méthode d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau est basée sur le fait que la plupart des composés volatils contenus dans les végétaux sont entraînaables par la vapeur d'eau, du fait de leur point d'ébullition relativement bas et de leur caractère hydrophobe. C'est le procédé le mieux adapté à l'extraction des essences, surtout si elles sont destinées à des fins thérapeutiques [18].

Le matériel végétal, dans ce cas, n'est pas en contact avec l'eau, il 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. La vapeur d'eau chargée ainsi d'essence retourne à l'état liquide par condensation. Le produit de la distillation se sépare donc en deux phases distinctes : l'huile et l'eau condensée que l'on appelle eau florale ou hydrolat [19].

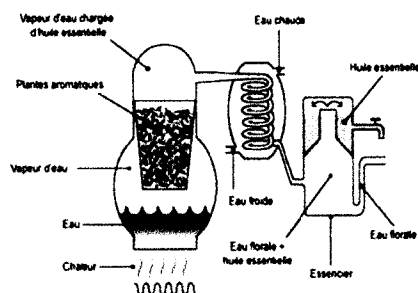


Figure 3: Entraînement à la vapeur d'eau [20].

3.4. Technique d'Extraction au CO₂ supercritique

L'extraction au CO₂ supercritique est une technique intéressante qui apporte de nouvelles notes olfactives (méthode d'extraction plus complète et moins dégradante que par la vapeur d'eau). Cependant son installation industrielle reste onéreuse, et l'appareillage est encore envahissant [21].

L'originalité de cette technique repose sur le solvant utilisé, il s'agit du CO₂ en phase supercritique. A l'état supercritique, le CO₂ n'est ni liquide, ni gazeux, et cela lui confère un excellent pouvoir d'extraction, modulable à volonté en jouant sur la température de mise en œuvre. Les fluides supercritiques comme le CO₂ sont de bons solvants à l'état supercritique, et de mauvais solvants à l'état gazeux.

Les avantages de ce procédé sont les suivants :

- Le CO₂ est totalement inerte chimiquement, il est naturel, non toxique et peu coûteux.
- On utilise des basses températures pour sa mise en œuvre.
- En fin de cycle, la séparation entre le solvant d'extraction et le soluté pour obtenir l'extrait est facile (simple détente qui ramène le CO₂ à l'état gazeux), avec une récupération quasi-totale et peu coûteuse.

- Les frais de fonctionnement, à l'échelle pilote ou de laboratoire, sont réduits (le CO₂ est continuellement recyclé).

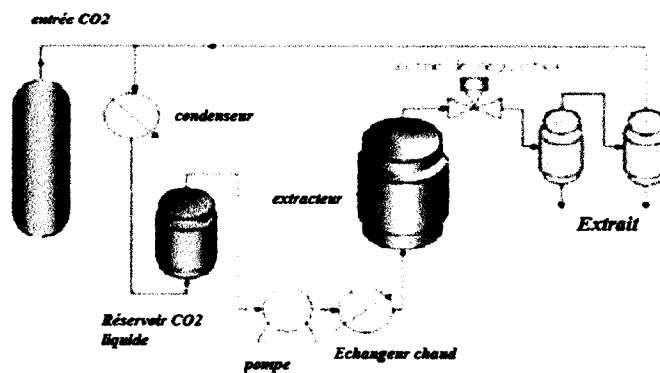


Figure 4: principe de l'extraction au CO₂ [21].

3.5. Extraction assistée par micro-onde

Le procédé d'extraction par micro-ondes appelée (Vacuum Micro wave Hydrodistillation : VMHD) consiste à extraire l'huile essentielle à l'aide d'un rayonnement micro-ondes d'énergie constante et d'une séquence de mise sous vide. Seule l'eau de constitution de la matière végétale traitée entre dans le processus d'extraction des essences.

Sous l'effet conjugué du chauffage sélectif des micro-ondes et de la pression réduite de façon séquentielle dans l'enceinte de l'extraction, l'eau de constitution de la matière végétale fraîche entre brutalement en ébullition. Le contenu des cellules est donc plus aisément transféré vers l'extérieur du tissu biologique, et l'essence est alors mise en œuvre par la condensation, le refroidissement des vapeurs et puis la décantation des condensats.

Cette technique intéressante présente les avantages suivants :

- Rapidité.
- Economie du temps, d'énergie et d'eau.
- Extrait dépourvu de solvant résiduel.
- Des rendements plus élevés.
- Une meilleure sélectivité [22-23].

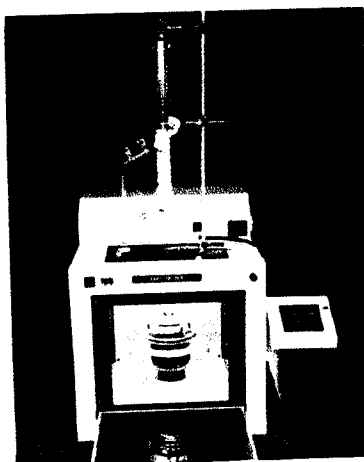


Figure 5 : Extraction par micro-ondes

3.6. Extraction par Soxhlet

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisqu'il est distillé à chaque cycle.

Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale [24]. Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides [25], ou de diverses autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux micro-ondes [26] et aux ultra-sons.

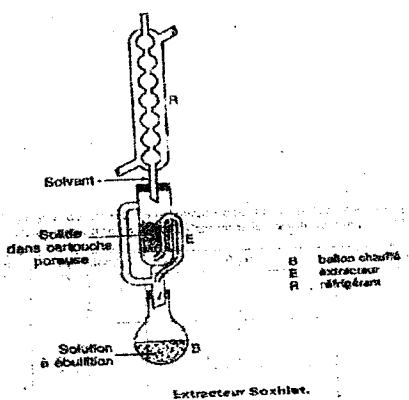


Figure 6 : Extraction par soxhlet

4. ANALYSES DES HUILES ESSENTIELLES

4.1. Propriétés physico-chimiques

D'une manière générale, les propriétés et caractéristiques d'une huile essentielle sont les différents indices, pouvoir rotatoire, viscosité, densité, solubilité dans l'alcool, point d'ébullition et congélation [27].

Toutes les huiles volatiles sont acres, très inflammables, et très odorantes. Elles sont très peu soluble dans l'eau, mais soluble dans les solvants organiques apolaire usuels [28].

Le rendement est de l'ordre de 0,1% à 1%, ceci explique le coût élevé de l'HE, à l'exception le clou de girofle qui renferme plus de 15% d'essence.

Densité en général inférieure à 1.

Exceptions : cannelle : 1.025 – 1.070.

Girofle : 1.044-1.057.

Indice de réfraction assez élevé.

Coriandre : 1.4620-1.4700.

Vétyver bourbon : 1.5220-1.5300.

Pouvoir rotatoire : Il permet d'indiquer si elle possède une activité optique :

Dextrogyre est noté D ou (+).

Lévogyre est noté L ou (-) [29].

4.2. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La meilleure carte d'identité quantitative et qualitative d'une huile essentielle reste cependant le profil chromatographique en phase gazeuse. Il permet de connaître très exactement la composition chimique.

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 [30].

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.

4.3. Le couplage Chromatographie phase gazeuse/Spectrométrie de masse (CPG/SM)

Dans le secteur particulier des huiles essentielles, le couplage CPG/SM est, aujourd'hui, la technique de référence. Lorsqu'on soumet un composé moléculaire à cette analyse, on déclenche un processus à plusieurs étapes.

- 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 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.

L'appareillage CPG/SM permet de fournir un chromatogramme accompagné d'un ensemble de spectres de masse correspondants à chaque pic chromatographique, ce qui permet l'identification précise de la majorité des constituants séparés par la CPG.

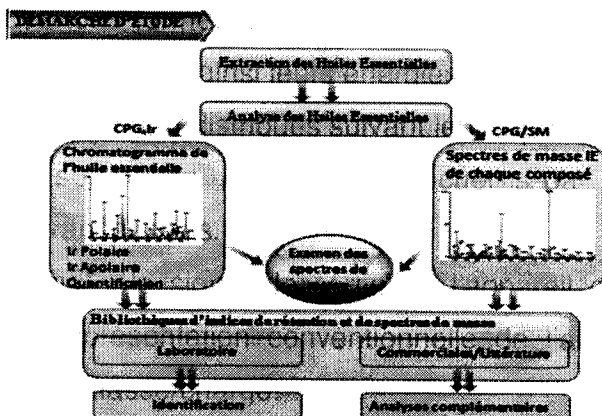


Figure 7 : Identification des constituants d'une huile essentielle par combinaison des techniques de CPG et de CPG/SM.

4.4. Activité Antioxydante

4.4.1. Introduction

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) et superoxydes (O_2^{\bullet}).

4.4.2. Radicaux Libres

a. Définition

Un radical est une molécule ou un fragment moléculaire qui contient un électron (ou plus) non apparié. Cette propriété rend ces molécules très réactifs du fait de la tendance de cet électron à se ré-apparier, déstabilisant ainsi d'autres molécules. Les molécules ainsi transformées deviennent à leur tour d'autres radicaux libres et initient ainsi une réaction en chaîne [44].

Plusieurs éléments peuvent être à l'origine de radicaux libres. Les sources des radicaux libres sont nombreuses [45-46].

b. Origine des radicaux libres

Ils sont produits par divers mécanismes physiologiques. Les rayonnements UV sont capables de générer des radicaux libres et les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres.

L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de radicaux libres selon divers mécanismes, également des antibiotiques, des anticancéreux.

4.4.3. Antioxydants

a. Définition

Un antioxydant est une molécule qui diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. L'oxydation fait partie d'une réaction d'oxydoréduction qui transfère des électrons d'une substance vers un agent oxydant. Cette réaction peut produire des radicaux qui entraînent des réactions en chaîne destructrices. Les antioxydants sont capables d'arrêter ces réactions en chaîne en se réduisant avec les radicaux et annihilant ainsi leur action. Ces propriétés se trouvent beaucoup dans les familles des thiols et des phénols.

b. Importance

La majorité des êtres vivants ont besoin de dioxygène pour assurer leur existence alors que le dioxygène est une molécule qui produit des dégradations sur les organismes vivants. Cependant, les antioxydants empêchent la formation des molécules très réactives ou provoquent l'élimination de ces espèces avant d'endommager les constituants de la cellule.

Les antioxydants sont aussi des ingrédients importants des compléments alimentaires dans le but d'entretenir la santé et de prévenir certaines maladies, comme le cancer. Ils sont aussi beaucoup utilisés par l'industrie comme conservateurs pour les aliments [47].

Les plantes produisent et utilisent de nombreux antioxydants pour se protéger, tels le glutathion, la vitamine C et la vitamine E.

c. Propriétés

D'un point de vue chimique, un antioxydant n'est qu'un composé réducteur, il va donc pouvoir réagir avec un oxydant pour le neutraliser. Les antioxydants vont ainsi réduire les radicaux si dangereux pour l'organisme en raison de leur pouvoir oxydant très élevé. Ainsi, les antioxydants présents dans les aliments protègent les molécules organiques.

Les antioxydants sont en fait des agents de prévention, ils bloquent l'initiation en complexant les catalyseurs, en réagissant avec l'oxygène, ou des agents de terminaison capables de dévier ou de piéger les radicaux libres, ils agissent en formant des produits finis non radicalaires.

d. Classification des antioxydants

Les antioxydants sont classés dans trois catégories différentes :

➤ **Antioxydants synthétiques**

Parmi les antioxydants phénoliques de synthèse qui sont autorisés dans certains aliments : le BHT 321 (3,5-ditertiobutyl-4-hydroxytoluène), BHA 320 (3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole) [48].

➤ **Substances synergiques**

Ce sont des molécules qui améliorent l'action de certains antioxydants. Ce qui se traduit souvent par un accroissement de la période de protection, parmi eux se trouvent : Les acides lactique, tartrique et ortho phosphorique et leurs sels de sodium, potassium ou calcium [45].

➤ Antioxydant d'origine végétale

Les plantes constituent des sources très importantes d'antioxydants. Les antioxydants naturels dont l'efficacité est la plus reconnue aussi bien dans l'industrie agroalimentaire que pour la santé humaine sont : les tocophérols, les caroténoïdes et les polyphénols [45].

4.4.4. évaluation de Pouvoir Antioxydant

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, comme les peroxydes $\text{ROO}\cdot$ par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter), les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter), ou les radicaux $\text{ABTS}\cdot$ (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), ainsi que la méthode utilisant le radical libre $\text{DPPH}\cdot$ (diphényl-picrylhydrazyle).

Dans notre travail, nous avons choisi la méthode DPPH et la méthode FRAP en raison de leur simplicité, rapidité et disponibilité d'appareillage (UV visible,...).

a. Principe de la méthode de DPPH

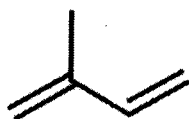
La méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH (1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl). Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulier au radical synthétique DPPH. Le passage de la coloration violette à jaune verte indique la stabilisation en DPPH. La mesure de la décroissance de coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'IC50, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue. Généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (IC50), (des comparaisons d'IC50 sont réalisées), le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale.

b. Principe de la méthode de FRAP

Ce test a été découvert par Oyaizu 1896 [15]. Ce test est considéré comme un test direct et rapide. Il est utilisé pour mesurer le pouvoir des antioxydants non enzymatiques, pour déterminer l'activité antioxydant des extraits étudiés dans un milieu neutre. Il est basé sur la réduction des ions Fe^{+3} à des ions de Fe^{+2} . La lecture de l'absorbance se fait à une longueur d'onde $\lambda = 700 \text{ nm}$.

5. COMPOSITION CHIMIQUE D'UNE HUILE ESSENTIELLE

C'est un mélange de molécules variées, comprenant en particulier des terpènes (hydrocarbures non aromatiques), c'est-à-dire dérivés de l'isoprène et non du benzène, et des composés oxygénés (alcools, aldéhydes, cétones, ester).



isoprène

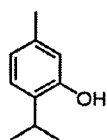
Tableau 1 : quelques produits qui entre dans la composition chimique d'une H.E [29]

Ocimene (Basilic)	Vitamine A	<u>cubébol</u> ,
α -carvone	Menthol	Linalol
Acide cinnamique	Aldéhyde cinnamique	Eucalyptol
Acétate de géranyl	acétate de linalyle	

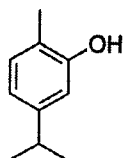
6. TOXICITE DES HUILES ESSENTIELLES

Les HE ne sont pas des produits qui peuvent être utilisées sans risque. Certaines HE sont dangereuses lorsqu'elles sont appliquées sur la peau, en raison de leur pouvoir irritant (les huiles riches en thymol, ou en carvacrol), allergène (huiles riches en cinnamaldéhyde) ou photo-toxique (huiles de citrus), d'autres HE ont un effet neurotoxique (les cétones comme l' α -thujone ($C_{10}H_{16}O$) sont toxiques pour les tissus nerveux).

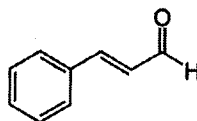
Thymol



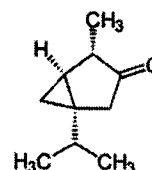
Carvacrol



Cinnamaldéhyde



α -thujone



La toxicité des HE est assez mal connue. Il manque de données sur leurs éventuelles propriétés mutagènes et cancérigènes. La plupart du temps, sous le terme de toxicité sont décrites des données expérimentales accumulées en vue d'évaluer le risque que représente leur emploi [31].

Il est donc préférable de faire appel à un aromathérapeute ou un pharmacien qualifié avant de se servir de l'huile essentielle. De plus, il ne faut pas les utiliser pures et prendre soin de les diluer dans une huile végétale avant de les prendre ou de les appliquer sur la peau [32].

Chapitre II

ETUDE BOTANIQUE

Chapitre II : ETUDE BOTANIQUE DE L'EUCALYPTUS

1. INTRODUCTION

Le genre *eucalyptus* est originaire de Tasmanie en Australie. Il fait partie de la famille des Myrtacés, son nom a pour origine les mots grec : eu « bien » et *Kaluptos* « couvert ». Il fut décrit et baptisé en 1788 par le botaniste français L'Heritier, après qu'il eut examiné des échantillons *d'eucalyptus obliqua*, parmi les plantes australiennes récoltées par Nelson. Dix-neuf espèces avaient été nommées en 1800 et 28 en 1820. En 1840, 71 espèces *d'eucalyptus* avaient reçu des noms et 140 en 1890. Depuis lors, des savants botanistes se sont succédé dans la description des espèces *d'eucalyptus* et W.F. Blakelly, assistant de Maiden, décrivait 500 espèces dont 138 variétés en 1938 [33].

Les noms vernaculaires : Calitouss « le nom le plus connue en Algérie », Calibtus, Kafor. Ces noms sont les plus populaires en Algérie qui sont utilisés dans différentes régions.

L'eucalyptus est l'une des plantes médicinales les plus utilisées à travers le monde. Les extraits de l'huile des feuilles de cette plante sont largement utilisés, dans la médecine traditionnelle, depuis des siècles contre la grippe, et notamment comme anti-inflammatoire. Les études récentes soulignent des propriétés antioxydants et antimicrobiennes de ces huiles essentielles [34].

Les aborigènes d'Australie utilisaient les feuilles pour traiter les fièvres (notamment la malaria), d'où son nom commun l'arbre à la fièvre. Les habitants de la Tasmanie avaient également compris l'intérêt de *l'eucalyptus* pour son rôle d'assécher les zones marécageuses pour éradiquer les insectes, porteurs de maladies.

La production commerciale d'huile essentielle *d'eucalyptus* a débuté en 1860, dans la région de Victoria en Australie. Dès la fin du XIXème siècle, l'huile essentielle *d'eucalyptus* fut largement employée dans un but thérapeutique, pour traiter les bronchites et les rhumes, ainsi que pour son action antiseptique.

L'eucalyptus appartient à la famille des Myrtacées, grande famille de 72 genres. Le genre *eucalyptus* comporte plus de 600 à 700 espèces et variétés [35].

Les espèces les plus connues sont : (*E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. citriodora*, *E. dives*, *E. radiata*, *E. polybractea* *CT cryptone*...).

Nous allons cibler notre étude sur l'espèce, *l'eucalyptus globulus*.

Chapitre II : ETUDE BOTANIQUE DE L'EUCALYPTUS

2. L'EUCALYPTUS GLOBULUS (gommier bleu)

2.1. Généralités

Dans les principaux pays planteurs d'*eucalyptus*, l'*eucalyptus globulus* a été la principale source commerciale d'huiles essentielles, ses feuilles renferment environ (60-75 %) de 1,8- cinéol (eucalyptol).

Eucalyptus globulus est principalement utilisés en phytothérapie. Cet arbre, originaire d'Australie, pousse dans les régions tropicales et subtropicales. Le gommier bleu, s'est très bien acclimaté au sud de l'Europe et aux rives du bassin méditerranéen comme l'Algérie.

Son introduction en Algérie fut par les français en 1860, Pendant les années 1960 à 1970, le reboisement à base d'*eucalyptus* ont concernés notamment l'Est (El-Kala, Annaba, Skikda), le centre (Tizi-Ouzou, Bainem) et l'Ouest (Mostaganem, Tlemcen) et ceci afin de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et papetiers [36-37].

2.2. Classification botanique

Règne	Plantae
Sous- Règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous- Classe	Rosidae
Ordre	Myrtales
Famille	myrtacée
Genre	Eucalyptus
Espèce	Globulus



Figure 8 : Classification botanique (*Eucalyptus globulus* de Tlemcen).

2.3. Description botanique

L'*Eucalyptus* est une plante appartenant à la famille des myrtacées, est un très bel arbre de 30 à 35 m, il peut atteindre une hauteur de 100 m dans certain cas. Le tronc comprend une écorce à la base foncée et rugueuse et, en hauteur, lisse, gris cendré laissant s'exfolier son épiderme en longs lambeaux souples et odorants, il possède également des lenticelles gorgées de gomme balsamique et un bois rouge [38].

Chapitre II : ETUDE BOTANIQUE DE L'EUCALYPTUS

- **Feuilles** : Les feuilles des arbres juvéniles apparaissent par paires sur des tiges carrées. Elles mesurent de 6 à 15 cm de long et sont couvertes d'une pruine cireuse bleu-gris, qui est à l'origine du nom de « gommier bleu ».
 - Les *Eucalyptus* portent des feuilles persistantes, glabres mais différentes en fonction de l'âge des rameaux.
 - Les jeunes rameaux possèdent des feuilles larges, courtes, avec un vrai limbe nervuré (vignette).
 - Les rameaux plus âgés possèdent des feuilles aromatiques, alternes, épaisses, vert foncé, courtement pétiolées [39].
- **Fleurs** : Les fleurs sont très variées. Elles ont une couleur blanc crème (en bouton de couleur blanc-bleu), solitaires, relativement larges. La base des sépales adhère à l'ovaire infère, le calice et la corolle sont soudés et sa paroi renferme des poches d'essence aromatique [39].
- **Fruits** : Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune. Les fruits ligneux mesurent de 1,5 à 2,5 cm de diamètre ont une capsule très dure [39].



Figure 9 : feuille, Fleurs, Fruits d'*Eucalyptus*

Les plantes cueillies dans de bonnes conditions climatiques au moment de leur pleine maturité ont une teneur très élevée en composants actifs.

2.4. Huile essentielle d'*Eucalyptus Globulus*

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

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est extraite par entraînement à la vapeur d'eau ou par hydrodistillation des feuilles.



Figure 10 : HE d'*Eucalyptus globulus*

2.4.1. Caractéristiques de l'huile essentielle d'*Eucalyptus Globulus*

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* a une couleur claire, elle dégage une odeur forte et camphrée. Elle se révèle efficace pour l'hygiène buccale. Cette essence s'utilise pour les bains, dans la cuisine, en inhalation, pour un massage, mais aussi pour un soin. Elle sert également à parfumer les produits de nettoyage [28].

Les huiles essentielles d'*eucalyptus* est utilisé contre l'inflammation et l'infection des voies respiratoires (bronchite, sinusite, rhume, etc.).

2.4.2. Composition Chimique de l'HE d'*Eucalyptus Globulus*

Dans la littérature, la teneur en HE de la feuille séchée d'*eucalyptus* (principalement *E. Globulus*) varie entre 0,5 et 3,5%, l'eucalyptol (1-8 cinéole) est le constituant majoritaire (60 à 80%), on trouve aussi d'autres composés *terpéniques*, phénoliques (des tanins), des flavonoïdes et de la cire.

Tableau 2 : les principaux composants

Monoterpènes - Limonène	Oxyde terpénique -1,8-cinéole	Monoterpénols - alpha-terpinéol	Sesquiterpènes -Globulol

Chapitre II : ETUDE BOTANIQUE DE L'EUCALYPTUS

➤ Eucalyptol

L'eucalyptol « 1,8-cinéol » est un composé naturel organique incolore. C'est un éther cyclique et un monoterpène. Les propriétés médicinales de l'*eucalyptus* sont surtout attribuables à l'eucalyptol (1,8-cinéole) que renferment ses feuilles.

Pour que l'huile essentielle soit efficace, il faut qu'elle renferme 70 % à 85 % de cette substance.

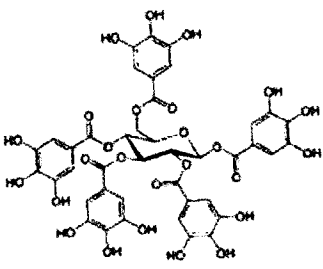
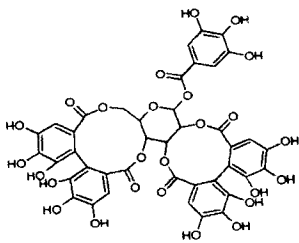
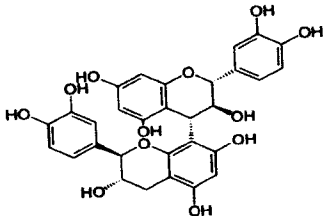
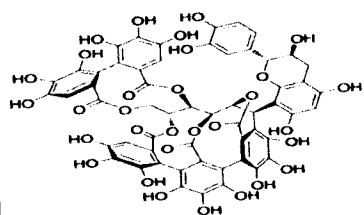
➤ Les tanins

Les tanins sont des substances naturelles phénoliques. Ce sont des métabolites secondaires très répandue dans le bois, l'écorce, les feuilles, les fruits, les graines et/ou les racines de nombreux végétaux. Ils jouent le rôle d'armes chimiques défensives contre certains parasites. Ils favorisent la régénération des tissus et la régulation de la circulation veineuse, tonifient la peau dans le cas des rides [39].

Deux groupes de tanins différents sont distingués : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables [40-41-42].

- Les tanins hydrolysables sont des esters du glucose et d'acides phénols.
- Les tanins non hydrolysables sont des polymères de flavonols (catéchols) et de proanthocyanidols [41].

Tableau 3: Les différents groupes de tanins

Tannins hydrolysables	<p>Les tannins galliques</p> 	<p>Les tanins ellagiques</p> 
Tannins non hydrolysables	<p>procyanidin B3</p> 	<p>AcutissimeA</p> 

Chapitre II : ETUDE BOTANIQUE DE L'EUCALYPTUS

➤ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes désignent une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols, ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides.

La classe des flavonoïdes comporte à elle seule plus de 4000 substances qui ont été isolées et identifiées à partir des milliers de plante [40].

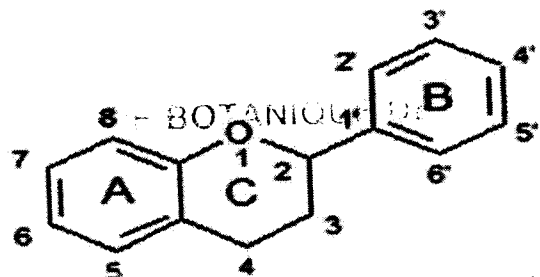
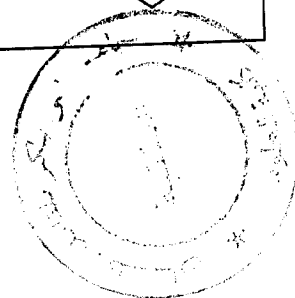


Figure 11 : Structure de base des flavonoïdes

Tableau 4: Principales classes de flavonoïdes [43]

Flavones	Flavonols	Flavanols
Flavanones	Anthocyanidines	Isoflavones



Chapitre II

MATERIELLES ET METHODES

1. INTRODUCTION

La qualité de l'essence d'une plante varie en fonction de la période de la journée ou elle est récoltée. C'est dès l'aube, lorsque la rosée s'évapore, que la concentration des huiles essentielles est la plus élevée dans les plantes, car les gouttelettes de rosée empêchent encore l'évaporation des huiles. A défaut, on peut récolter en fin d'après-midi ou en début de soirée, au moment où les plantes exhalent le moins leur parfum [3-4].

Les feuilles d'eucalyptus ont été récoltées dans la région saf saf, de la daïra de chetouane, Wilaya de Tlemcen) durant le mois d'avril 2016. L'identification de l'espèce a été réalisée par Mr F. Hassani MCA au département d'écologie et environnement Faculté de SNV-STU, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, comme étant *Eucalyptus globulus*.



Figure 12 : Arbre d'*Eucalyptus globulus* de la région de SAF-SAF

Les feuilles d'*eucalyptus* ont été séchées à l'air libre et à l'ombre à température ambiante durant 4 à 5 jours et l'huile essentielle commercial d'*eucalyptus globulus* a été fourni par le Pr Negadi Latifa de la faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

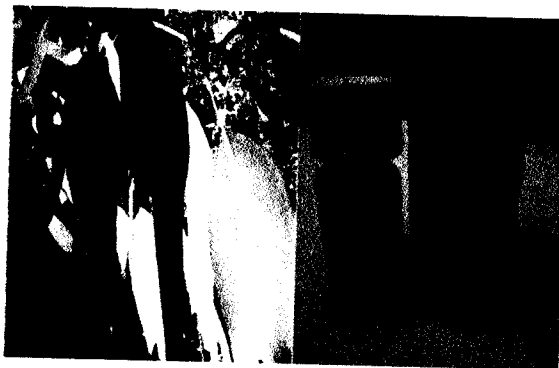


Figure 13 : Feuilles et HEC d'*eucalyptus globulus*

Chapitre III : MATERIEL ET METHODE

La première partie de notre travail a été consacrée à :

- L'extraction de l'huile essentielle de la plante *Eucalyptus globulus*.

Tableau 5 : Conditions opératoires de l'extraction

Période de récolte	Avril 2016
Heure de récolte	Fin d'après midi
Région de récolte	Saf-saf Tlemcen
Partie recueillie	Les feuilles
Etat de MV	Sèche
M MV (g)	210,59 g
La durée de l'hydrodistillation	04 heures

La première partie c'est l'analyse chromatographique en phase gazeuse/SM des huiles essentielles *d'eucalyptus globulus* et *l'eucalyptus globulus* commercial, elle a été réalisée au niveau du laboratoire de COSNA de la faculté des sciences, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

La deuxième partie a été conduite pour l'étude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle extraite *d'eucalyptus globulus* et l'huile essentielle commercial *d'eucalyptus globulus*. Elle a été réalisée au niveau du laboratoire de LASNABIO de la faculté des sciences à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

La troisième partie consiste à étudier les propriétés physico-chimiques. Elle a été faite au laboratoire de Chimie organique du département de chimie de la faculté des sciences à l'Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen.

Chapitre III : MATERIEL ET METHODE

Tableau 6 : matériels utilisés

Matériel	Référence
CPG	Perkin Elmer Clarus 600 (Walhton, MA, USA)
UV visible OPTIZEN pour (DPPH)	Longueur d'onde : 517 MHz NS : 5U4606-119009-00
UV visible Perkinelmer, Lambda 25 pour (FRAP)	Longueur d'onde : 700 MHz Ref : L600000B
Micropipette à volume variable de 100-1000 µl	ISOLAB La borgerate GmbH N : 11089420
appareil de type Clevenger -Chauffe ballon de 6 litres	
réfractomètre ATAGO	Abbé 1T S/N : 029002
papier pH	MN : MACHEREY-NAGEL D-52348, Duren- 058400
Balance Analytique 0 0001g	FA2004N
Balance de Précision OHAUS 5000gx1g	Model CS 5000
Bain marie thermostat Raypa	S/N : 68678 V : 230, W : 1200, T : 110°C

2. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

2.1. Principe

L'extraction des huiles essentielles par l'hydrodistillation a été effectuée dans un appareil de type Clevenger. Le principe de l'hydrodistillation consiste à immerger la matière végétale dans un ballon. Le tout est ensuite porté à l'ébullition. La chaleur permet l'éclatement des cellules végétales et la libération des molécules odorantes qui y sont contenues. Ces molécules aromatiques forment avec la vapeur d'eau, un mélange qui est condensé dans un réfrigérant. Par conséquent les huiles essentielles se séparent de l'eau par différence de densité. Les eaux aromatiques ainsi prélevées sont ensuite recyclées dans l'hydrodistillateur par le cohobage [49].

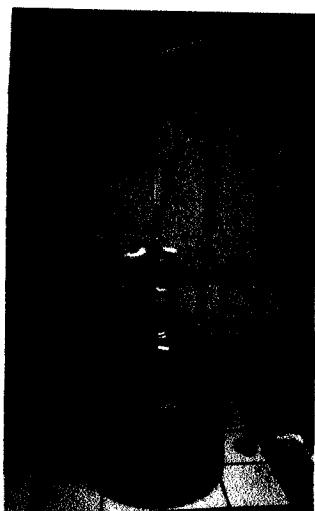


Figure 14 : Montage d'hydrodistillation (Clevenger)

Le montage de l'hydrodistillation comprend essentiellement les parties suivantes :

- **Ballon :** Sert à contenir la matière végétale émergée dans l'eau distillée.
- **Réfrigérant :** C'est un échangeur de chaleur servant à convertir toute vapeur en liquide provenant du ballon.
- **Cohobe :** colonne de recyclage de l'eau aromatique.

2.2. Mode opératoire

La matière végétale *Eucalyptus globulus* est placée dans un ballon avec de l'eau distillée. En chauffant, l'eau s'évapore ainsi que les molécules aromatiques. En passant dans un réfrigérant, elles se condensent pour donner une phase organique «huile essentielle», séparée de l'hydrolat par décantation. Le volume d'essence obtenue est noté pour le calcul du rendement [50].

2.3. Calcul du rendement

Le rendement des HE est défini comme étant le rapport entre la masse d'essence obtenue et la masse de la matière végétale sèche utilisée [51].

$$\text{RHE (\%)} = (\text{MHE} / \text{MS}) \times 100$$

RHE : Rendement en HE (%).

MHE: masse d'HE récupérée exprimé en g.

MS: la quantité de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction exprimée en g.

3. CARACTERISTIQUES DES HUILES ESSENTIELLES

Afin d'évaluer la qualité et la composition des huiles essentielles extraites et HE commerciale lors de cette étude, des analyses ont été menées pour déterminer leurs propriétés organoleptiques et physico-chimiques, ces propriétés constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE [52]. De plus, des analyses quantitatives et qualitatives ont été effectuées par chromatographie en phase gazeuse.

3.1. Étude des propriétés organoleptiques.

Chaque huile essentielle est caractérisée par ces caractères organoleptiques tels que, l'odeur, l'aspect physique et la couleur [53-54].

➤ **L'odeur** : Une odeur est le résultat, perçu par le sens de l'odorat, de l'émanation des corps volatils contenus dans certaines substances comme les molécules chimiques souvent qualifiées de molécules odorantes.

➤ **La couleur** : La couleur de l'huile essentielle peut être déterminée à l'œil nu.

➤ **L'aspect physique** : L'aspect d'une essence végétale change selon les produits qui la constituent, cette essence peut apparaître sous forme solide, liquide ou semi-solide.

3.2. Étude des propriétés physico-chimiques

Aujourd'hui, les propriétés physico-chimiques (densité, indice de réfraction, pouvoir rotatoire, indice d'acide, indice d'ester) sont exigées pour l'évaluation des HE commerciale [55].

3.2.1. les propriétés physiques

➤ Détermination de l'indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une matière, est un nombre qui caractérise le pouvoir qui a cette matière, à ralentir et à dévier la lumière.

$$n = C/V$$

n : L'indice de réfraction d'une matière.

C = 299 792 km/s, la vitesse de la lumière dans le vide.

V : la vitesse de la lumière dans le corps transparent.

L'indice de réfraction n'a pas d'unité car c'est le rapport de deux vitesses. Plus-la lumière est ralentie, plus la matière a un indice de réfraction élevé.

Les mesures sont effectuées à l'aide d'un réfractomètre d'Abbé 1T.

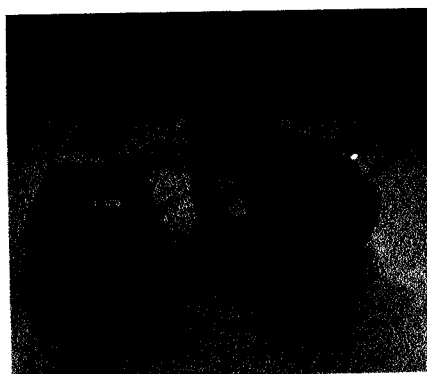


Figure 15 : réfractomètre Abbe1T

Le produit étalon de qualité pour la réfractométrie servant à ajuster le réfractomètre est l'eau distillée (1,333). Quand la détermination est réalisée à une température différente de 20 °C, on effectue la correction à 20 °C par le biais de la formule suivante :

$$n^{20} = n^T + 0,00045 (T - 20 \text{ °C})$$

n^{20} : indice à 20 °C.

n^T : indice à la température du bain thermostaté.

T : température du bain thermostaté.

➤ Détermination du pH

Le potentiel hydrogène (ou pH) est exprimé par une valeur numérique, indique si une solution est acide ou basique, il représente aussi la concentration en ion H_3O^+ d'une solution aqueuse.

La détermination du pH est effectuée à l'aide d'un papier pH au lieu d'un pH-mètre en raison de l'insuffisance du produit (huile essentielle) [56].

➤ La densité

La densité (la masse volumique) est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume.

$$d = m/V$$

d : La densité.

m : La masse d'huile.

V : Le volume d'huile.

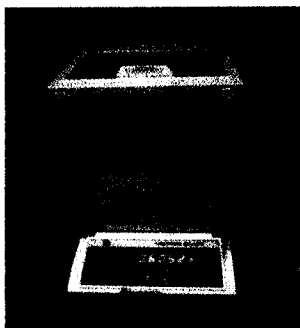


Figure 16 : Balance analytique

Matériels et méthode :

Une balance analytique et une micropipette.

- Mettre en marche la balance et la laisser se stabiliser.
- Poser la seringue puis cliquer sur le bouton pour tarer (avoir le zéro).

Nous avons pris un volume de 0,25 ml d'huile HEE (un volume de 0,4 ml d'huile HEC) avec une micropipette et on a pesé avec la balance analytique. La densité est égale à la masse du volume d'huile sur le volume de cette dernière.

3.2.2. Les propriétés chimiques

- **Détermination de l'indice d'acide**

L'indice d'acide (I_A), est le nombre de mg de KOH nécessaires à la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme d'huile essentielle.

Mode opératoire

Introduire la prise d'essai 0,31g d'HEE (0,32g d'HEC), dans un erlenmeyer, ajouté 5 ml d'éthanol à 95 % et 4 gouttes de solution de phénolphtaléine comme indicateur, et neutraliser le liquide avec la solution alcoolique de KOH (0.1 mol/l) contenue dans la burette.

L'indice d'acide est donné par la formule suivante :

$$I_A = 5.61 (v / m)$$

v : volume (ml) de la solution de KOH utilisée.

m : masse (g) de l'HE.

5,61g/l correspondent à 0,1 mole/l de KOH.

- **Détermination de l'indice de saponification**

L'indice de saponification (I_s), est le nombre de mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libres et la saponification des esters présents dans un gramme d'huile essentielle.

Mode opératoire

Dans un ballon, on introduit 0,31g d'HEE (0,32g d'HEC) on ajoute 6 ml de la solution de KOH (0.5 mol/l). On adapte un réfrigérant et on porte à reflux pendant 1h dans un bain marie. On laisse refroidir puis on ajoute 6,5ml d'eau puis 3 gouttes de la solution de phénolphtaléine. On titre l'excès d'hydroxyde de potassium avec la solution d'acide chlorhydrique. On fait de la même façon pour l'essai à blanc (témoin).

L'indice de saponification (I_s) est donné par la formule suivante :

$$I_s = 28.05 \times ((v_0 - v_1) / m)$$

v_0 : volume (ml) de la solution de HCl utilisé pour l'essai à blanc (témoin).

v_1 : volume (ml) de la solution de HCl utilisé pour HE.

M : masse (g) de la prise d'essai.

➤ Détermination de l'indice d'ester

L'indice d'ester (I_E) est le nombre en mg de KOH nécessaire à la neutralisation des acides libérés par l'hydrolyse des esters contenus dans un gramme d'HE.

L'indice d'ester est donné par la formule suivante :

$$I_E = I_s - I_A$$

4. CARACTERISATION DES HUILES ESSENTIELLES EXTRAITES

4.1. Analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS)

4.1.1. Conditions opératoires

Les échantillons des huiles essentielles collectées ont été analysés, en premier temps, par CPG-Ir et CPG/SM-IE selon la méthodologie développée au Laboratoire de Produits Naturelles (CPN) de l'université de Corse. Cette méthodologie est basée sur l'utilisation combinée de ces deux techniques complémentaires pour la quantification et l'identification des composés à l'aide de la bibliothèque Arome du laboratoire CPN de l'Université de Corse, caractéristique des composés volatils. Cette même séquence analytique a été développée au laboratoire de Chimie Organique, Substances naturelles et Analyses (COSNA) de l'Université de Tlemcen, en second temps, ainsi les analyses obtenues par CPG et CPG/SM au laboratoire COSNA étaient systématiquement comparés à ceux obtenus au laboratoire CPN afin d'identifier les molécules des différentes huiles essentielles, vu l'absence, au laboratoire COSNA, d'une bibliothèque spécifique aux volatils des plantes.

L'identification des différents constituants a été faite :

- sur la comparaison de leurs indices de rétention en CPG (IR) sur les colonnes non polaires et polaires (Rtx1 et Rtx-Wax), avec ceux de composés authentiques présents dans la bibliothèque du laboratoire CPN (la banque Arome).
- sur la comparaison entre les différents spectres de masse des de composés authentiques présents dans la bibliothèque du laboratoire CPN (la banque Arome).
- sur la comparaison des résultats des analyses obtenues au laboratoire CPN de Corse, avec ceux obtenues au laboratoire COSNA de Tlemcen.

4.1.2. Chromatographie en phase gazeuse

Les analyses chromatographiques ont été effectuées en utilisant un appareil CPG Perkin Elmer Clarus 600 (Walhton, MA, USA) équipé d'un injecteur unique et deux détecteurs à ionisation de flamme (FID). L'appareil a été utilisé pour l'échantillonnage simultané de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mx 0,22 mm, épaisseur film de 0,25 Um) avec différentes phases stationnaires : Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et RTX cire (polyéthylène glycol). Le programme de température est : de 60 à 230 ° C par pat de 2 ° C/min, puis la température est maintenu stable à 230 ° C pendant 30 min. Le gaz vecteur est l'hydrogène (0,7 mL/min). Les températures de l'injecteur et du détecteur ont été maintenus à 280 ° C. Le mode d'injection a été mené avec un rapport de 1:80. Volume injecté : 0,1 µl.

4.1.3. Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

L'huile essentielle a été analysée en utilisant un analyseur quadripôle Perkin Elmer Turbo Mass, directement couplé à un Perkin Elmer Auto system XL équipé de deux colonnes capillaires en silice fondue (60 mm 0,22 mm, Epaisseur 0,25 Um), Rtx-1 (polydiméthylsiloxane) et Rtx-Wax (polyéthylène glycol). Pour la CPG les mêmes conditions décrit ci-dessus ont été conservé. Pour la SM, la température de la source d'ions : 150 ° C ; l'énergie d'ionisation : 70 eV; Les spectres de masse à ionisation électronique ont été acquises avec un intervalle de masse de 35 à 350 Da; balayage de masse: 1s. Volume d'huile injectée : 0,1 µl.

4.2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des HE traduit leur aptitude à piéger les radicaux libres de l'organisme. Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante:

- DPPH ou (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).
- FRAP (FerricReducing Antioxydant Power) ou pouvoir réducteur.

4.2.1. Méthode du DPPH

La méthode de réduction du DPPH• (1,1-diphényl-di-picrylhydrazyl) proposée par Chen *et al.*, et Leitao *et al.* a été utilisée pour évaluer l'activité antioxydante de l'huile essentielle *d'eucalyptus globulus* extraite et l'huile essentielle *d'eucalyptus globulus* commerciale [57-58].

L'expérience a été effectuée à l'aide un spectrophotomètre (UV/visible) piloté par un système informatique.

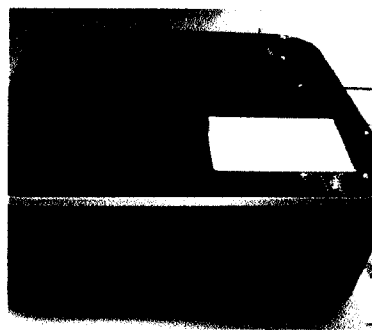


Figure 17 ; Spectrophotomètre UV/visible (DPPH)

➤ Principe

Le 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine (DPPH•) est un radical organique stable de couleur violet. En présence des composés anti radicalaires, le radical DPPH• est réduit et change de couleur en virant au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance. L'ajout de différentes dilutions des extraits à la solution de DPPH permettait de déterminer celle qui abaissait le plus l'absorbance.

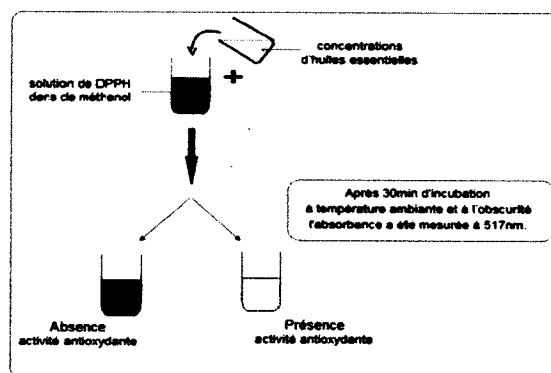
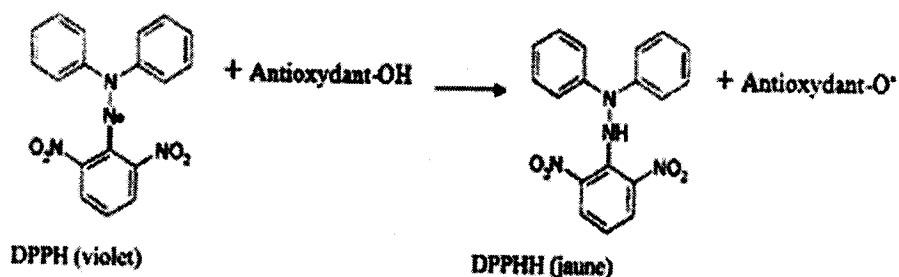


Figure 18 : Représentation schématique du test au DPPH.



➤ Mode opératoire

La solution de DPPH est obtenue en dissolvant 2,6 mg dans 1ml de méthanol 99%. Après 2heures d'incubation, on prépare des échantillons des huiles essentielles dans le méthanol.

Le test s'effectue en mélangeant 1 ml de la solution de DPPH avec 1ml de différentes concentrations d'huiles essentielles dans le méthanol 99%(2,5. 5 .10. 15. 20. 25µg/ml) dans 6 tubes à essai secs. Après 30min d'incubation à une température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517nm.

L'absorbance Le témoin blanc positif de la solution de DPPH• en absence de l'huile essentielle est : 0,648 nm.

Le témoin négatif (méthanol) est : 0

À l'œil nu, la couleur de la solution de DDPH vire du violet au jaune ce qui explique qu'on une activité antioxydante.

La mesure de la valeur exacte de cette activité est calculée en pourcentages d'inhibition selon l'équation suivante [16, 17].

$$I\% = 100 \times (A_{\text{témoin}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{témoin}}$$

$A_{\text{témoin}}$: Absorbance du témoin (la solution de DPPH sans l'huile essentielle à tester).

A_{test} : Absorbance du test (la solution de DPPH en présence de l'huile essentielle).

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'huile essentielle permet de déterminer le IC₅₀ (autrement appelée EC50, correspondant à la concentration efficace d'antioxydant nécessaire pour faire disparaître 50% de DPPH initial. Plus cette valeur est faible, plus le composé est antioxydant [59].

4.2.2. Méthode du Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP)

➤ Principe

La méthode Ferric Reducing Antioxydant Power (FRAP) est basée sur la réaction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) en présence d'un antioxydant qui agissent en tant que réducteur, dans ce cas, la couleur jaune de la solution d'essai change en vert selon la puissance de réduction de l'extrait. Cette méthode évalue le pouvoir réducteur des composés (les huiles essentielles) [60].

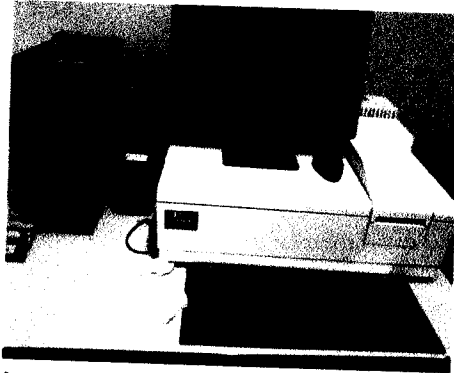
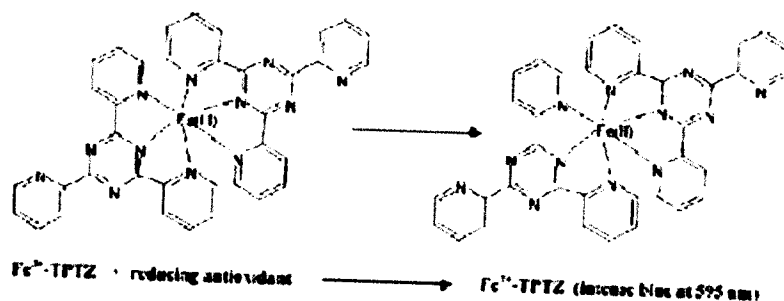


Figure 19 ; Spectrophotomètre UV/visible utilisé pour la méthode de (FRAP)

➤ Mode opératoire

Dans huit tubes à essai contenant chacun 300 μ l de solution d'échantillon (des concentrations suivantes : 0,78. 1,156. 3,125. 6,25. 12,5. 25. 50. 100 μ g/ml) ont été ajoutées, 625 μ l de tampon phosphate (0,2M pH 6,6), puis 625 μ l de potassium hexacyanoferrate [$K_3Fe(CN)_6$] (1%). L'ensemble est incubé à 50°C pendant 20 minutes. Un volume de 250 μ l d'acide trichloracétique TCA (10%) est ensuite ajouté. Le mélange est centrifugé, puis 625 μ l du mélange est ensuite prélevé. On ajoute ensuite 625 μ l d'eau distillée et 250 μ l de $FeCl_3$ (0.1%) fraîchement préparé dans l'eau distillée. La lecture est faite à 700 nm. La plus grande absorbance du mélange de la réaction indique une possibilité d'augmentation de la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}).



Chapitre III : MATERIEL ET METHODE

La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, en remplaçant l'extrait par 300 µl de méthanol qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS) [61-62].

IC50 : C'est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5. Elle est calculée à partir du graphe de l'absorbance en fonction de la concentration de l'échantillon.



Chapitre IV

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. INTRODUCTION

La caractérisation organoleptique, physico-chimiques ainsi que l'examen de leurs propriétés antioxydantes, de l'HE *d'eucalyptus globulus* commercial et HE *d'eucalyptus globulus* extraite, ont fait l'objet de discussion.

La matière végétale: *Eucalyptus globulus*.

2. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

Théoriquement la durée d'extraction est le temps nécessaire à la récupération de la totalité de l'huile contenue dans la matière végétale. Or en pratique, il est difficile de récupérer toute l'huile. Ce temps correspond alors au moment pour lequel nous n'observons plus d'huile dans le distillat. Il détermine la fin du processus.

Calcul du rendement

La masse d'huile obtenue par hydrodistillation à l'aide d'un Clevenger pendant 4h minimum est de 0,43g.

$$\text{RHE (\%)} = (\text{MHE} / \text{MS}) \times 100 = (0,43 / 210,59) \times 100 = 0,20 \%$$

$$\text{Rendement} = 0.20 \%$$

Nous avons que les feuilles adultes qui sont situées à 40m en hauteur de l'arbre, sont plus riches en huile essentielles que les feuilles jeune situées à deux ou trois mètre du sol, ce qui rend leurs cueillettes difficiles. Donc, nous avons récolté les feuilles jeunes, c'est pour cela que les rendements sont plus au moins faible.

3. ETUDE ANALYTIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE

Les propriétés organoleptiques et physico-chimiques constituent un moyen de vérification et de contrôle de la qualité de l'HE. Nous avons déterminé les caractéristiques organoleptiques, les propriétés physico-chimiques puis nous avons effectué des analyses qualitatives et quantitatives par (CPG) de l'HE *d'eucalyptus globulus*, et en dernier on a fait l'activité antioxydante par deux méthodes DPPH et FRAP.

3.1. Caractéristiques organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques des HE *d'eucalyptus globulus* récolté de la région de Saf-Saf de Tlemcen et extraites par hydrodistillation et l'HE *d'eucalyptus globulus* commercial sont représentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Caractéristiques organoleptiques de l'HE

	Aspect	Couleur	Odeur
HE obtenus par HD	Liquide mobile	Jaune claire	forte et camphrée
HE Commerciale	Liquide mobile	Incolore	forte et camphrée
AFNOR référence	liquide limpide, fluide et mobile	jaune très pâle à transparent	fraîche et camphrée

Les caractéristiques organoleptiques des deux huiles sont comparables avec les caractéristiques selon AFNOR (Association française de normalisation).

3.2. Les propriétés physico-chimiques

a. Indice de réfraction

L'indice de réfraction à 20°C est calculé par la formule suivante :

$$n^{20} = n^T + 0,00045 (T - 20)$$

$$\text{HE obtenus par HD : } n^{20} = 1,47574 + 0,00045 (23-20) = 1,47709$$

$$\text{HE Commerciale : } n^{20} = 1,44561 + 0,00045 (23-20) = 1,44696$$

Les indices de réfraction pour les deux huiles sont dans les normes, mais l'HE extraite présente un indice de réfraction plus élevé que l'indice de réfraction de HEC.

b. Le PH

Les résultats indiquent que l'HEC est moins acide que l'HE obtenus par HD.

c. Densité

La densité est calculée à l'aide de cette formule ; $d=m/v$.

La densité à température 20°C est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$d^{20} = (d_{\text{HE}} / d_{\text{eau}} \text{ à } 20^{\circ}\text{C}) + (0,00073 \times (\text{température ambiante} - 20))$$

Tableau 8 : Résultats de La densité

	Masse d'huile	Volume d'huile	d=m/v	d ²⁰
La densité HEE	0,2291 g	0,25 ml	0,9167g/ml	0,92035 g/ml
HE Commerciale	0,3668 g	0,4 ml	0,9089g/ml	0,91255 g/ml

On remarque que l'HEE est plus dense que l'HEC.

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

d. **Indice d'acide**, la formule : $I_A = 5.61 (v / m)$

e. **Indice de saponification**, la formule : $I_S = 28.05 \times ((v_0 - v_1) / m)$

Le témoin, $V_{HCl} = 1,5 \text{ ml} = V_0$

Tableau 9 : Résultats des indices

	Masse de l'huile	Volume de KOH	I_A
Indice d'acide HE extraite par HD	0,31g	0,2 ml	3,619
Indice d'acide HE Commercial	0,32g	0,15 ml	2,629
	Masse de l'huile	Volume de HCl	I_S
Indice de saponification HE extraite par HD	0,31g	1,4 ml.	9,04
Indice de saponification HE Commercial	0,32g	1,3 ml.	17,53

On constate que l'indice d'acide de l'HE extraite par HD est supérieur à celui de l'indice d'acide de l'HE Commercial.

Pour l'indice de saponification de l'HE extraite par HD est presque la moitié de celui de l'HE Commercial.

f. **Indice d'ester**, la formule : $I_E = I_S - I_A$

Même remarque que I_S , l'indice d'ester de l'HE extraite par HD est presque la moitié de celui de l'HE Commercial.

Les résultats de l'étude analytique des huiles essentielles sont reportés dans le tableau 10

Tableau 10 : Caractéristiques physico-chimiques d'HEs d'eucalyptus globulus

	n^{20}	Densité à 20 °C	PH	IA	IS	IE
HE obtenus par HD	1.47709	0,92035	5 - 6	3,619	9,04	5,421
HE Commerciale	1,44696	0,91255	6	2,629	17,53	14,901
Référence AFNOR	1.460 - 1.476	0.905- 0.921	4 - 6	0.84-3.74		
Travaux antérieurs [28]	1.4877	0.9146	4.86	1.96		

En comparant Nos résultats obtenus avec celle d'AFNOR et travaux antérieurs, on conclut qu'elles sont en accord.

3.3. Analyses qualitatives et quantitatives par (CG) des HEs

➤ La composition chimique de l'huile essentielle d'*eucalyptus* hydrodistillé est indiquée dans le tableau 11.

➤ L'analyse par CPG et CPG-SM a révélé la présence de 6 composés représentant 92.8 % de l'huile totale. Le composant principal était de 1,8-cinéole (75,8 %), tandis que le carvacrol (2.5 %), le limonène (18 %), α -pinène (1.5 %) et le myrcène (1,2 %) étaient des composantes principales mineures. L'autre composé identifié dans l'huile obtenue été α -phéllandrène avec un pourcentage de 0.1 %.

L'huile d'*eucalyptus* se composait principalement de monoterpènes oxygénés (87,6 %) et les hydrocarbures monoterpènes (4.6 %), le 1,8-cinéole détermine la valeur commerciale de l'huile et de son importance en tant que matière première pour différentes industries.

Tableau 11 : Composition chimique de l'HEE d'*E. globulus*.

Composés	RI _a ^c	%
α -pinène	939	1,5
Myrcène	987	1.2
limonène	1031	1.8
1,8-cinéole	1033	85.8
Carvacrol	1279	2.5
α -phéllandrène	1456	0.1
Taux d'identification%		92.9
Monoterpène oxygénés		87.6
Sesquiterpène hydrocarbonés		0.1
monoterpènes hydrocarbonés		4.5

➤ Composition chimique de l'HEC d'*E. globulus*

La composition chimique de l'huile essentielle commerciale d'*E. globulus* est constituée principalement du 1.8 cinéole avec un pourcentage de 78.5 % et de α -pinène avec un pourcentage de 13.2 %.

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 12 : Composition chimique de l'HEE d'*E. globulus* de la kabylie (Algérie) [63]

constituants	<i>Eucalyptus globulus</i>
α pinène	7,69
Camphène	0,08
β -pinène	0,39
β -myrcène	0,36
α -terpène	0,18
Eucalyptol	47,05
1,4-cyclohexadienne	1
P.cymène	3,48
Terpinolène	0,24
Isopentyl-isovalérate	0,17
Thujone	0,15
α -campholénal	0,15
α -gurjumène	0,17
Myrtenol	0,17
Géraniol	0,15
D- fenchyl- alcool	0,23
Aromadendrène	1,38
4-carbométhanol	0,41
Alloromadendrène	0,42
Viridiflorène	0,18
α -terpinène	3,58
α - terpineol	1,93
Cyclohexanol,2-méthylène-5-isopropényl	0,72
2,3-dihydro-1,8cinéol	0,32
Palustrol	0,13
Epiglobulol	1,65
Ledol	0,38
Globulol	8,65
γ -gurjunène	1,45
Eromophilen	0,41
Spatulenol	0,63
γ - eudesmol	0,21
Thymol	1,49
α -eudesmol	0,58
β - eudesmol	0,62
5-epi-neointermedeol	0,16
β -phéllandrène	1,63
Pcymol	1,55
Linalol	0,55
terpineol	2,35
geraniolacetate	0,29

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

En comparant les résultats de l'analyse par CPG/SM entre l'HE de Tlemcen et celle de Tizi-Ouzou on remarque que l'HE de Tlemcen est plus riche en 1,8-cinéole que l'HE de Tizi-Ouzou. Cette différence est due probablement au climat, sol,....

3.4. Activité antioxydante

- Résultats de l'activité antioxydante obtenue par la méthode de DPPH:

Tableau13 : DPPH Absorbance

concentration d'HE en µg/ml	Absorbance HEE	Absorbance HEC
2.5	0,228	0,508
5	0,198	0,375
10	0,178	0,334
15	0,137	0,316
20	0,098	0,307
25	0,067	0,288

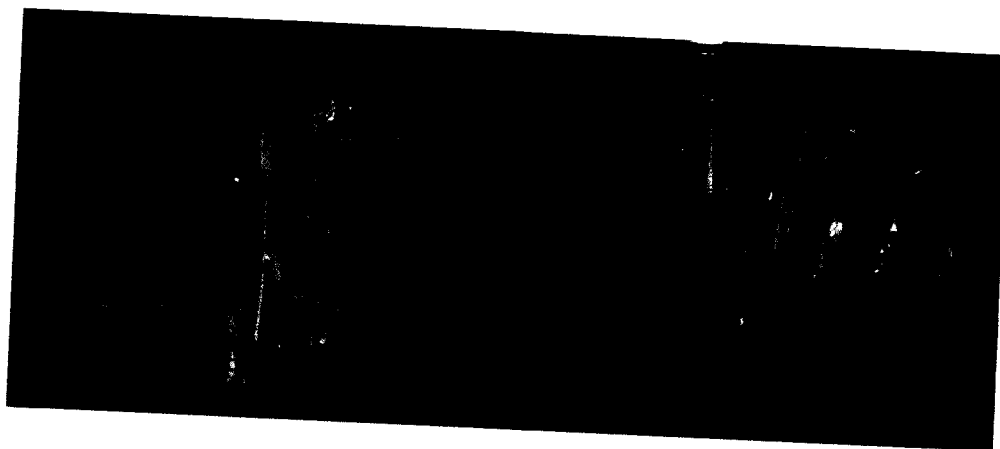


Figure 20 : Absorbance HEE et Absorbance HEC

Le changement de couleur du violet vers le jaune du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'HEE et l'HEC, représente l'activité du piégeage du DPPH, on peut dire qu'il a une bonne activité antioxydante pour HEE.

Chapitre IV : RESULTATS ET DISCUSSIONS

Tableau 14 : DPPH% d'inhibition

concentration d'HE en µg/ml	% d'inhibition HEE	% d'inhibition HEC
2.5	64,81 %	21,60 %
5	69,44 %	42,12 %
10	72,53 %	48,45 %
15	78,85 %	51,23 %
20	84,87 %	52,62 %
25	89,66 %	55,55 %

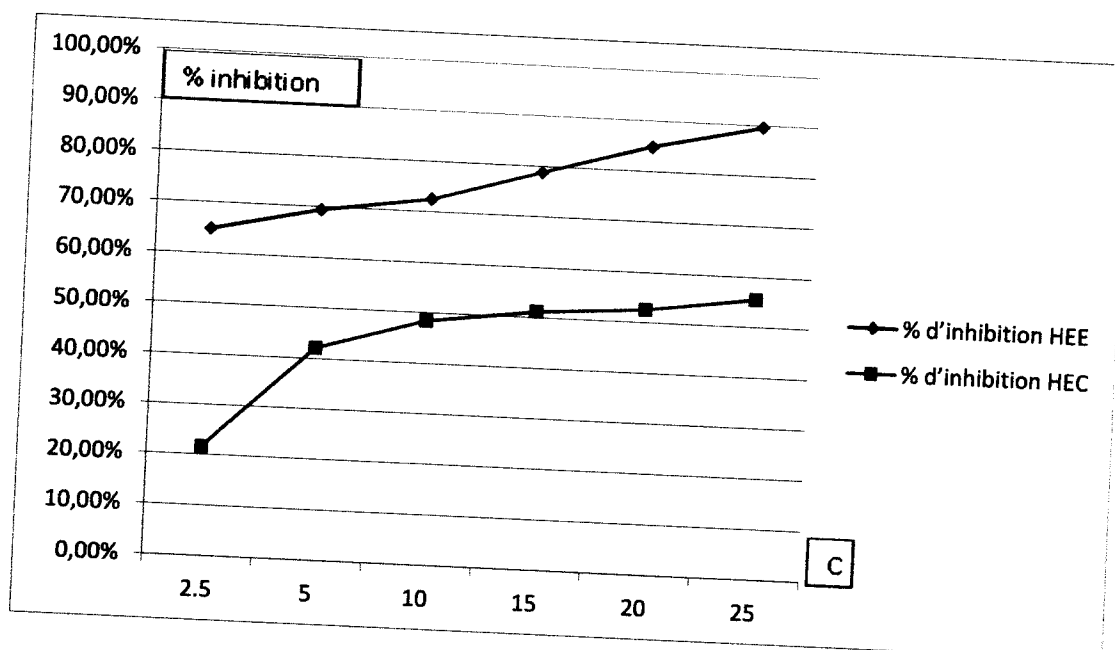


Figure 21 : graphe du % d'inhibition en fonction de la concentration des HEs.

Calcul des IC50

IC50 (concentration inhibitrice de 50 %), aussi appelée EC50 (Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testée nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH.

Les IC50 sont calculées graphiquement par des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés.

Pour l'huile essentielle commerciale *Eucalyptus globulus*.

IC₅₀ correspondant est la concentration efficace d'antioxydant nécessaire pour faire disparaître 50% de DPPH Initial est égale à 12,5 µg/ml.

➤ Résultats de l'activité antioxydante obtenue par la méthode de FRAP:



Figure 22 : Absorbance HEE et Absorbance HEC
L'apparition de la couleur verte. (Reduction de fer)

Tableau 15 : FRAP Absorbance

concentration d'HE en $\mu\text{g/ml}$	Absorbance HEE	Absorbance HEC
0,78	-0,203	0,085
1,156	-0,144	0,540
3,125	0,185	1,610
6,25	0,694	1,865
12,5	1,378	2,018
25	1,939	2,040
50	1,968	2,136
100	2,053	2,189

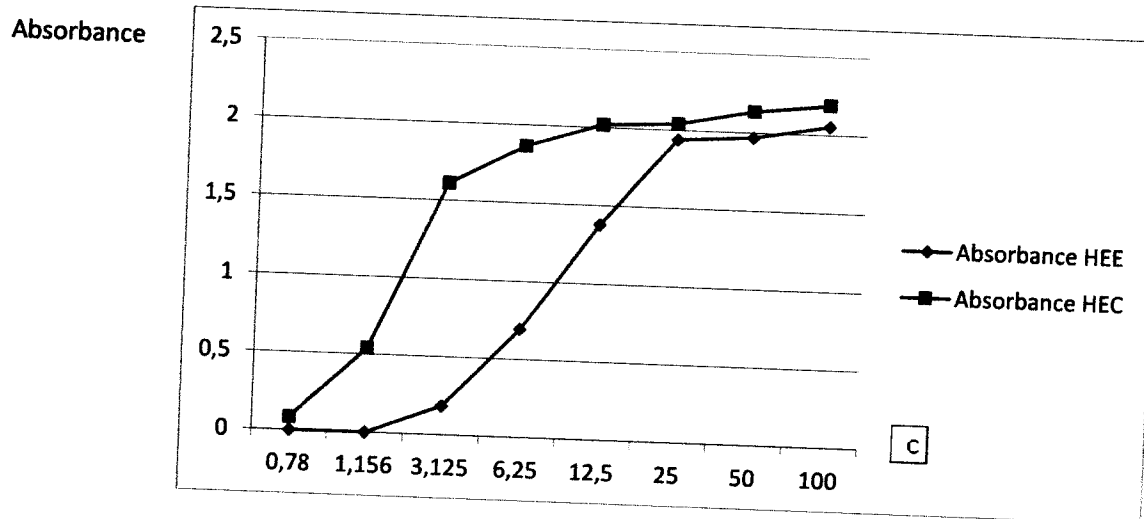


Figure 23 : graphe de l'absorbance en fonction de la concentration des HEs..

Calcul des IC50

Pour l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation d'*Eucalyptus globulus*
IC50 = 5,856 µg/ml C'est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5

Pour l'huile essentielle commerciale d'*Eucalyptus globulus*
IC50 = 1,148 µg/ml C'est la concentration de l'échantillon qui correspond à une absorbance égale à 0,5

L'huile essentielle obtenue par hydrodistillation a montré une capacité à réduire le fer mieux que l'huile essentielle commerciale.

Nous constatons que la capacité réductrice est proportionnelle à l'augmentation de la concentration d'extrait.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

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

Les huiles essentielles font un retour marqué au cours de ces dernières années. Avec un engouement certain pour les produits naturels à base de plantes, beaucoup de personnes considèrent à tort les huiles essentielles comme des produits sans risque.

Le travail que nous avons abordé, repose sur une étude des propriétés physicochimique et le pouvoir antioxydant de l'huile essentielle extraite par hydrodistillation et l'huile essentielle commerciale d'*Eucalyptus globulus* de la région de Tlemcen en Algérie.

Tlemcen est une ville riche en plantes aromatiques médicinales, on a vu l'importance de ces plantes grâce à son utilisation traditionnelle par les populations. Mais tenant compte des facteurs climatiques, de l'environnement, socio-économiques certains espèces deviennent de plus en plus rares et d'autres demeurent abondantes. L'HE d'*Eucalyptus globulus* est particulièrement intéressante d'un point de vue analytique par la présence des monoterpènes oxygénés (87,6%) et les hydrocarbures monoterpènes (4.6 %).

La chromatographie en phase gazeuse nous a permis d'identifier que le 1,8-cinéole est le produit majoritaire (85,8%) pour l'HE obtenue par HD et de 78.5% pour l'HEC.

Il est à noter que le rendement de l'huile essentielle de cette plante est assez faible : 0.02%.

Les propriétés physicochimiques tel que la densité, l'indice de réfraction, indice d'acide, indice de saponification et indice d'ester de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* obtenue par hydrodistillation et l'huile essentielle commerciale d'*Eucalyptus globulus* sont conforme aux normes AFNOR.

REFERENCES

REFERENCES

- [1] Damintotikarou. Mamoudzou h. Dicko. Jacques Simpore. Saydou Yameogo, Souleyman Sanon. Alfred s. Traore, activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du burkinafaso. 2005.
- [2] Géraldine Chabert. Myrtacées et aromathérapie. 2013.
- [3] Baudoux D. Les cahiers pratiques d'aromathérapie. 303 p. 2002.
- [4] Bergamini, D. The land and wildlife of Australia. Life Natural Library, New York (États-Unis). 1964.
- [5] Yahyaoui N. Extraction, analyse et évaluation de l'effet insecticide des huiles essentielles de *Menthe Spicata L* sur *Rhyzoperlhu dominicu (F.)* (Coleoptera, Bostrychidae) et *Tribolium confusm* (Duv.) (Coleoptera, Tenebrionidae). 2005.
- [6] Moller K. La distillation a l'alambic, un art à la portée de tous. 152P. 2008.
- [7] Bruneton J, Pharmacognosie « Phytochimie Plantes » médicinales 3 éd, Tec et Doc, paris - pp 484-540. 1999.
- [8] Benkada, isolation des huiles essentielles de la menthe suaveolens, ehrh (Bous Domrane) de la région de Tlemcen et leur analyse par différents méthodes chromatographique mise en évidence du composé majoritaire « la pulégone », pp 42,76. 1990.
- [9] Charpentier, Guide de préparateur pharmacie, Ed, Masson, Paris France. Pp 1068-1071.1242. 1998.
- [10] Hammoudi E. et Boudarham A. L'effet antimicrobien de miel. 20-25p. 2009.
- [11] Fouché J.G; Marquet A; .Hambuckers A. Les Plantes Médicinales De La plante Au médicament conception et Réalisation.2008.
- [12] Ormeno E, Fernandez C, Mévy J.P. Plant coexistence Alters terpene emission and content of Mediterranean Species-Phytochemistry.68 : 840-852. 2007.
- [13] Marie Elisabeth Lucchesi. Extraction Sans Solvant Assistée par Micro-ondes Conception et Application à l'extraction des huiles essentielles. pp 17.23.52. 2005.
- [14] Peyron L. Techniques classiques actuelles de fabrication des matières premières naturelles aromatiques. pp 217 – 238. 1992.
- [15] Lucchesi M.E. Extraction sans solvant assisté par micro-ondes conception et application a l'extraction des huiles essentielles. 2005.
- [16] Abouzaid.,Ancynt Antarh warning Anasbet Nhishz and Ankysa Cairo 256 pages.2000.
- [17] Chalchat J.K., Carry L. P., Menut C., Lamaty G., Malhuret R. and Chopineau J. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. J. Essent. Oil Res. 9: 67-75.1997.
- [18] Bego Ph. Connaitre l'essentiel sur les huiles essentielles. Collection aromathérapie pratique et familiale, Ed. MDB Paris, pp.2-3.2001.
- [19] Benjilali B. Extraction des plantes aromatiques et médicinales cas particulier de l'entraînement a la vapeur d'eau et ses équipements. Manuel pratique. Huiles essentielles : de la plante a la commercialisation. 17-59.2004.

- [20] Kingston M.M. et Haswell S.J., Microwave – Enhanced Chemistry, Fundamentals, Sample Preparation, and applications. Edition American Chemistry Society, Washington, DC, 772 p. 1997.
- [21] Edit Szekely ."Supercritical Fluid Extraction" Budapest University of Technology and Economics. Retrieved. 2007.
- [22] Brian M.L .The isolation of aromatic materials from plant products, R.J. Reynolds Tobacco Company, Winston- Salem (USA). p.57-148. 1995.
- [23] Mompon B. Quel avenir commercial pour les produits obtenus par les nouvelles technologies d'extraction : CO₂, Micro-ondes, ultrasons, nouveaux solvants, 4^e rencontre internationale de Nyons. p. 149-166. 1994.
- [24] E. Vagi, B. Simandi, A. Suhajda, E. Hethelyi, Food research international, Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum marjorana* L. Extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide., 38, 51-57. from wheat grains Journal of Food Composition and analysis, 0 17, 649-663. 2005.
- [25] J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, Talanta, applications Focused microwave-assisted Soxhlet extraction, 64, 571-577. 2004.
- [26] J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted Soxhlet, extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, Journal of Chromatography A, 1034, 237-242. 2004.
- [27] Majdeddine Larbi, Khenfer BenHaoua, Etude de l'activité antifongique des huiles essentielles d'*Eucalyptus globulus* et *Thymus algeriensis* contre quelques champignons phytopathogènes des palmes du palmier dattier (*Phoenix dactylifera*L). 06/2015.
- [28] Kesbi Amrane. étude des propriétés physicochimique et évaluation l'activité biologique des huiles essentielles d'*eucalyptus globulus* dans la région de ouargla. 06/2011.
- [29] Jacqueline smadja. les huiles essentielles. colloque GP3A- Tananarive.2009.
- [30] Gwenola Burgot, Jean-Louis Burgot, Méthodes instrumentales d'analyse chimique et applications, 2011.
- [31] Guba R. Toxicity myths-essential oils and their carcinogenic potential International Journal of Aromatherapy, 11, 76-83. 2001.
- [32] Pierrick Horde. *Eucalyptus* - Indications, posologie et effets secondaires. Juin 2014.
- [33] Pr. Dr. M. j Bigendako. Identification et zonage des *Eucalyptus Globulus* au Rwanda.p1, chemonics, international Inc . projet Adar, Aout 2004.
- [34] Adda Abdelwahab, Les forêts d'*Eucalyptus* de Hadjadj menacées par un insecte ravageur, Mercredi 4 Janvier 2012.
- [35] Sandrine Warot Préparatrice en pharmacie .Mémoire de fin de formation en Phyto-aromathérapie .Avril 2006.
- [36] Belkou h, beyoud f.et taleb ahmed z. Approche de la composition biochimique dela menthe vert (*Menthe spicata* L) dans la région de ouargla, P2-61. 2005.
- [37] Ghedira k ; Goetz p; le jeune r. Phytothérapie anti-infectieuse , springer-verlag France. paris. p 272. 2012.

- [38] Ghedira K; Goetz P; Jeune R. *Eucalyptus Globulus Labill.* Phytothérapie .6: 197-20.. 2008.
- [39] Bruneton, J., *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*, 4^e éd., revue et augmentée, Paris, Tec & Doc - Éditions médicales internationales,. 1288 p. 2009.
- [40] S. Djemai Zoughlache, Etude de l'activité biologique des extraits du fruit de *Zizyphus lotus* L, 2008.
- [41] M. M. R. Kansole, Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkinafaso : cas de *Leucas Martinicensis* (Jacquin) R. Brown, *hoslundia oppositavahl* et *orthosiphon pallidus* Royle ex Benth. 2008.
- [42] Karamali Khanbabaee, Teunis van Ree, « *Tannins : classification and definition* », *Nat. Prod. Rep.*, vol. 18, p. 641-649. 2001.
- [43] Etude chimiotaxonomique des huiles essentielles de neuf espèces d'*eucalyptus* poussant en algérie. Distribution énantiomérique de linqmonoterpenes par chromatographie multidimensionnelle, Foudil-Cherif, Yazid, Date: 2005.
- [44] Dacosta Y. Les phytonutriments bioactifs : 669 références bibliographiques. Ed. Yves Dacosta, Paris, p. 317. 2003.
- [45] K. Bouhadjra, étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, 2011.
- [46] Bouras Fatima Zohra , HOUCHI Abdelbasset, Etude de l'activité antioxydante de la plantes *rumex vesicarius* I, 06/2013.
- [47] Blot W., Li JY, Taylor P. et al., « Nutrition intervention trials in Linxian, China : supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease – specific mortality in the general population. », *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 85, p. 1483-1491. 1993.
- [48] Z.Hellal. Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des *Citrus*. Application sur la sardine (*Sardina pilchardus*). 2011.
- [49] Clevenger J.F., Apparatus for the determination of volatile oil, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 17, 341-346. 1928.
- [50] Fellah Aicha, Mouaici Noura, Etude de l'extraction et de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits de la verveine "*Lippiacitriodora*", 2015.
- [51] Belyagoubi- Larbi.M ; « Effet de quelques essences végétale sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales ». 2006.
- [52] Mohamed, N., boukhatem, mohand,S.H, Fairoua, S. et Yahia, H ; « Extraction, composition et propriétés physico-chimiques de l'huile essentielle du Géranium Rosat (*Pelargonium graveolens* L.) cultivé dans la plaine de Mitidja (Algérie) ». 2010.
- [53] Bentchicou. A ; « Extraction, caractérisation et analyse de l'huile essentielle de thym d'Algérie par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ». 1999.
- [54] Hameurlaine.S ; « Mise en évidence des huiles essentielles contenues dans les plantes *pituranthoss coparius* et *rhantherium adpressum* de la région de Ghardaia ». 2009.

- [55] El abed. D et Kambouche. N ; « Les huiles essentielles » ; Edition Dar El Gharb ; Oran ;2003.
- [56] Melet.I et Benchabane.N ; « Contribution a l'extraction et l'étude de l'huile essentielle d'eucalyptus » ; thèse d'ingénieur d'état ; université de Médéa ; 1997.
- [57] Chen C.N., Weng M. S., WU C. L., and LIN J. K., Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in human melanoma cells by taiwane sepropolis from different sources, Evid. Based Complement Alternat. Med. J1. 175-185. 2004.
- [58] Leitao G.G., Leitao S.G., and Vilagag W., Quick preparative separation of natural Naphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. Z. Naturforsch.J. 57, 1051-1055. 2002.
- [59] Zenini.M; ; «Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne des huiles essentielles de trois espèces de menthe: *Menthaspicata* ,*Mentharotundifolia* et *Menthapulegium*», 2012.
- [60] Gulcin.I et Mshvildadze.V et Gepdiremen.A, « Antioxydant activity of a triterpenoid glycosideisolated from the berries of *Hederacolchica* : 3-O-(b-D-glucopyranosyl)- hederagenin »; *Phytother ; Rev* 20; pp 130-134. 2006.
- [61] Michelline.M et Kansole.R; ; « Etude ethnobotanique phytochimique et activités biologiques de quelques lamiaceae du Burkina Faso »; mémoire de magister en biologie ;université de Ouagadougou ; 2009.
- [62] JM. M. Ghaisas, V. V. Navghare*, A. R. Takawale, V. S. Zope, A. D. Deshpande.in-vitro antioxidant activity of tectonagrandislinn.296-305. 2008.
- [63] Mme Taleb-Toudert Karima. Extraction et caractérisation des huiles essentielles de dix plantes aromatiques provenant de la région de Kabylie (Nord Algérien). Evaluation de leurs effets sur la bruche du niébé *Callosobruchus maculatus* (*Coleoptera : Bruchidae*). 03/2015.