

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

***Caractérisation physicochimique et évaluation de l'activité
biologique de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus***

Présenté par :

M^{elle} KESSI Nawel

M^{elle} MESSAOUDENE Ouerdia

Le 27/10/2021 devant le Jury composé de :

M^r BENCHOUAK Mounir	MAA	UMMTO	Président
M^{me} HATEM Rokia	MAA	UMMTO	Examinatrice
M^{me} IBOUKHOULEF Hamida	MCA	UMMTO	Promotrice

Année universitaire : 2020/2021

Remerciements

Avant tout, nous tenons à remercier Dieu le tout puissant pour nous avoir donné la force, la volonté, la patience et le courage nécessaire pour réaliser ce travail.

Nos remerciements vont :

A notre promotrice Madame **IBOUKHOULEF Hamida**, Maitre de conférences classe A à l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.

A Monsieur **BENCHOULAK Mounir**, Maitre-assistant classe A à l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, qui nous a fait le grand honneur de présider ce jury de soutenance.

A Madame **HATEM Rokia**, Maitre-assistant classe A à l'Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou, qui nous a fait l'honneur de juger ce travail.

A Monsieur **AIDI Nouredine**, ingénieur en chimie et formateur au sein de laboratoire VieBio, pour ses conseils et sa confiance, qui nous a permis d'effectuer l'extraction dans les meilleures conditions possibles.

Dans l'impossibilité de citer tous les noms, nos sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents qui m'ont soutenu tout au long de mes études.

A ma sœur Samia et mon frère Samy.

A ma sœur Fahima et son mari Soufyane.

A ma nièce.

A Ouerdia chère amie avant d'être binôme et toute sa famille.

A toute ma famille et mes amis en particulier Malika et Sissa.

Spéciale dédicace a mon fiancé Ghyles pour son soutien, sa patience et ses encouragements.

A tous ceux que j'ai connus qui m'ont aidé et soutenus.

Nawel.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mes parents,

A mes frères : Brahim, Hakim, Yahia, Hocine et Ahcène,

A mes sœurs : Linda, Hassiba et Sadia.

A mon neveu Yacine

A mes nièces : Yasmine, Sedra et Melissa.

A tout mes amis en particulier Ghyles, Malika et Sissa.

Une spéciale dédicace à ma meilleure amie et binôme Nawel ainsi que toute sa famille.

Ouerdia.

Sommaire

Liste des abréviations et symbole

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : Partie Bibliographique	
I. Généralité sur les huiles essentielles	2
I.1. Définition	2
I.1.1 Aromathérapie.....	2
I.1.2 Huile essentielle	2
I.1.3 Plante aromatique.....	2
I.2. Répartition et localisation d'une huile essentielle dans la plante	2
I.3. Propriétés physicochimique des huiles essentielles	3
I.4. Composition chimique	4
I.4.1. Terpenoides.....	4
I.4.2. Les composés aromatiques	5
I.5. Méthodes d'extraction des huiles essentielles	5
I.5.1. L'hydrodistillation	5
I.5.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	6
I.5.3. Extraction par solvants organiques	6
I.5.4. Expression à froid	6
I.5.5. Enfleurage	6
I.5.6. Extraction par le CO ₂ super critique	7

I.5.7. Extraction assisté par micro-onde	7
I.6. Caractérisation de l'huile essentielle	7
I.6.1. Caractérisation organoleptique	8
I.6.2. Caractérisation physico-chimiques	8
I.6.3. Identification chimique	9
I.6.3.1. Méthodes chromatographiques	9
I.6.3.2. Spectroscopie infrarouge	11
I.7. Activité biologique des huiles essentielles	11
I.8. Domaines d'application des huiles essentielles	13
I.9. Conservation des huiles essentielles	14
II. Eucalyptus globulus.....	14
II.1. Présentation du genre eucalyptus	14
II.2. Origine et histoire d'eucalyptus globulus.....	15
II.3. Description botanique d'eucalyptus globulus.....	15
II.4. La systématique botanique	16
II.5. Composition chimique de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus.....	17
II.6. Propriétés pharmacologiques de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus.....	18
II.6.1. Expectorante et mucolytique	18
II.6.2. Antibactérienne et cicatrisante.....	19
II.6.3. Insecticide	19
II.6.4. Antivirale	19
II.6.5. Anti-inflammatoire	20
II.6.6. Antioxydant	20

II.7. Utilisation de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus	20
II.8. Toxicité et précaution d'utilisation de l'HE d'Eucalyptus globulus	21
Chapitre II : Matériels et méthodes	
I. Introduction	23
II. Récolte de l'échantillon	24
III. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau	24
III.1. Principes	24
III.2. Mode opératoire	26
III.3. Détermination du rendement de l'extraction	26
IV. Analyse de l'huile extraite	27
IV.1. Caractérisation organoleptique	27
IV.2. Analyse physicochimique	27
IV.2.1. Potentiel hydrogène	27
IV.2.2. La densité relative	27
IV.2.3. Indice de réfraction	28
IV.2.4. Indice d'acide	28
IV.2.5. Indice de saponification	29
IV.3. Analyse chromatographique sur couche mince CCM.....	30
IV.4. Analyse spectrométrie infrarouge de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus	32
V. Etude de l'activité antibactérienne de l'HE d'E.globulus	32
V.1. Souches bactériennes utilisées.....	33
V.2. Méthode de diffusion sur milieu gélosé (méthode des disques)	33
VI. Etude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle.....	37

Chapitre III : résultats et discussions

I. Rendement de l'extraction	39
II. Caractéristiques organoleptiques	39
III. Analyses physicochimiques	40
IV. Analyses chromatographiques	41
V. Analyse par spectroscopie infrarouge	43
VI. Activité antibactérienne	44
VII. Evaluation de l'activité antioxydante	47
Conclusion.....	50

Bibliographie

Glossaire

Résumé

Liste des abréviations et symbole :

AFNOR : Association Française de normalisation.

C : Concentration.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CPG/SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

CHU : Centre Hospitalier Universitaire.

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse.

CO₂ : Dioxyde de carbone.

D : Diamètre.

DPPH : Le diphényle picryl-hydrazyle.

E. coli : Escherichia coli.

E. globulus : Eucalyptus globulus.

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

g : Gramme.

Kg : kilogramme.

KOH : Hydroxyde de potassium.

KMnO₄ : Permanganate de potassium.

h : Heure.

H.E : Huile essentielle.

I_A : Indice d'acide.

I_s : Indice de saponification.

IR : Infrarouge.

I% : Pourcentage d'inhibition.

m : Masse.

mm : Millimètre.

mg : Milligramme.

N : Naturel.

M-H : Mueller Hinton.

P.aeruginosa : Pseudomonas aeruginosa.

pH : Potentiel hydrogène.

R_F : Rapport frontal.

R_{HE} : Rendement en huile essentielle.

S.aureus : Staphylococcus aureus.

S.pneumonea : Streptococcus pneumoneae.

UMMTO : Université Mouloud Mammeri Tizi-ouzou.

V : Volume.

°C : Degré Celsius.

Liste des figures

Figure 1 : Exemples de composés monoterpènes	4
Figure 2 : Exemples de composés sesquiterpènes.....	5
Figure 3 : Exemples de composés aromatiques	5
Figure 4 : Gravure d'eucalyptus globulus.....	16
Figure 5 : 1,8 cinéole (eucalyptol)	18
Figure 6 : Schéma général de la procédure expérimentale	23
Figure 7 : Photographie d'identification botanique des feuilles d'eucalyptus globulus	24
Figure 8 : Montage de distillation par entraînement à la vapeur d'eau	25
Figure 9 : La plaque CCM dans la phase mobile	31
Figure 10 : Spectromètre infrarouge à transformée de fourrier FTIR.....	32
Figure 11 : Disques en papier Wattman	35
Figure 12 : L'autoclave.....	35
Figure 13 : Densimètre.....	35
Figure 14 : L'ensemencement des souches microbiennes	36
Figure 15 : Photographie de l'huile essentielle extraite.....	39
Figure 16 : La plaque CCMaprès la révélation chimique	42
Figure 17 : Spectre IRTF de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus	43
Figure 18 : Effet antibactérien de l'HE d'E.globulus sur les souches staphylococcus aureus(a), escherichia coli(b), pseudomonasaeruginosa(c) et streptococcus pneumonea(d)	44
Figure 19 : Effet antibactérien des différentes dilutions de l'HE d'E.globulus sur les souches staphylococcus aureus(e), escherichia coli(f), pseudomonasaeruginosa(g) et streptococcus pneumonea(h).....	46

Figure 20 : Photographie montrant la réduction de la solution de DPPH..... **48**

Figure 21 : Activité antiradicalaire de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus..... **48**

Liste des tableaux

Tableau I : organes producteurs des huiles essentielles dans certaines plantes.....	3
Tableau II : Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles.....	12
Tableau III : Composition de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus selon la pharmacopée européenne	17
Tableau IV : Souches bactériennes utilisées pour les tests.....	33
Tableau V : Caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus ...	40
Tableau VI : Tableau récapitulatif des caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus.....	40
Tableau VII : Résumé des résultats de la CCM	42
Tableau VIII : Résultat d'analyse IR de l'HE d'E.globulus	44
Tableau IX : Résultat de l'aromatogramme de l'HE pure	45
Tableau X : Résultats de l'aromatogramme pour les dilutions de l'HE	47

Introduction

L'utilisation thérapeutique des plantes et leurs vertus remonte à l'antiquité et évolue à travers les civilisations. En effet, l'homme a toujours su se soigner et soulager ses douleurs en exploitant les plantes et leurs extraits.

Les plantes aromatiques sont considérées comme étant un réservoir inépuisable de composés bioactifs du fait de leurs richesses en huiles essentielles. Très vite, ces composés ont intéressé les diverses industries, tel que les cosmétiques, la parfumerie, la pharmacie et l'agroalimentaire. Ainsi, plusieurs techniques ont été mises au point pour l'isolement de ces constituants selon des caractéristiques de la plante.

L'augmentation de la fréquence des infections microbiennes au cours des dernières années ainsi que l'émergence des résistances aux antibiotiques, a provoqué une certaine méfiance des patients vis-à-vis des médicaments de synthèse. Par conséquent, la recherche des principes actifs potentiels des plantes est plus que jamais d'actualité.

Il nous semble donc intéressant d'inscrire notre travail dans ce contexte de recherche. Ce travail porte sur l'étude d'une huile essentielle issue d'une plante appartenant à la famille des Myrtacées : *eucalyptus globulus*. Ce choix s'est basé sur sa disponibilité et son usage thérapeutique. En effet, l'eucalyptus globulus est connu pour ses vertus expectorantes et antiseptiques des voies pulmonaires. Nos ancêtres ont toujours utilisé cette plante en infusion ou par inhalation pour lutter contre les maux hivernaux. Aujourd'hui encore, on se tourne vers cette plante avec un intérêt croissant, principalement pour son action sur le système respiratoire et surtout après l'apparition de la pandémie covid 19.

Notre manuscrit sera donc scindé en deux parties :

- Une recherche bibliographique consacrée à l'étude des huiles essentielles d'une manière générale et une description de la plante *Eucalyptus globulus*.

- La partie pratique, quant à elle, comprend l'extraction de l'huile essentielle de la plante choisie, la détermination de ses propriétés physico-chimiques, l'analyse chromatographique et spectroscopique de l'essence extraite ainsi que l'étude de son activité biologique.

Enfin, une conclusion générale résumant l'ensemble des résultats obtenus et dégageant les principales perspectives.

Chapitre I

Aperçu bibliographique

I. Généralités sur les huiles essentielles

I.1. Définitions

I.1.1. Aromathérapie

L'aromathérapie vient du grec aroma, qui signifie odeur, et de therapia qui signifie soin. Il s'agit donc d'une méthode de soin naturel par les odeurs.

L'Aromathérapie se définit littéralement comme la partie de la phytothérapie qui utilise les huiles essentielles dans le domaine médicale. (Fabre, 2017)

I.1.2. Huile essentielle (HE)

Selon la commission de la Pharmacopée Européenne (2008), une HE est défini comme suit : « produit odorant, généralement de composition complexe, obtenu à partir d'une matière première végétale botaniquement définie, soit par entrainement à la vapeur d'eau, soit par distillation sèche, soit par un procédé mécanique approprié sans chauffage. Une huile essentielle est le plus souvent séparée de la phase aqueuse par un procédé physique n'entraînant pas de changement significatif de sa composition. » (Pharmacopée Européenne, 2008).

I.1.3. Plantes aromatiques

Les plantes aromatiques sont, par définition, des plantes dont les tissus sécrètent suffisamment d'essence pour que celle-ci puisse être extraite. Elles contiennent les molécules aromatiques ou odorantes dans un ou plusieurs de ses organes producteur : feuilles, fleurs, fruits, écorces, graines... (Elkacimi, 2020)

I.2. Répartition et localisation d'une huile essentielle dans la plante

Les huiles essentielles sont produites par des cellules végétales spécialisées et peuvent être stockées dans tous les organes végétaux, variant en fonction de la zone productrice du végétal (tableau I). (Laurant, 2017)

Tableau I : Organes de certaines plantes riches en huiles essentielles

Organe	Exemples
Les feuilles	Eucalyptus, citronnelle, laurier noble...
Les fleurs	Camomille, lavande ...
Les zestes	Citron, orange, bergamote...
Le bois	Bois de rose, santal ...
L'écorce	Cannelle ...
La racine	Vétiver ...
Les fruits	Anis, badiane ...
Les rhizomes	Curcuma, gingembre ...
Les graines	Muscade ...

I.3. Propriétés physicochimiques des huiles essentielles

Les HEs sont habituellement liquides à température ambiante et volatiles. Leur densité est en grande majorité inférieure à celle de l'eau. Pour autant quelques huiles essentielles font exception à cette règle, c'est le cas du saffran, du girofle et de la cannelle.

Elles sont huileuses, mais non grasses et s'évaporent facilement. Chaque huile essentielle est unique et se caractérise par une odeur, une couleur, une viscosité et des propriétés spécifiques. Elles ont un indice de réfraction élevé et la plupart dévient la lumière polarisée.

Elles sont solubles dans l'alcool et dans tout type de corps gras (liposolubles). Les huiles essentielles sont entraînaées à la vapeur d'eau, mais très peu solubles dans l'eau. Pour autant, une fraction des composants des HE se solubilisent dans l'eau ce qui permet d'obtenir « les eaux florales » ou « eaux distillées végétales ». (Bruneton, 1999)

I.4. Composition chimique

Les huiles essentielles sont des mélanges complexes, constitués principalement de deux groupes de composés. Il s'agit des terpénoïdes (monoterpène et sesquiterpènes) et des composés aromatiques. (Cohen, 2013)

I.4.1. Les terpénoïdes

Les terpènes sont une classe d'hydrocarbures, dont le nom se termine par « -ène ». Ce sont des dérivés de l'isoprène C_5H_8 et ont pour formule de base des multiples de celle-ci. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des cycles. Les terpènes sont les moins volatils, c'est-à-dire ceux de masse moléculaire peu élevée.

I.4.1.1. les monoterpènes

Les monoterpènes sont presque toujours présents dans les huiles essentielles. Ils constituent parfois plus de 90% de l'huile essentielle. Ils comportent deux unités isoprène, c'est-à-dire dix atomes de carbone et ils peuvent être acycliques, monocycliques ou bicycliques.

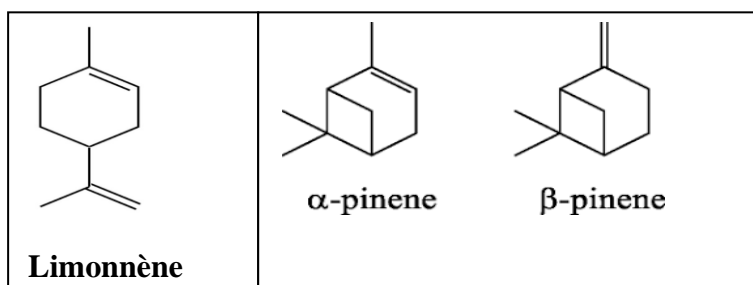


Figure 1 : Exemples de monoterpènes

I.4.1.2. Les sesquiterpènes

Les sesquiterpènes sont des dérivés hydrocarbures comportant trois unités isoprène avec quinze atomes de carbone. Ils ont une variabilité structurale de même nature que les monoterpènes. L'allongement de la chaîne avant cyclisation lors de leur synthèse augmente le nombre de cyclisations possibles, d'où la très grande variété de structures connues. (Ouis, 2015)

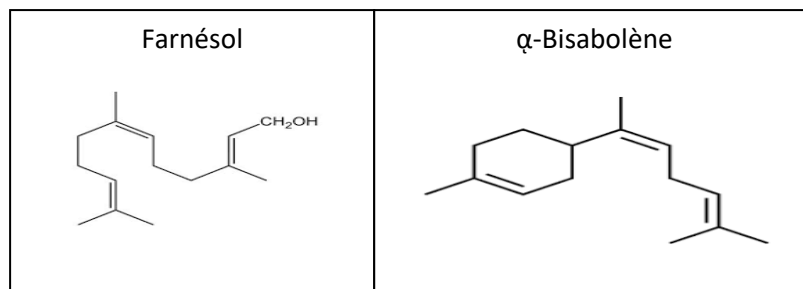


Figure 2 : Exemples de sesquiterpènes

I.4.2. Les composés aromatiques

Ce sont des dérivés du phénylpropane avec une formule générale $(C_5H_8)_n$. Ces composés sont réputés pour avoir une certaine importance pour les propriétés organoleptiques de l'HE mais également pour son usage thérapeutique. Cette classe comporte des composés odorants bien connus comme la vanilline, l'eugénol, l'anéthole, l'estragole et bien d'autres. (El-Haib, 2011) (Ouis, 2015)

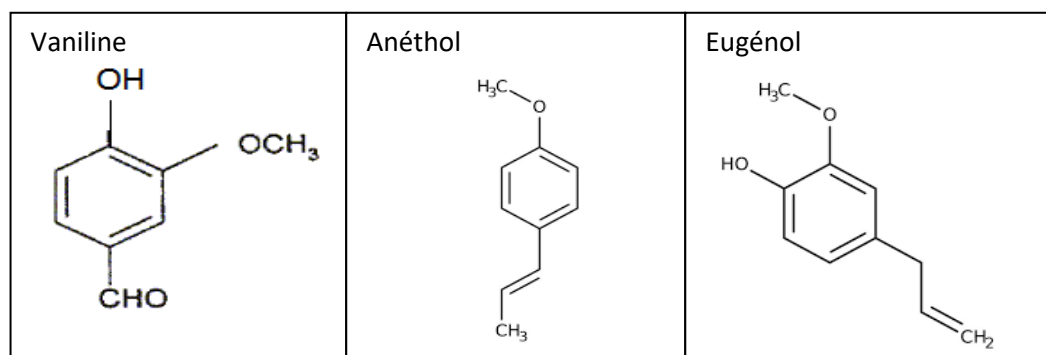


Figure 3 : Exemples de composés aromatiques (Deschepper, 2017)

I.5. Méthodes d'extraction

Les techniques d'obtention des HE sont différentes selon la matière première, la qualité souhaitée et l'emploi destiné.

I.5.1. L'hydrodistillation

C'est la méthode la plus ancienne. Elle consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau et l'ensemble est porté à ébullition. Elle est généralement conduite à pression

atmosphérique. Lorsque les vapeurs sont condensées, l'eau et l'huile essentielle se séparent par différence de densité. L'eau résiduelle est parfois commercialisée sous l'appellation (eau forale, hydrosol ou hydrolat), c'est le cas de l'eau de rose. (Deschepper, 2017)

I.5.2. Extraction par entrainement à la vapeur d'eau

C'est la méthode la plus couramment utilisée pour la fabrication des HEs. Elle consiste à faire passer de la vapeur d'eau à travers la matière végétale placée dans l'alambic. La vapeur provoque l'ouverture des cavités des plantes qui libèrent ainsi les molécules des huiles volatiles. La température doit être ajustée et contrôlée pour ne pas brûler l'élément végétal ou dénaturer l'huile essentielle. La vapeur qui contient cette huile est dirigée à travers un système de refroidissement (serpentin) ou elle se liquéfie. (Deschepper, 2017)

I.5.3. Extraction par solvants organiques

Les solvants tels que l'éther de pétrole, le méthanol, l'éthanol ou l'hexane sont utilisés pour extraire l'HE qui ne supporte pas la chaleur. L'extraction consiste à dissoudre la partie odorante de la plante dans un solvant que l'on fait ensuite évaporer. Cette méthode est utilisée pour les plantes dont les substances aromatiques risqueraient d'être dégradées par la distillation. (Boukhatem et al., 2019)

I.5.4. Expression à froid

L'expression à froid correspond au troisième procédé d'extraction décrit par la pharmacopée européenne comme un « procédé mécanique sans chauffage ». Elle ne concerne que la production des huiles essentielles à partir de fruits frais du genre Citrus. Elle consiste à rompre ou dilacérer les parois des sacs oléifères situés juste sous l'écorce du fruit, l'épicarpe, pour en recueillir le contenu qui n'a subi aucune modification. C'est la méthode de production la plus simple. (Boukhatem et al., 2019)

I.5.5. Enfleurage

L'enfleurage est une méthode longue et complexe, réservée aux organes fragiles. Elle utilise une matière grasse végétale ou animale purifiée sur laquelle est placé un lit de pétales de fleurs. Les substances volatiles diffusent et sont absorbées par la couche de graisse.

Ensuite, ces graisses sont épuisées à l'alcool, on évapore l'alcool et on obtient ainsi une pommade florale. (Bousbia et al, 2011)

I.5.6. L'extraction par le CO₂ supercritique

C'est une des méthodes les plus récentes. L'extraction avec le CO₂ supercritique consiste à envoyer dans une enceinte fermée contenant les plantes un courant de CO₂, qui, par augmentation de pression, fait éclater les poches à essence et entraîne les substances aromatiques. (Herzi, 2013)

I.5.7. Extraction assistées par micro-ondes

Elle consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur au sein d'un four micro-ondes sans ajout d'eau ou de solvant. Les molécules volatiles sont entraînées par la vapeur d'eau formée à partir de l'eau contenue dans le végétal. La vapeur est ensuite récupérée et traitée de la même façon que dans les méthodes traditionnelles. Il s'agit d'une distillation par micro-ondes, sous vide. (Boukhatem, 2019)

I.6. Caractérisation de l'huile essentielle

L'utilisation des huiles essentielles dans divers domaines (pharmacie, cosmétique, parfumerie...) suscite l'intérêt de vérifier la qualité de ces dernières. La caractérisation d'une essence consiste à :

- Vérifier les caractéristiques organoleptiques,
- Déterminer les indices physico-chimiques,
- Obtenir son profil chimique (composition chimique) et faire une quantification relative des différents constituants de cette essence.

I.6.1. Caractérisation organoleptique

Les tests organoleptiques permettent d'apprécier l'aspect, la couleur et l'odeur de l'HE.

Chaque huile possède des caractéristiques organoleptiques typiques. Elles sont entre autres définies par des organismes comme l'AFNOR, l'ISO ou la Pharmacopée Européenne.

I.6.2. Caractérisation physico-chimique

Les caractéristiques physico-chimiques propres à l'HE, participeront à l'évaluation première de sa bonne qualité.

I.6.2.1. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH mesure l'activité chimique des ions hydrogènes H^+ (appelés aussi protons) en solution. Le pH mesure l'acidité ou la basicité d'une solution. Il s'agit d'un coefficient permettant de savoir si une solution est acide, basique ou neutre. (AFNOR, 2000)

I.6.2.2. Densité

La densité ou la masse volumique est une grandeur physique qui caractérise la masse d'un matériau par unité de volume. Elle est déterminée par le rapport du poids d'un certain volume d'un corps et le poids du même volume d'eau. (AFNOR, 2000)

I.6.2.3. Indice de réfraction

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

L'indice de réfraction d'une huile essentielle est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée, passant de l'air dans l'huile essentielle maintenue à une température constante. (AFNOR, 2000).

I.6.2.4. Indice d'acide

C'est le nombre de milligrammes de KOH nécessaire pour la neutralisation des acides libres contenus dans 1 g d'huile essentielle.

La teneur en acides libres des corps gras augmente avec le temps, l'indice d'acide permet donc de juger de l'état de détérioration d'une huile essentielle. (Novidzro et al.,2019)

I.6.2.5. Indice de saponification

L'indice de saponification se définit comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour saponifier un gramme de matière grasse. (AFNOR, 2000).

I.6.3. Identification chimique

L'identification chimique fait appelle aux techniques d'analyses qui permettent de qualifier et quantifier chaque molécule volatile présente dans une huile essentielle.

I.6.3.1. Méthodes chromatographiques

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique utilisée pour la séparation, l'analyse qualitative et quantitative des constituants des mélanges homogènes liquides ou gazeux par entrainement au moyen d'une phase mobile (liquide, gaz) le long d'une phase stationnaire (solide, liquide).

Le principe est basé sur les différences d'affinités des constituants à l'égard des deux phases.

Différentes méthodes chromatographiques sont mises en œuvre pour étudier la composition chimique des huiles essentielles, à savoir, la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie en phase gazeuse (CPG) et la chromatographie en phase gazeuse couplée a la spectroscopie de masse (CPG/SM).

a) Chromatographie sur couche mince

La CCM est une chromatographie planaire qui repose sur le phénomène d'adsorption. Son principe est très simple. La phase stationnaire est constituée d'un matériel absorbant (gel silice, gel de cellulose) étalé sur une plaque de verre, d'aluminium ou support plastique. La phase mobile liquide, nommée éluant, est un solvant ou mélange de solvants. Une petite quantité du mélange à séparer est déposée sur la phase stationnaire. Cette dernière est mise en contact avec la phase mobile. La séparation des constituants du mélange à analyser s'effectue grâce à l'ascension de la phase mobile le long de la phase stationnaire.

La révélation des molécules est soit par exposition de la plaque sous une lampe UV ou par pulvérisation de divers révélateurs. (Rouessac, 2004).

La formule du rapport frontal est donnée par l'équation :

$$R_F = \frac{d_p}{d_s}$$

Avec :

d_p : distance parcourus par le produit.

d_s : distance parcourus par l'éluant.

b) Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique de chimie analytique qui permet de séparer des composés volatils ou volatilissables sans dégradation thermique. La CPG est une technique très répandue dans l'analyse des huiles essentielles car elle permet l'individualisation des constituants à partir d'échantillon de l'ordre du milligramme voire du microgramme. (Paoulini, 2005)

Cette méthode repose sur le principe de la chromatographie de partage, la phase stationnaire est un liquide non volatile sur un support inerte, la phase mobile est constituée d'un gaz inerte (par exemple H₂, N₂, He, Ar...). La séparation se fait en fonction de l'affinité des composés volatils pour chacune des deux phases. (Deschepper, 2017)

c) Analyse par couplage CPG/SM

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM) est la méthode la plus utilisée dans le domaine des huiles essentielles en raison de sa sensibilité et sa performance d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. (Lucaccioni E et al., 1993).

La méthode est basée sur la séparation des constituants à l'aide de la CPG et leur identification par le biais de la SM.

La combinaison de ces deux techniques d'analyses CPG/SM permet de séparer les composants de l'échantillon et d'identifier chaque composant, donc de faire une analyse complète aussi bien qualitative que quantitative du produit à analyser.

I.6.3.2. Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge est considérée comme étant la technique la plus puissante, rapide, non destructive qui peut être appliquée pour déterminer la structure chimique et le type de liaisons chimiques présentes dans les composés. Le spectre est constitué de bandes d'absorption caractéristiques des liaisons chimiques. (Sharma et al., 2021)

I.7. Activité biologiques des huiles essentielles

Les huiles essentielles possèdent de nombreuses propriétés biologiques et thérapeutiques.

En effet, une huile essentielle ne se limite pas à une seule propriété, elle peut être utilisée pour différentes thérapies. Le tableau II ci dessous résume les principales propriétés des HEs.

Tableau II : Propriétés thérapeutiques des huiles essentielles. (Laurant, 2017)

Activité thérapeutique	Groupes chimiques	Plantes aromatiques
Activité antibactérienne et antifongique	Les aldéhydes aromatiques : cinnamaldéhyde, cuminaldéhyde.	Cannelle.
	Les phénols monoterpéniques et aromatiques : carvanole, thymol, eugénol.	Origan, sarriette, thym, girofle.
	Les alcools et aldehydes monoterpéniques : géraniol, linalol, citronnellol, menthol, citral.	Menthe, lavande, eucalyptus.
Activité antivirale	Phénols et alcools monoterpéniques.	Cannelle, bois de Ho, eucalyptus.
Activité anti-inflammatoire	Les aldéhydes monoterpéniques : citrals (néral et gèranial), citronnellal, curminal.	Gingembre, gèranium.
Expectorante	1,8 cinéole.	Eucalyptus globulus, romarin.
Activité antalgique et analgésique	Eugénol, menthol, le camphre.	Girofle, menthe, romarin.
Activité spasmolytique	Les esters et les éthers : acétate de linalyle, méthyleugénol.	L'angélique, le basilic, lavande.
	Les alcools monoterpéniques et aromatiques : linalol, gèranol, alpha-terpinéol.	La mélisse, la menthe poivrée.
	Les phénols monoterpéniques et aromatiques : thymol, carvacrol, eugénol.	La mélisse, la menthe.
Activité calmante et relaxante	Les aldéhydes et les alcools monoterpéniques : citrals, curminal, linalol.	Verveine, mélisse, graines de cumin.
	Les alcools monoterpéniques : linalol.	Lavande.
Digestive	Cuminal.	Cumin, anis étoilé

I.8. Domaine d'application des huiles essentielles

Actuellement, les huiles trouvent leurs utilisations dans différents secteurs, trois principaux secteurs peuvent être retenus :

La médecine et l'industrie pharmaceutique : utilisant les HEs en raison de leurs diverses propriétés. En effet, les HEs peuvent jouer le rôle d'antibiotique, d'anti-inflammatoire, d'antiviral, de fongicide, de cicatrisant, de digestif, de sédatif...

Les huiles essentielles peuvent être utilisées directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de principes actifs. (Bessah R et al., 2015)

L'activité antioxydante des huiles essentielles est exploitée dans la lutte contre le stress oxydatif, qui est défini comme un déséquilibre entre la production excessive de molécules oxydantes et/ou une diminution du taux d'antioxydants dans l'organisme.

Les huiles essentielles sont également utilisées en milieu clinique pour soigner des maladies inflammatoires. Elles bloquent la formation et/ou la sécrétion des médiateurs de l'inflammation comme l'histamine, les cytokines, les prostaglandines, l'oxyde d'azote et les radicaux libres produits par les neutrophiles. Les huiles essentielles présentent également, des propriétés cytotoxiques et elles sont utilisées dans le traitement préventif de certains types de cancers.

L'industrie agroalimentaire : les HEs sont utilisées comme aromates ou épices notamment dans la confiserie, les sirops et les biscuiteries (Djibo, 2000). Récemment, elles sont utilisées comme conservateur et ceci grâce à leur activité antioxydante et antimicrobienne. Ces agents naturels viennent réduire ou remplacer les agents de conservation chimiques ou synthétiques qui sont suspectés à long terme d'effets mutagènes et cancérigènes.

Les huiles essentielles présentent des activités insecticides. Elles sont aussi utilisées dans la lutte biologique contre les ravageurs. En effet, ces bio-pesticides présentent un réel avantage par rapport aux produits phytosanitaires qui comportent des risques pour la santé humaine et pour l'environnement. (Bessah R et al., 2015)

Parfumerie et cosmétologie : constitue le plus gros consommateur d'huiles essentielles. Il représente 60 % de la demande totale en substances naturelles, selon le National Research Development Corporation (NRDC) (R.Bessah, 2015). Elles sont appréciées pour leurs propriétés odorantes et antiseptiques. Aujourd'hui on les trouve dans les savons, les détergents, les crèmes, les dentifrices...etc. Les plus utilisées sont les huiles essentielles de lavande, de citron et de citronnelle. (Kaloustian, 2012).

I.9. Conservation de l'huile essentielle

Après son extraction, l'HE est conditionnée et conservée dans des conditions limitant son altération, c'est-à-dire à l'abri de la chaleur et de la lumière. Les huiles essentielles de bonne qualité peuvent se conserver plusieurs années sous certaines conditions, jusque cinq ans. Seules les essences de citrus se gardent un peu moins longtemps (trois ans). Les huiles essentielles sont volatiles, il ne faut donc pas oublier de bien fermer les flacons. Il est préférable de les conserver dans un flacon en aluminium ou en verre teinté hermétiquement fermé et de les garder à l'abri de la lumière à une température qui ne dépasse pas les vingt degrés. Il existe des normes spécifiques sur l'emballage, le conditionnement et le stockage des huiles essentielles (norme AFNOR NF T 75-001, 1996) ainsi que sur le marquage des récipients contenant des huiles essentielles (norme NF 75-002, 1996). (Pierron, 2014).

II. Eucalyptus globulus

II.1. Présentation du genre EUCALYPTUS

Les Eucalyptus sont, pour la plupart, de très grands arbres qui font partie de la famille des Myrtacées. On dénombre aujourd'hui plus de 500 espèces différentes d'Eucalyptus. Ils sont originaires d'Australie mais on en retrouve également dans les régions subtropicales d'Asie et du bassin méditerranéen, où ils ont appris à s'acclimater. Possédant une exceptionnelle capacité d'absorber l'eau du sol sur lequel il croît et assèche rapidement les marais qu'il colonise. Il élimine ainsi les milieux de reproduction des insectes qui transmettent la malaria, d'où le nom « arbre de la fièvre » ou en australien « fever tree ». (Coppen, 2002)

II.2. Origine et histoire d'eucalyptus globulus

L'Eucalyptus globulus, appelé aussi Gommier bleu de Tasmanie, a été découvert en 1792 par le botaniste français Labillardière. C'est un arbre originaire de Tasmanie (Australie). Le docteur Muller (1825-1896), directeur du jardin botanique de Melbourne, a été le premier à le décrire dans son ouvrage *Fragmenta phytographiæ australiæ*. Aujourd'hui, l'Eucalyptus globulus est cultivé dans le bassin méditerranéen et en Chine où il est utilisé pour fabriquer de la pâte à papier. (Lobstein et al., 2018)

II.3. Description botanique d'eucalyptus globulus

L'eucalyptus globulus appartient à la famille des Myrtacées. C'est un arbre qui pousse très rapidement. A l'âge adulte, il mesure 30 à 60 mètres de haut et il peut atteindre jusqu'à 100 mètres dans les climats qui lui sont plus favorable. Son tronc est lisse et sa couleur varie du blanc au gris. Son écorce se détache facilement en longues bandes.

Les jeunes feuilles sont cireuses, ovales, claires, opposées et sessiles. Mais ce sont les feuilles poussant sur les vieilles branches qui sont officinales car ce sont les seules à posséder des poches à essences sur la face inférieure. Ces feuilles sont généralement vertes-grises, assez épaisses, de forme allongée, falciforme, pétiolée et elles peuvent atteindre 25 centimètres de long et 5 cm de largeur. Les feuilles ont une nervure principale surtout distincte sur la face inférieure. La plante coupée est reconnaissable par la présence de nombreuses poches sécrétrices sur la face inférieure de la feuille.

Les fleurs apparaissent au printemps sous forme d'une toupie bosselée dont la partie large est couverte par un opercule qui se détache au moment de la floraison, laissant apparaître de nombreuses étamines.

Le fruit est la capsule anguleuse du calice, qui renferme deux types de grains. (Koziol, 2015)

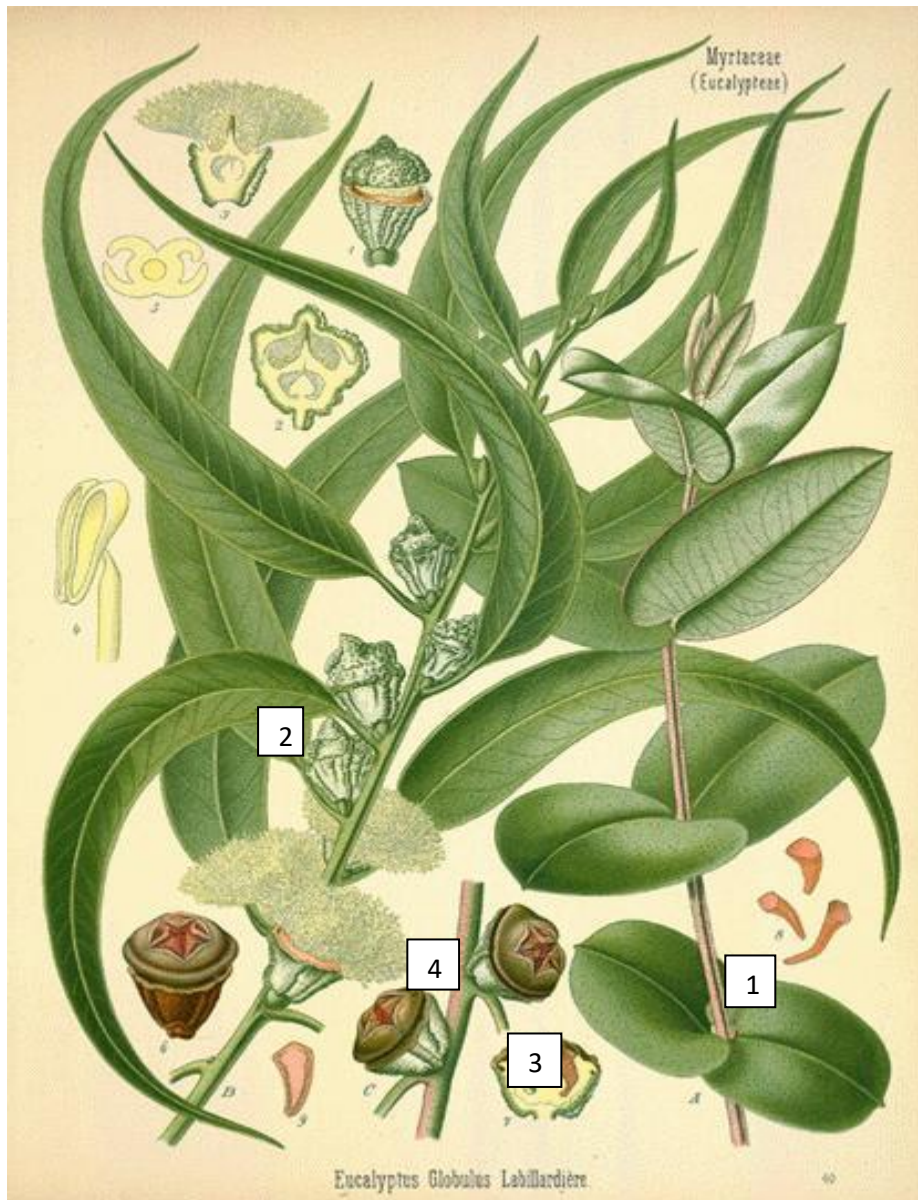


Figure 4 : Gravure d'eucalyptus globulus. 1 : feuilles sur un rameau jeune, 2 : feuilles sur un rameau âgé, 3 : fruit, 4 : fleurs. (Dauvergne, 2020)

II.4. La systématique botanique (Goetz, 2012).

- Règne : Plantae
- Sous-règne : Tracheobionta
- Division : Magnoliophyta

- Classe : Dicotylédones
- Ordre : Myrtales
- Famille : Myrtaceae
- Genre : Eucalyptus
- Espèce : Eucalyptus globulus

II.5. Composition chimique de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus

L'huile essentielle extraite à partir des feuilles d'eucalyptus globulus est riche en molécules volatiles. D'après la Pharmacopée Européenne, l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus contient les composés représentés dans le tableau III suivant :

Tableau III : Composition de l'HE d'E.globulus selon la Pharmacopée Européenne.

Composé	Pourcentage
1,8-cinéole	au minimum 70%
α -pinène	0,05 à 10 %
β -pinène	0,05 à 1,5 %
sabinène	au maximum 0,3%
α -phellandrène	0,05 à 1,5%
limonène	0,05 à 15%
camphre	au maximum 0,1% .

Selon la Pharmacopée Européenne, l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus doit contenir au minimum 70% de cinéole. Si elle n'est pas dans les normes, elle ne pourra pas être vendue en pharmacie.

L'eucalyptol

L'eucalyptol est un composé naturel monoterpénique qui porte également le nom : 1,8 cinéole ou cinéole. C'est le composé majeur de l'HE d'E. globulus et il est considéré comme

responsable principale de l'effet pharmacologique de cette huile. En effet, c'est la teneur en eucalyptol qui détermine la qualité de l'huile.

❖ Structure

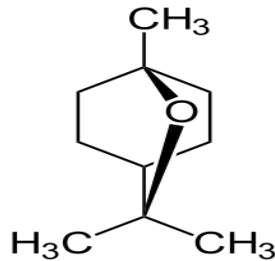


Figure 5 : 1,8 cinéole (eucalyptol).

❖ Propriétés physicochimiques

- Formule brute : $C_{10}H_{18}O$
- Masse molaire : 154.24 g/mol
- Température de fusion : 1.5 °C
- Masse volumique : 0.9225 g.cm^{-3}

II.6. Propriétés pharmacologique de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus

II.6.1. Expectorante et mucolytique

Utilisée pour ses vertus médicinales, principalement expectorante et mucolytique, L'huile essentielle d'Eucalyptus globulus soulage la toux et lutte contre les problèmes des voies respiratoires (Boukhatem, 2018). En effet, grâce à une stimulation directe des cellules sécrétrices de la muqueuse bronchique, celle-ci va permettre de fluidifier les sécrétions bronchiques afin qu'elles soient expulsées plus facilement.

II.6.2. Propriétés antibactériennes et cicatrisante

Des études ont démontré l'activité antiseptique sur les bactéries par des tests in vitro sur une multitude de germes :

- Action démontrée sur des bactéries Gram négatif : *Escherichia coli* qui provoque des infections des voies urinaires inférieures (Raho et al., 2012), *Haemophilus influenzae* qui provoque des infections des voies respiratoires, *pseudomonas aeuroginosa* qui provoque des infections nosocomiales comme des pneumonies. (Cermelli et al., 2008)

- Action démontrée sur des bactéries Gram positif : *Staphylococcus aureus* qui donne notamment des infections de plaie en post-opératoire (Raho et al., 2012), *Streptococcus pneumoniae* qui peut provoquer des infections des voies respiratoires et Oto-Rhino-Laryngologiques (ORL) (Cermelli et al., 2008).

Une autre étude menée par Djenane et al (2011) a démontré l'efficacité des huiles essentielles d'*E.globulus* comme conservateur naturel dans les aliments. Les résultats obtenus pour l'huile sont comparables à ceux de chloramphénicol, un antibiotique utilisé comme un témoin positif. (Djenane et al., 2011)

II.6.3. Insecticide

La présence de 1,8-cinéole dans l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* va lui conférer des propriétés répulsives et insecticides. On pourra l'utiliser par exemple en diffusion pour éloigner les moustiques en été (Daizy et al., 2008). Une étude montre également que l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* est une bonne alternative naturelle contre les mouches domestiques (Kumar et al., 2012).

II.6.4. Antivirale

L'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus* possède une activité antivirale. Elle est notamment importante concernant Herpes Simplex Virus (HSV). Une fois contaminé par le virus HSV, on ne peut pas en guérir totalement. Le virus reste à l'état latent dans l'organisme et peut se réactiver à tout moment à la suite d'un élément déclencheur (stress, fièvre, menstruations, fatigue...). C'est lors de cette phase de réactivation que l'on peut traiter les symptômes.

Des études ont démontré que les huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et de Tea tree possèdent une forte activité antivirale contre HSV. On pourra donc les utiliser afin de traiter un bouton de fièvre. (Koziol, 2015).

II.6.5. Anti-inflammatoire

Des études prouvent que l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus possède des propriétés anti-inflammatoire et analgésique grâce à la présence de 1,8-cinéole (Immaroh et al., 2021). L'huile essentielle inhibe la formation des prostaglandines et de cytokines, ce qui le rend approprié pour le traitement à long terme de l'inflammation des voies respiratoires dans l'asthme, bronchites et autres troubles sensibles aux stéroïdes. Elle sera ainsi utilisée comme antidouleur notamment dans les douleurs musculaires et rhumatismales (en massage, diluée à 10% dans de l'huile végétale, de millepertuis par exemple).

II.6.6. antioxydant

Un antioxydant est une molécule qui peut neutraliser les radicaux libres et protéger contre les dommages cellulaires (Mishra et al., 2010). Les radicaux libres affectent la production de l'énergie, la synthèse de biomolécules et la croissance cellulaire. Selon l'étude de Mishra et al. (2010), l'huile essentielle d'E. globulus a montré une activité antioxydante avec un pourcentage de piégeage du radical DPPH de $79,55 \pm 0.82\%$ à une concentration de 80% (V/V).

II.7. Utilisations de l'huile essentielle d'eucalyptus

✓ En aromathérapie :

L'HE d'E. globulus, étant hautement antiseptique et expectorante, est généralement utilisée contre les maux hivernaux à travers différentes voies d'administration : (Lobstein, 2017)

- Voie orale : une goutte d'HE sur un support neutre ou dans un sirop expectorant trois fois par jour au maximum, pour lutter contre la bronchite et apaiser la toux grasse.

- Voie topique : pour soulager la toux et les difficultés respiratoires, mettre une goutte dans quatre gouttes d'huile végétale et à appliquer sur le thorax quatre fois par jour pendant cinq à sept jours.
- Inhalation : quelques gouttes (2 à 3 gouttes) à déposer sur un mouchoir, à respirer plusieurs fois par jours en cas de rhume et nez bouché. Ou bien, cinq à six gouttes dans un bol d'eau chaude, à inhaler 2 à 3 fois par jour pendant 10 minutes maximum.
- Diffusion : pour purifier l'air et éviter les contaminations, on mélange à parts égales avec une autre HE, par exemple l'eucalyptus radié, puis diffuser pendant 15 minutes trois à quatre fois par jour.

✓ En pharmacie :

L'HE d'E. globulus entre dans la composition de plusieurs préparations pharmaceutiques couramment utilisées dans les pathologies ORL. Son utilisation est attribuée à son constituant principal, 1,8 cinéole (ou eucalyptol), qui se révèle être un excellent antiseptique pulmonaire et expectorant. Notons que la qualité médicinale de l'essence d'eucalyptus doit obéir aux pharmacopées internationales qui exigent une teneur minimale en eucalyptol de 70% et une absence de traces de phéllandrène.

II.8.Toxicité et précaution d'utilisation de l'HE d'eucalyptus globulus

Les huiles essentielles sont des produits naturels mais cela n'exclut pas le fait qu'elles peuvent causer des risques.

L'HE d'eucalyptus peut être dermo-caustique, cette causticité est aussi visible sur les muqueuses à cause du 1,8-cinéole qui peut engendrer des brûlures d'estomac et des irritations des muqueuses nasales. Ce composé peut avoir une action neurotoxique dont le risque est de déclencher des convulsions chez les enfants et des crises d'épilepsies chez les adultes (Dauvergne, 2020)

Une toxicité extrême apparaît après ingestion d'une dose élevée de l'HE. Les symptômes toxiques apparaissent rapidement, qui comprennent une sensation de brûlure dans la bouche et la gorge, des douleurs abdominales et des vomissements spontanés. Les effets initiaux sur le système nerveux central (SNC) sont des vertiges, une ataxie et une

désorientation suivis d'une perte de conscience survenant en 10 à 15 minutes. Les convulsions sont rares chez les adultes, mais sont fréquentes chez les enfants. (Kumar et al., 2015).

De ce fait, l'HE sera utilisée préférentiellement en usage externe mais dans le cas où elle est administrée par voie orale, il faut bien la diluer.

L'huile essentielle d'eucalyptus globulus est contre indiquée pour les enfants de moins de 7 ans et les femmes enceintes et allaitantes, et doit être utilisée avec précaution chez les personnes asthmatiques à cause de son pouvoir expectorant très asséchant.

Chapitre II

Matériels et méthodes

I. Introduction

Outre la partie réservée à l'analyse, l'objet de ce travail est d'extraire de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus par entraînement à la vapeur d'eau à partir des feuilles et de rameaux d'eucalyptus. L'extraction a été réalisée au laboratoire VieBio, production et formation des huiles essentielles et végétal à Blida. Les analyses physico-chimiques ont été faites au laboratoire de chimie appliquée et de génie chimique de l'université de Tizi-Ouzou. La détermination de l'activité antimicrobienne de l'extrait a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Tizi-Ouzou.

Le flowsheet des opérations unitaires que nous avons mise en œuvre pour la réalisation de ce travail est donné par la figure 6.

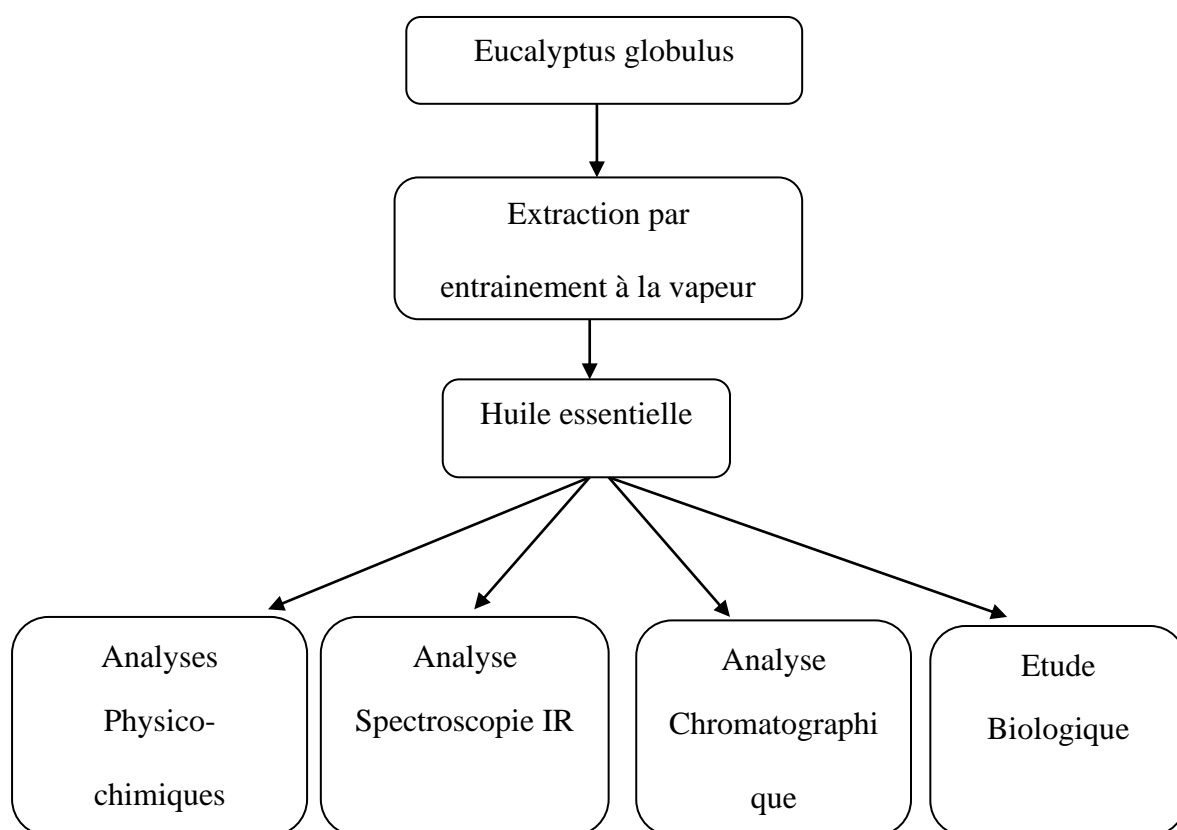


Figure 6 : Schéma général de la procédure expérimentale.

II. Récolte de l'échantillon

Les feuilles et les rameaux d'eucalyptus globulus ont été récoltés au mois de juillet de l'année 2021 dans la région d'Azazga dans la wilaya de Tizi Ouzou.

L'identification botanique du matériel végétal a été faite avec logiciel de botanique PlantNet et confirmé par le moteur de recherche Google. Avec le logiciel PlantNet, l'identification botanique consiste à la reconnaissance de l'espèce grâce à une photographie de ces feuilles. (Barthélémy et al., 2014).



Figure 7 : Photographie d'identification botanique des feuilles d'eucalyptus globulus.

III. Extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau

III.1. Principe

L'extraction de l'HE d'Eucalyptus globulus est réalisée par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau à partir des feuilles fraîches dans un extracteur appelé Alambic. Le principe de cette méthode consiste à entraîner 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. La vapeur, chargée de l'essence de la matière végétale distillée, se condense dans le serpentin avant d'être récupérée dans un essencier. Les parties insolubles dans l'eau de condensation ont été décantées pour donner l'huile essentielle.

Le montage (figure 8) est constitué des parties suivantes :

- Un réservoir muni d'une grille de séparation,
- Un thermomètre fixé sur le couvercle du réservoir pour contrôler la température,
- Un réfrigérant muni d'une entrée et d'une sortie d'eau qui permet la circulation d'eau froide,
- Un essencier qui permet de récupérer les vapeurs condensées.

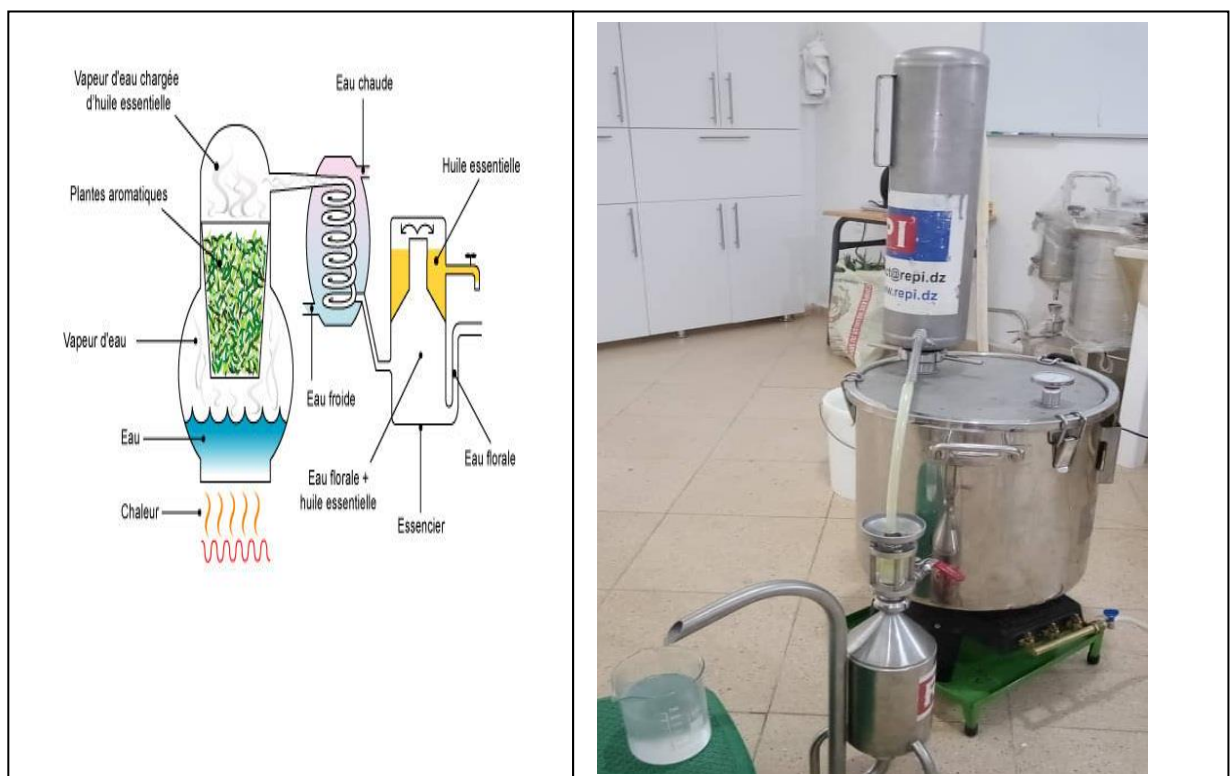


Figure 8 : Montage de distillation par entraînement à la vapeur d'eau.

III.2. Mode opératoire

3140 g de matériel végétal frais est introduit dans un réservoir sur une grille perforée en dessus de la base de l'alambic contenant 10 litre d'eau distillée. Sous l'action de la chaleur, l'eau se transforme en vapeur et passe à travers les feuilles d'eucalyptus, entraînant avec elle les molécules aromatiques vers un système de refroidissement. A travers son passage dans le serpentín, la vapeur d'eau chargée ainsi d'essence, retourne à l'état liquide par condensation et s'écoule dans l'essencier. 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.

Les conditions opératoires de l'extraction par entrainement à la vapeur d'eau sont :

- Masse de la matière végétale de 3.140 Kg,
- Quantité d'eau de 10litre,
- Température égale à 100°C,
- Temps d'extraction de 2 heures.

Les produits de l'extraction seront séparés dans une ampoule à décanter pendant 24 h. Après la décantation, l'huile est récupérée et pesée. Elle est conservée dans un flacon en verre fumé et hermétiquement fermé afin d'éviter tout risque d'altération de l'huile essentielle par la lumière et l'oxygène de l'air.

III.3. Détermination du rendement de l'extraction

Selon la norme AFNOR (2000), le rendement en huile essentielle (R_{HE}) est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue après l'extraction (M') et la masse de la matière végétale utilisée (M).

Le rendement est exprimé en pourcentage, il est donné par la formule suivante :

$$R_{HE}(\%) = \frac{M'}{M} \times 100$$

R_{HE} : rendement en huile essentielle,

M' : masse de l'huile essentielle en gramme,

M : masse de la matière végétale utilisée en gramme.

IV. Analyse de l'huile extraite

L'huile extraite est soumise aux analyses suivantes : examen organoleptique, indice de réfraction, densité, acidité, indice de saponification et l'analyse infra rouge (IRTF). Nous avons aussi déterminé l'activité antioxydante (test au DPPH) et l'activité antimicrobienne de cette huile.

IV.1. Caractéristiques organoleptiques

L'examen organoleptique représente une première approche de la qualité de l'huile. Il comprend l'odeur, la couleur et l'aspect à 20°C.

IV.2. Analyses physicochimiques

IV.2.1. Potentiel en hydrogène

Il consiste à introduire l'électrode du pH-mètre dans le produit après réglage de la température. La lecture se fait directement sur le pH-mètre.

IV.2.2. Densité relative

La densité de l'HE est déterminée par le rapport entre la masse d'un certain volume de l'essence à la masse du même volume d'eau distillée pris à la même température.

La densité de l'HE d'Eucalyptus globulus est réalisée à l'aide d'une seringue d'une capacité de 3.5 mL.

- On pèse, en premier lieu, la seringue vide puis remplie d'eau distillée,
- On pèse des volumes égaux (0.2 mL) d'huile essentielle et d'eau distillée, puis on note leurs poids exacts.

La densité relative a été calculée à partir de la relation suivante :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : la masse en gramme de la seringue vide,

m_1 : la masse en gramme de la seringue rempli d'eau distillée,

m_2 : la masse en gramme de la seringue rempli d'huile essentielle.

IV.2.3. Indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une substance est le rapport de la vitesse de la lumière à une longueur d'onde définie dans le vide à sa vitesse dans la substance. Il a été déterminé à l'aide d'un réfractomètre de marque SCHMIDT HENSCH. Nous avons opéré comme suit :

- On dépose une goutte d'HE entre les deux faces des prismes du refractomètre,
- On regarde dans l'oculaire puis on tourne le bouton de réglage de l'indice de réfraction pour amener les zones sombres et éclairées au centre du réticule. On note la valeur de l'indice.

L'indice de réfraction est donné pour la température de référence de 20°C. Dans le cas de mesure de cet indice dans différentes températures, on effectue la correction à 20°C par le biais de la formule suivante :

$$n_{20} = n_t + 0.00045 (T - 20^\circ\text{C})$$

n_{20} = Indice de réfraction à 20°C

n_t = Indice de réfraction à température ambiante (de mesure)

T = Température ambiante.

IV.2.4. Indice d'acide

On définit l'indice d'acide comme étant le nombre de milligrammes de potasse nécessaire pour neutraliser les acides gras libres d'un gramme de corps gras. Nous avons utilisé la méthode basée sur la neutralisation par la potasse des acides gras libres dissous dans l'éthanol.

Dans un erlenmayer :

- On pèse 1g de l'HE d'eucalyptus globulus qu'on dissout dans 5ml d'éthanol à 96°,
- On ajoute 0,5 ml d'un indicateur coloré, la phénolphtaléine,
- Ensuite, on titre par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium (KOH) 0,1 N.
- Le titrage se termine au changement de coloration de la phénolphtaléine. Lorsque la solution vire au rose, on note alors le volume (V) du réactif titrant.

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

$$I_A = \frac{M_{KOH} \times C \times V}{m}$$

I_A : Indice d'acide (sans unité),

V : Volume en millilitre de la solution de KOH utilisée pour le titrage,

C : Concentration en mol/L de la solution de KOH,

m : Masse en grammes de l'huile essentielle,

M_{KOH} : Masse molaire du KOH.

IV.2.5. Indice de saponification

L'indice de saponification (I_s) correspond à la masse d'hydroxyde de potassium KOH (exprimée en milligrammes) nécessaire pour saponifier les esters d'acides gras et neutraliser les acides gras non estérifiés contenus dans un gramme de corps gras.

Dans un ballon de 250mL :

- On introduit 1 g d'HE d'eucalyptus globulus, on ajoute 25 ml d'une solution de KOH à 0.5 M, ainsi que quelques pierres ponce. L'ensemble est porté à reflux pendant 1h pour que la réaction puisse avoir lieu.

- Après refroidissement de la solution, on démonte le ballon puis on ajoute 20 ml d'eau distillée suivi de 5 gouttes d'une solution de phénolphaléine (indicateur coloré).

- L'excès d'hydroxyde de potassium est titré avec une solution d'acide chlorhydrique (HCl à 0,5 N) jusqu'à la disparition de la couleur rose.

- Un test à blanc est réalisée, dans les mêmes conditions opératoires et en utilisant les mêmes réactifs.

L'indice de saponification (I_s) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$$I_s = \frac{C_{HCl} \times M_{KOH} \times (V_0 - V)}{m}$$

I_s : Indice de saponification

V : Volume (en ml) de HCl utilisé

V_0 : Volume (en ml) de HCl utilisé dans l'essai à blanc

m : Masse de la prise d'essai en g

C_{HCl} : Concentration de HCl

M_{KOH} : Masse molaire du KOH.

IV.3. Analyse chromatographique sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est réalisée selon le protocole décrit par la pharmacopée européenne concernant l'huile essentielle d'eucalyptus globulus. Les étapes suivies lors de cette analyse sont :

IV.3. 1. Préparation et dissolution de l'huile

Peser 0.1 g de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus dans une fiole de 10 ml. Dissoudre dans du toluène et compléter jusqu'au trait de jauge.

➤ **Solution témoin**

Faute de l'absence de cinéole, nous avons utilisé l'huile commerciale et nous l'avons préparé de la même manière que notre huile.

➤ **La phase mobile**

L'éluant est un mélange de deux solvants (10 : 90 V/V), 5 ml d'acétate d'éthyle et 45 ml de toluène.

➤ **Détection :**

A cause de l'absence de l'aldéhyde anésique, nous avons utilisé une solution de KMnO_4 à une concentration de 0.02 M comme révélateur. Pour cela, On pèse 0.4 g de KMnO_4 et on l'introduit dans une fiole de 100 ml, on le fait dissoudre dans une petite quantité d'eau distillé puis on complète au trait de jauge.

➤ **Dépôt et développement**

Après avoir préparé la plaque de gel de silice pour CCM, on dépose sur la ligne de départ la solution à examiner et la solution témoin à l'aide d'un tube capillaire. La plaque est placée verticalement dans la cuve préalablement saturée par les vapeurs de la phase mobile. La ligne de dépôt doit être au-dessus du niveau de l'éluant (figure 9).



Figure 9 : La plaque CCM dans la phase mobile.

IV.4. Analyse spectrométrie infrarouge de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus

Afin de mettre en évidence les groupements fonctionnels constitutifs de l'huile essentielle extraite, on a eu recours à la spectrophotométrie infrarouge. Ce test a été réalisé au niveau du laboratoire d'analyse chimique à la faculté des sciences de l'université de Tizi-Ouzou.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre à transformée de Fourier du type SHIMADZU IRAffinity-1S (figure 10). Pour cela, on dépose une goutte d'huile essentielle sur le compartiment échantillon après l'avoir bien essuyé et on lance le logiciel pour avoir les spectres d'absorption.



Figure 10 : Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier FTIR.

V. Etude de l'activité antibactérienne de l'HE d'E.globulus

L'étude de l'activité biologique a été réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou, sur quatre souches bactériennes par la méthode de diffusion sur le milieu gélose. Le pouvoir antimicrobien est obtenu par la mesure des diamètres des zones d'inhibition (mm), en utilisant des disques.

V.1. Souches bactériennes utilisées

Les souches bactériennes sur lesquelles on a testé l'activité de notre huile essentielle, sont citées dans le tableau IV.

Tableau IV : Souches bactériennes utilisées pour les tests.

Souches	Nom	Famille
Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>
Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>micrococcaceae</i>
	<i>Streptococcus pneumonea</i>	<i>streptococcaceae</i>

V.2. Méthode de diffusion sur le milieu gélose (méthode des disques)

La technique des disques de diffusion est simple à mettre en œuvre et relativement bon marché. Le principe de cette méthode repose sur le pouvoir de la migration de l'HE par diffusion dans la gélose. Elle permet la mise en évidence de l'effet antibactérien de l'HE par la mesure du diamètre d'inhibition en millimètres autour d'un disque imprégné par l'HE.

En fonction de la zone d'inhibition on peut classer les souches étudiées en souches sensibles ou résistantes.

V.2.1. Matériels utilisés

Pour réaliser cette culture, nous aurons besoin de :

- Boîtes de pétri,
- Pipettes pasteur,
- Ecouillons stériles,

- Souches bactériennes,
- Tubes à essai contenant de l'eau physiologique,
- Disques stériles de papier Wattman,
- Milieu de MULLER-HINTON,
- Bec benzène.

V.2.2. Mode opératoire

- *Préparation des disques*

Nous avons utilisé le papier Wattman pour préparer des disques de 6 mm de diamètre, ensuite, ils sont mis dans un tube à essai, stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 120°C (figure 11 et 12).



Figure 11 : Disques en papier Wattman.



Figure 12 : L'autoclave.

- **Milieu de culture**

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

- **Préparation des dilutions de l'HE**

Une série de dilutions de l'HE d'E.globulus (75%, 50%, 25%) est préparée dans le DMSO (diméthylsulfoxyde).

➤ **Inoculum**

- A l'aide d'une pipette pasteur scellée, on racle quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques à partir d'une culture de 24h sur le milieu d'isolement.

- On décharge la pipette pasteur dans 10 ml d'eau physiologique stérile. On homogénéise la suspension bactérienne obtenue, et on ajuste sa densité est ajustée à 0.5 McFarland (figure 13).



Figure 13 : Densimètre.

➤ **Ensemencement**

Cette opération doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum. On trempe un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis on flotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée séchée, de haut en bas, en strie serrées. Répéter l'opération en tournant la boîte à 90° à chaque fois et finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose (figure 14).



Figure 14 : Ensemencement des souches microbiennes.

➤ **Dépôt des disques**

Après l'ensemencement, les disques préalablement préparés sont déposés sur la surface de la gélose dans des conditions stériles, à raison de trois disques par boîte de pétri pour les différentes dilutions, un disque par boîte pour l'HE pure et on ajoute dans chaque boîte un disque non imbibé comme control négatif.

➤ **Incubation**

Les boîtes sont laissées pendant 15 min à température ambiante, puis on les incube pendant 24h à l'étuve (37°C).

➤ **Expression des résultats**

Les résultats sont observés le lendemain des expériences, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ou une règle.

Le diamètre des zones d'inhibition (D) permet de distinguer 4 niveaux d'activité (Sebei et al., 2015)

- (D < 8 mm) : bactérie résistante,
- (8 mm < D < 14 mm) : sensible,
- (14 mm < D < 20 mm) : très sensible,
- (D > 20 mm) : extrêmement sensible.

VI. Etude de l'activité antioxydante de l'huile essentielle

L'activité anti radicalaire de l'extrait de l'eucalyptus globulus vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement à 517 nm en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune.

VI.1. Procédure expérimentale

L'évaluation de l'activité antioxydante est effectuée selon le protocole décrit par Noumi et al. (2011).

VI.1.1. Préparation de la solution DPPH

Une quantité de 4 mg de poudre de DPPH est dissoute dans 50 ml d'éthanol pour obtenir une concentration de 0.2 mmol/L. La solution obtenue est conservée à l'abri de la lumière.

VI.1.2. Préparation des solutions diluées de l'HE

Plusieurs dilutions ont été préparées dans l'éthanol pour réaliser ce test. Ces dilutions ont des concentrations de 10, 20, 30, 40, 50 mg/ml.

VI.1.3. Essai au DPPH

Dans chaque tube à essai sec et stérile contenant 4 ml d'une solution éthanolique de l'huile essentielle préparée à différentes concentrations, on introduit 1ml de solution de DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité pendant 30 minutes à une température ambiante. L'absorbance de la solution est mesurée à 517 nm sur un spectrophotomètre UV/V de type SHIMADZU.

Nous avons préparé un blanc constitué de 1 mL de DPPH et de l'éthanol.

VI.1. 4. Résultats

L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger les radicaux libres est donnée par le taux de décoloration de la solution de DPPH qui est proportionnel au pourcentage d'inhibition du DPPH (I %) donné par la relation suivante :

$$I\% = \frac{(A_{blanc} - A_{échantillon})}{A_{blanc}} \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition,

A_{blanc} : absorbance de la solution de DPPH dans l'éthanol,

A_{échantillon} : absorbance de DPPH avec la solution éthanolique de l'HE.

Chapitre III

Résultats et discussions

Dans ce chapitre, nous présentons les principaux résultats obtenus lors de cette étude ainsi que leurs discussions.

I. Rendement de l'extraction

Le rendement en huile extraite par entraînement à la vapeur à partir d'eucalyptus globulus, calculé avec la relation, vaut 0.25%. Rappelons que sur une masse de 3140 g de matière végétale, seulement 8.1 g d'huile essentielle ont été extraite.

Le rendement de notre extraction de 0.25 % est légèrement supérieur à celui de Boukhatem et al. (2014) qui est de 0.2 %. Il est inférieur à celui de Harkat-Madouri et al. (2015) et à celui de Raho et al. (2012) qui sont respectivement 2.53% et 1.2%.

Cette valeur est également inférieure à la norme générale du rendement d'extraction de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus retrouvé dans la littérature qui est comprise entre 0.5% et 1%.

La différence de la valeur du rendement entre l'huile essentielle que nous avons extraite et celle trouvée par les auteurs que nous avons cités, peut être expliquée par rapport à la région et la période de récolte de l'échantillon ainsi que la méthode de l'extraction.

II. Caractéristiques organoleptiques

Selon la norme AFNOR, les huiles essentielles sont habituellement liquides à température ambiante et volatile, ce qui les différencie des huiles dites fixes. Elles sont plus ou moins colorées et leurs densités sont inférieures à celle de l'eau (figure 15).



Figure 15 : Photographie de l'huile essentielle extraite.

Les caractéristiques organoleptiques de l'huile essentielle eucalyptus globulus ainsi que celles données par la norme AFNOR sont résumés dans le tableau V.

Tableau V : Caractéristiques organoleptiques de l'HE d'eucalyptus globulus.

	Aspect	Couleur	Odeur
AFNOR	Liquide limpide, fluide et mobile	Jaune très pale à transparent	Fraiche et camphrée
Notre huile	Liquide limpide	Jaune clair	Fraiche et camphrée

Les paramètres organoleptiques (aspect, couleur et odeur) de notre huile essentielle sont en accord avec ceux répertoriés dans la norme AFNOR.

III. Analyses physico-chimiques

Les caractéristiques organoleptiques étaient autre fois, les seules indications permettant d'évaluer la qualité d'une huile essentielle, mais comme ces propriétés ne donnent que des informations très limitées sur ces essences, il est nécessaire de faire appel à d'autres techniques de caractérisation plus précises.

Les analyses physico-chimiques de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus sont déterminées selon un protocole précis et obéissent à des normes édictées par l'association française de normalisation (AFNOR). Les résultats des analyses physico-chimiques sont donnés dans le tableau VI.

Tableau VI : Tableau récapitulatif des caractéristiques physicochimiques de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus.

Propriété	Valeurs pratiques	AFNOR	Pharmacopée Européenne
pH	4.87	4 - 6	-
Densité	0.924	0.905 - 0.923	0.906 - 0.927
Indice de réfraction	1.4597	1.460 - 1.476	1.458 - 1.470
Indice d'acide	2.805	0.84 - 3.74	-
Indice de saponification	14.025	-	-

Les paramètres physicochimiques sont utiles pour déterminer la qualité de l'huile essentielle.

A partir de ce tableau, il en ressort que tous les indices étudiés sont conformes à la norme AFNOR et la Pharmacopée Européenne.

- L'huile essentielle est acide, $\text{pH} = 4.87$. Cette valeur est très proche de celle trouvée par Boukhatem et al, (2014) qui est de 4.9.

- Selon AFNOR (2000), la densité des HE est en général inférieure à celle de l'eau. Notre résultat est proche de celui trouvé par Boukhatem et al, (2014) qui est de 0.919 pour la même huile essentielle.

- L'indice de réfraction variant essentiellement avec la teneur en monoterpènes et dérivés oxygénés. Une forte teneur en monoterpènes donnera un indice de réfraction élevé. (Boukhatem, 2010).

- L'indice d'acide donne une idée sur le taux d'acide gras libre existant dans l'huile essentielle, ce paramètre peut nous aider à connaître l'état de détérioration de notre produit. L'indice d'acide de notre huile est conforme aux normes, ce qui prouve qu'elle est stable, et qu'elle ne s'est pas dégradé.

- L'indice de saponification est égal à 14.025. Cette valeur est inférieure à celle obtenue par Boukhatem et al. (2014) qui est de 19.576.

IV. Analyses chromatographiques

Le développement de l'analyse par la chromatographie sur couche mince commence par le choix de la phase mobile de séparation et de la phase stationnaire.

La figure 16 représente le chromatogramme de l'huile essentielle extraite (N) et de l'huile essentielle commerciale (c).

Le rapport frontal est donné par l'équation :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Le chromatogramme résultant des deux huiles extraite et commerciale comporte trois spots. L'identification de ces composés est basée sur la comparaison du rapport frontale des taches obtenues entre ces deux huiles et celui donné par la bibliographie.

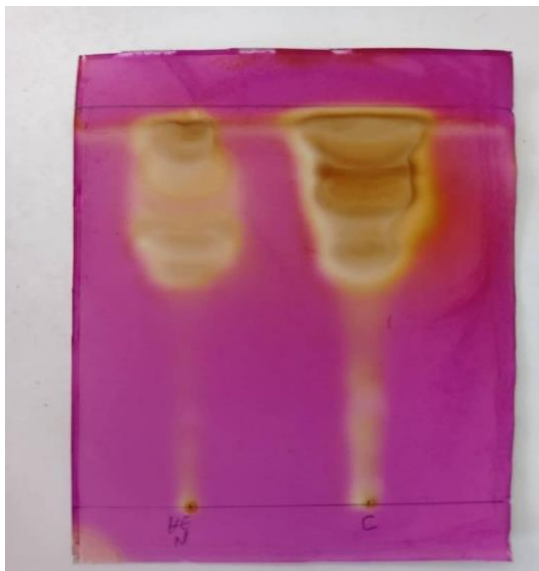


Figure 16 : Plaque CCM après la révélation chimique.

Les résultats consignés dans le tableau VII, montre une similitude des rapports trouvés pour l'huile extraite et l'huile commerciale pour spots 1 et 3 obtenus. Une légère différence est obtenue pour la deuxième tache. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir une bonne séparation des composés qui se sont accumulés au niveau de la ligne de fin de migration. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les composés détectés ont des masses moléculaires très proches ou alors que ces constituants ont la même affinité envers la phase mobile.

Tableau VII : Résumé du résultat de la CCM.

	Tache 1	Tache 2	Tache 3
Notre HE d'E.globulus	$R_f = 0.57$	$R_f = 0.67$	$R_f = 0.88$
HE d'E.globulus commerciale	$R_f = 0.61$	$R_f = 0.74$	$R_f = 0.84$

V. Analyse par la spectroscopie infrarouge

La plupart des méthodes physiques d'analyse des substances organiques dépendent de l'interaction de la matière avec la lumière électromagnétique.

Le spectre électromagnétique couvre une très grande plage d'énergie. On utilise les propriétés spectrales pour déterminer la structure des molécules et des ions. La spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier a été choisie et utilisée dans ce cas. Le spectre de l'huile essentielle obtenue est représenté dans la figure 17.

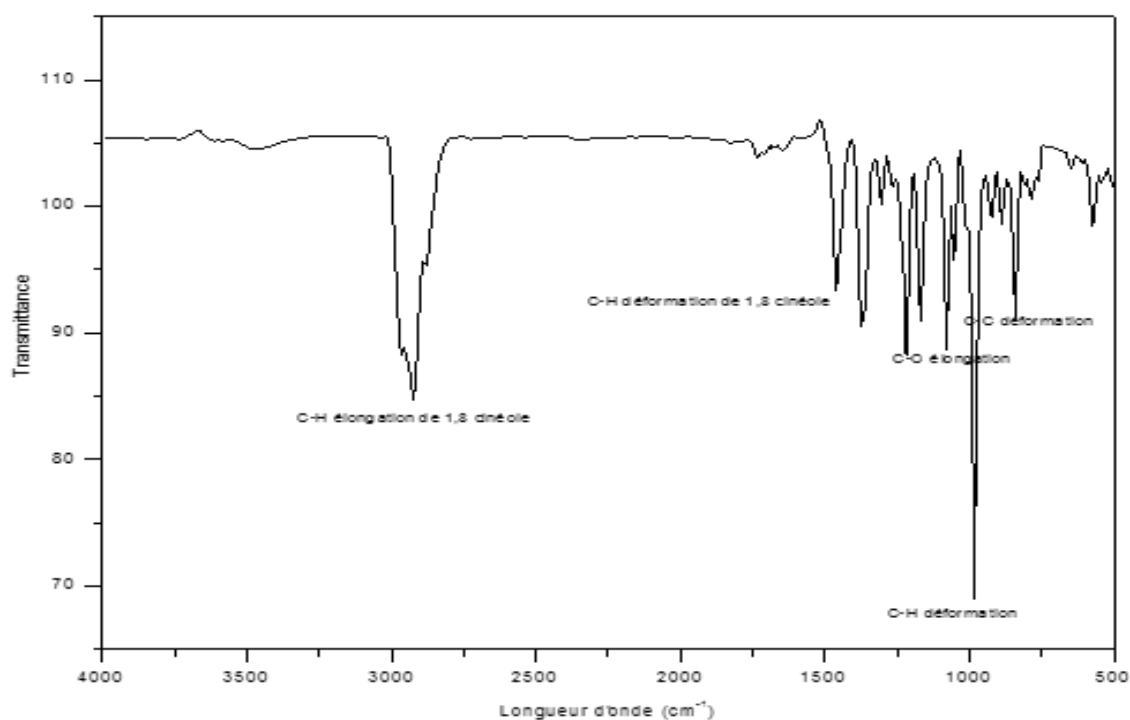


Figure 17 : Spectre IRTF de l'huile essentielle eucalyptus globulus.

L'examen du spectre IRTF de l'huile essentielle a montré la présence de groupes fonctionnels qui sont probablement attribués aux composés bioactifs (eucalyptol). Ce spectre a montré un large pic à 2900 cm⁻¹ attribué aux allongements de liaisons C-H des alcènes. Des pics à environ 1450 cm⁻¹ attribués à l'élongation de liaisons C-H des alcanes. Le pic autour de 1200 et 1060 dus à des esters et des alcools. Le spectre IR a confirmé la présence de composés aromatiques, des alcools, des phénols, des alcanes, des alcynes et des amines dans l'huile d'Eucalyptus (Sharma, 2021).

L'ensemble des pics obtenus est donné dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Analyse infrarouge d'HE d'E. globulus.

Nombre du pic	X (cm ⁻¹)	Mode de vibration	Intensité
1	2900	C-H des alcènes	Elevé
2	1450	C-H des alcanes	Moyenne
3	1200	C-O des esters	Moyenne
4	1060	C-O des alcools	Moyenne
5	980	C-H des alcènes	Elevé

VI. Activités antibactériennes

VI.1. l'HE pure

L'étude de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode de la mesure du diamètre des zones d'inhibitions. La figure 18 montre les zones d'inhibitions de l'HE pure d'E. globulus.

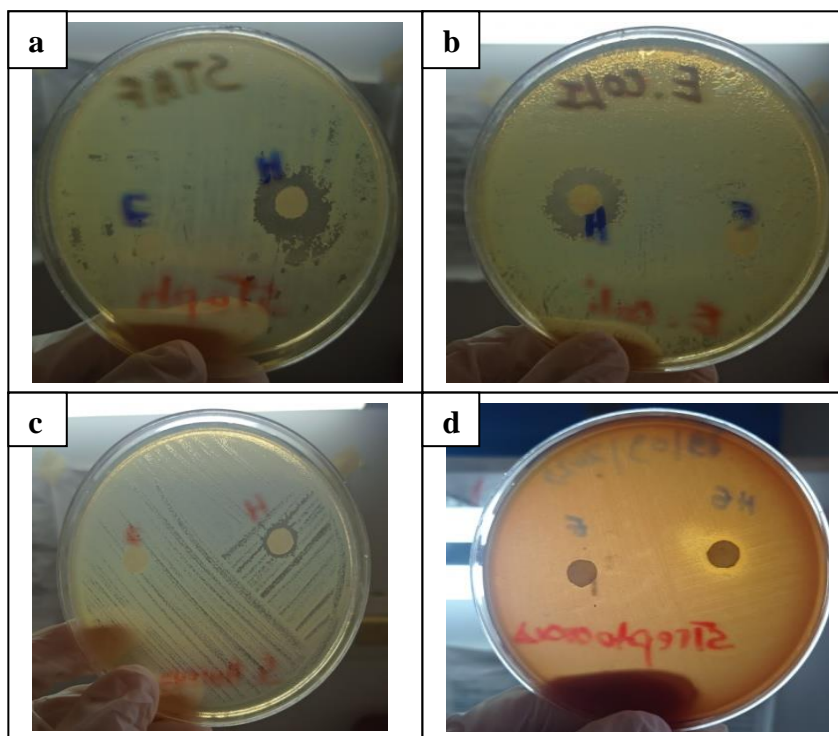


Figure 18 : Effet antibactérien de l'HE d'E.globulus sur les souches a) *staphylococcus aureus*, b) *escherichia coli*, c) *pseudomonas aeruginosa* et d) *streptococcus pneumonea*.

Les résultats de la sensibilité des souches testés vis-à-vis de l'HE d'E. globulus par la méthode des disques sont représentés dans le tableau IX.

Tableau IX : Résultats de l'aromatogramme de l'huile essentielle pure.

Souche bactérienne	Diamètre d'inhibition
<i>Staphylococcus aureus</i>	21 mm
<i>Escherichia coli</i>	19 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11 mm
<i>Streptococcus pneumonéa</i>	15 mm

L'huile essentielle d'eucalyptus globulus a présenté une activité bactérienne sur les 4 souches testées. On peut dire alors qu'elle a un spectre d'activité large car elle inhibe plusieurs type de bactéries : bactéries gram positif et bactéries gram négatif.

Après la mesure des diamètres des zones d'inhibitions des différentes souches vis-à-vis de l'huile testée, nous constatons que l'efficacité de cette huile diffère d'une bactérie à une autre. *Pseudomonas aeruginosa* est la plus résistante tandis que *staphylococcus aureus* est la plus sensible à l'huile essentielle d'E. globulus avec une zone d'inhibition de 21mm.

Le classement de la sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'HE selon un ordre décroissant est comme suit : *s.aureus*>*E.coli*>*S.pneumonea*>*P.aeruginosa*.

Si on compare nos résultats avec d'autres études, on constate que :

- Les diamètres d'inhibition de *staphylococcs aureus*, *E.coli* et *pseudomonas aeruginosa* sont inférieurs à ceux donnés par Raho et al. (2012) (diamètre = 25 et 27 mm respectivement) et Damjanovic-vratnica et al. (2011) (diamètre = 23 mm pour les deux souches).

- Le diamètre d'inhibition de *streptococcus pneumoneae* est identique à celui trouvé par Cermelli et al. (2008).

IV.2. Dilutions de l'huile essentielle

L'effet des différentes dilutions de l'huile sur les quatre souches testées est illustré dans la figure 19.

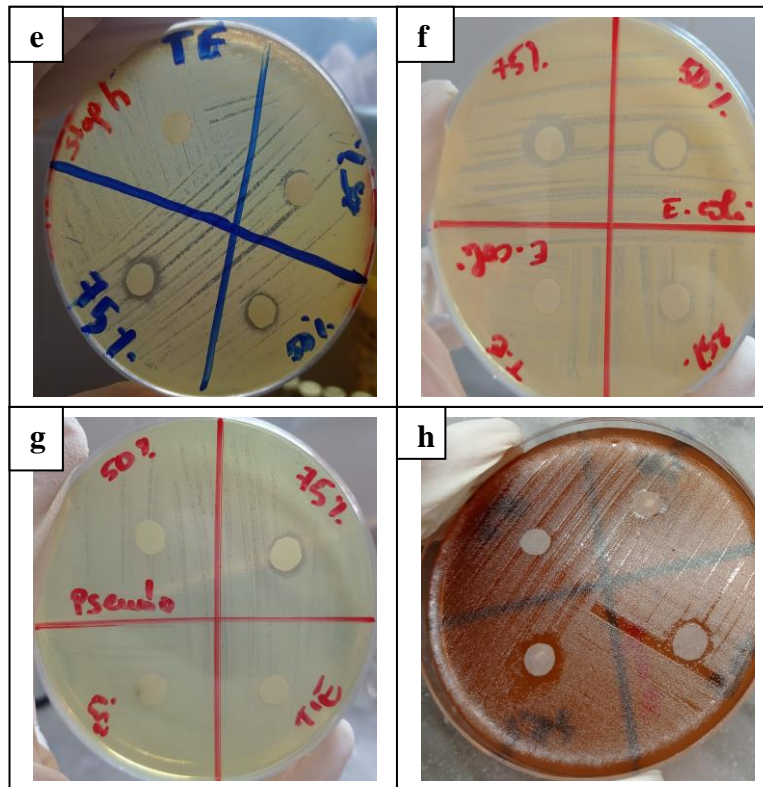


Figure 19 : Effet antibactérien des différentes dilutions de l'HE d'*E. globulus* sur les souches e) *staphylococcus aureus*, f) *escherichia coli*, g) *pseudomonas aeruginosa* et h) *streptococcus pneumonea*.

Au regard de ces résultats (tableau X), nous constatons que l'extrait d'Eucalyptus globulus présente une activité antimicrobienne. Les souches bactériennes testées manifestent une diminution du diamètre d'inhibition parallèlement à la décroissance des concentrations de notre huile essentielle sauf pour la concentration de 25% qui ne manifeste aucun effet antibactérien sur toutes les souches testées.

Tableau X : Résultats de l'aromatogramme pour les dilutions de l'HE d'*E. globulus*.

Souches bactériennes	Diamètre d'inhibition des différentes dilutions
<i>Staphylococcus aureus</i>	75% : 13 mm 50% : 9 mm 25% : 0
<i>Escherichia coli</i>	75% : 15 mm 50% : 10mm 25% : 0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75% : 10mm 50% : 0 25% : 0
<i>Streptococcus pneumonéa</i>	75% : 12 mm 50% : 11 mm 25% : 0

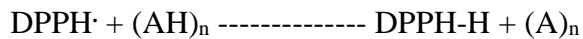
VII. Evaluation de l'activité antioxydante

Le diphenyle picryl-hydrazyle (DPPH), un radical libre stable, violet en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphenyle picryl-hydrazine par un composé à propriété anti-radicalaire, entraînant ainsi une décoloration.



Figure 20 : Photographie montrant la réduction de la solution de DPPH.

On peut résumer la réaction sous la forme de l'équation :



Où $(\text{AH})_n$ représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphényle picryl-hydrazine (jaune).

La figure 21 représente le profil de l'activité anti-radicalaire obtenu pour l'extrait éthanolique d'eucalyptus globulus.

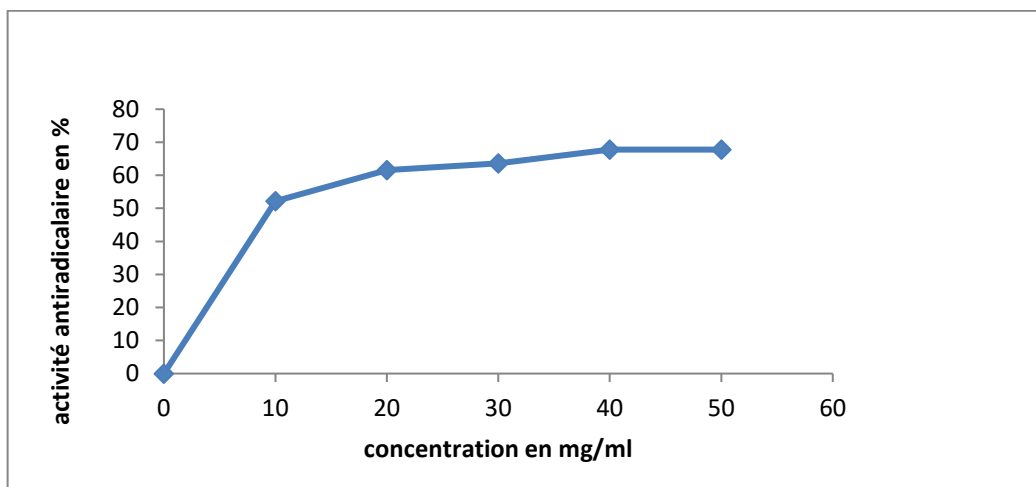


Figure 21 : Activité anti-radicalaire de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus.

L'extrait éthanolique a présenté un très bon pouvoir antioxydant (67.77%). L'allure exponentielle de la courbe, signifie l'existence d'une relation proportionnelle entre le pourcentage de réduction des radicaux libres et la concentration de l'échantillon dans le milieu réactionnel. L'activité anti-radicalaire est probablement liée à son contenu en polyphénols et en flavonoïdes. Plusieurs études ont établi des relations entre la structure chimique des composés de ces huiles et la capacité antioxydantes.

Le pourcentage d'inhibition varie de 52.18 % à 67.77% en passant des concentrations de 10 à 50 mg/ml respectivement.

Les résultats de notre étude sont supérieurs à ceux obtenus par Harkat Madouri et al (2015) avec un pourcentage d'inhibition de 11.72 % à 60.63 %.

Conclusion

L'intérêt porté sur l'étude des huiles essentielles ne cesse de croître. Ceci montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle de synthèse de nouvelles substances.

Le présent travail est consacré à l'étude des caractéristiques physicochimiques et l'évaluation de l'activité biologique de l'huile essentielle d'eucalyptus globulus récolté dans la région d'Azazga dans la wilaya de Tizi-Ouzou.

Le rendement de l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau a révélé un pourcentage de 0.25 %.

L'étude des caractéristiques physicochimiques et organoleptiques de l'huile essentielle met en évidence sa qualité par correspondance avec les normes. Elle se distingue par une densité relative, un indice de réfraction, un indice d'acide et de saponification globalement comparable à ceux donnés par la pharmacopée européenne et la norme AFNOR.

Les résultats de l'analyse par spectroscopie IR nous ont permis par ailleurs, de trouver les groupements fonctionnels associés à la composition de notre huile essentielle qui est dominé par 1.8-cinéole.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de l'HE d'E. globulus a été réalisée par la méthode de diffusion sur gélose. Les résultats ont montré que l'huile essentielle extraite d'eucalyptus globulus a une action inhibitrice vis-à-vis quatre souches testées. Deux Gram positif (*S.aureus*, *S.pneumoniae*) et deux Gram négatif (*E.coli*, *P.aeruginosa*). Les résultats de l'aromatogramme ont démontré que l'huile essentielle a fortement inhibé la souche *S.aureus* et *E.coli* et suivit de *S.pneumoniae* et *P.aeruginosa* à différentes concentration : 100%, 75% et 50%. Par contre, aucun effet inhibiteur n'a été observé à la concentration de 25%.

L'évaluation de l'activité antioxydante a été réalisée in vitro, par la méthode de réduction du DPPH. Les résultats ont montré que l'huile essentielle d'eucalyptus est douée d'activité antioxydante. Le test de DPPH a présenté des pourcentages d'inhibition allant jusqu'à 67.77 % qui est un pourcentage assez élevé en le comparant avec d'autres études.

Cette recherche soulève clairement la possibilité que l'huile essentielle de cette plante ait des avantages potentiels pour la santé.

La présente étude peut être complétée par :

- L'étude de la cinétique du rendement,
- L'étude de l'activité antifongique et antivirale et faire une analyse chromatographique (CPG/SM) pour déterminer la composition de l'huile essentielle.

Références bibliographiques

AFNOR. 2000. *Association française de normalisation* .

BARTHELEMY D., BOUDJEMAA N., MOLINO J., JOLY A., GOEAU H., BAKIC V., SELMI S., CHAMP J., CARRE J., CHOUET M., PARONNET A., VIGNAU C., DUFOUR-KOWALSKI S., AFFOUAD A., BARBE J., BONNET P. 2014. PI@ntNet, une plate-forme innovante d'agrégation et partage d'observations botaniques. *Botaniste of the twenty centry: roles, challenge and oppirtunities* , 191-197.

BESSAH R., BENYOUSSEF E . 2015. La filière des huiles essentielles: Etat de l'art, impacts et enjeux socioéconomiques. *Energies renouvelables* , 18 (3), 513-528.

BOUKHATEM M.N., FERHAT M.A., KAMELI A., MEKARNIA M. 2018. Eucalyptus globulus (Labil): un arbre aessence aux mille vertus. *Phytothérapie*, 16,203-214.

BOUKHATEM M.N., FERHATH M A., KAMELI A . 2019. Méthodes d'extraction et de distillation des huiles essentielles: Revue de littérature. *AgroBiologia* , 9 (2), 1653-1659.

BOUKHATEM M.N., FERHATH M A., KAMELI A., SAIDI F., SADOK BOUZIANE M. 2014. quality assessment of the essential oil from eucalyptys Labil of Blida (Algeria) origin. *International letters of chemestry physics and astronomy*,36, 303-315.

BOUSBIA Nabil. 2011. Extraction des huiles essentielles riches en anti-oxydants à partir de produit naturels et de co-produits agroalimentaire. *Thèse doctorat*. Ecole Nationale Supérieure Agronomique.

BRUNETON J. 1999. Pharmacognosie, phytochimie des plantes médicinales. 3rd Edition, revue et augmentée. *Tec & Doc*, Paris.

CERMELLI C., FABIO A., FABIO G., QUAGLIO P. 2008. Effect of Eucalyptus Essential Oil on Respiratory Bacteria and Viruses. *Current microbiology*, 56,89-92.

COHEN David. 2013. Les huiles essentielles à l'officine: dangers pour la femme enceinte et le nouveau né. *Thèse Doctorat*. Université de Grenoble.

Coppen J.J.W. 2002. Eucalyptus: the genus eucalyptus. *Taylor &Francis*, London.

DAIZY R B., HARMINDER P S, RAVINDER K K., SHALINDER K. 2008. Eucalyptus essential oil as natural pesticide. *Forest Ecology and management* , 256 (12), 2166-2174.

DAMJANOVIC-VRATNICA B., DAKOV T., SUKOVIC D., DAMJANOVIC J. 2011. antimicrobial effect of essential oil isolated from eucalyptus globulus Labil from Montenegro. *Czech J .Food Sci*, 29,3,277-284.

DAUVERGNE Audrey. 2020. Huiles essentielles d'Eucalyptus globulus, d'Eucalyptus radiata et de Corymbia citriodora :botanique, aromathérapie et enquête auprès des pharmaciens dofficines. *Thèse Doctorat* . Université de Bordeaux (France).

- DESCHEPPER Robin.** 2017. variabilité de la composition des huiles essentielles et intérêt de la notion de chémotype en aromathérapie. *Thèse Doctorat.* Université de Marseille (France).
- DJENANE D., LEFSIH K., YANGUELA J., RONCALES P.** 2011. composition chimique et activité anti-salmonella enteritidis CECT 4300 des huiles essentielles d'eucalyptus globulus, de lavandula angustifolia et de satureja hortensis. Test invitro et efficacité sur des oeufs entiers liquides. *Phytotherapie* , 9, 343-353.
- DJIBO Alfa Keita.** 2000. Analyse des huiles essentielles de quelques plantes de la flore du Burkina Faso appartenant aux familles des lamiaceae et des poaceae . *Thèse Doctorat* . Université de Ouagadougou, Burkina Faso.
- EL-HAIB Abderahim.** 2011. VALORISATION DE TERPENES NATURELS ISSUS DE PLANTES MAROCAINES PAR TRANSFORMATIONS CATALYTIQUES. *Thèse Doctorat.* université de TOULOUS.
- ELKACIMI Imad-eddine.** 2020. Plantes aromatiques et médicinales et dérivés : Etat des lieux et stratégie d'amélioration cas expérimental : stabilité de l'huile essentielle de thymus satureioides. *Thèse Doctorat.* Université Mohammed V de Rabat (Maroc) .
- ERAU Pouline.** 2019. L'eucalyptus: botanique, composition chimique, utilisation thérapeutique et conseil à l'officine. *Thèse Doctorat* . Faculté de pharmacie, France.
- GOETZ P., GHEDIRA K.** 2012. *Phytothérapie anti-infectieuse.* Springer, Paris.
- HARKAT-MADOURI L., BOUDRIA A., KHODIR M., BEY-OULD SI SAID Z., RIGOU P., GRENIER D., ALLALOU H., REMINI H.,ADJAOU D.** 2015. chemical composition, antibacterial and antioxydant activities of essential oil of Eucalyptus globulus from Algeria. *Industrial crops and Pruducts*, 78, 148-153.
- KALOUSTIAN J., HADJI-MINAGLOU F.** 2012. *la connaissance des huiles essentielles: qualigraphie et aromathérapie.* Springer, Paris.
- KOZIOL Nathalie.** 2015. huiles essentielles d'eucalyptus globulus, d'eucalyptus radiata et de carymbia citriodora: qualité, efficacité et toxicité. *Thèse Doctorat.* University de loraine (France).
- KUMAR K J., SONNATHI S., ANITHA C., SANTHOSHKUMAR M.** 2015. Eucalyptus oil poisoning. *Toxicology International* , 22 (1), 170-171.
- LAURENT Julia.** 2017. Conseils et utilisation des huiles essentielles les plus courantes en officine. *Thèse Doctorat.* University de toulous (France).
- LOBSTEIN A., COUIC-MARINIER F., KOSIOL N.** 2018. huile essentielle d'eucalyptus globulus. *Actualités pharmaceutiques* , 59-61.
- LUCACCIONI E., DENAYER R., TELQUIN B.** 1993. pour une analyse des huiles essentielles. *Chimie nouvelle* , 11 (43), 1253-1257.

MISHRA A., SAHU N., MISHRA A., GHOSH A., JHA S., CHATTPADHYAY P. 2010. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of essential oil of Eucalyptus leaf. *Pharmacognosy Journal* , 2, 25-28.

NOUMI E., SNOUSSI M., HADJLAOUI H., TRABELSI N., KSOURI R., VALENTIN E., BAKHROUF A. 2011.chemical composition, antioxidant and antifungal potential of Malaleuca alternifolia (tea tree) and Eucalyptus globulus essential oils against oral candida species. *Journal of medicinal plants Research*, 5(17), 4147-4156.

NOVIDZRO K M., WOKPOR K., AMOUSSOU FAGLA B. 2019. Etude de quelques paramètres physicochimiques et analyse des éléments minéraux, des pigments chlorophylliens et caroténoïdes de l'huile de graines de Griffonia simplicifolia. *International journal of biological and chemical sciences* , 13, 2360-2373.

MORGENE M.F. 2018. Modélisation in vitro de la colonisation nasale à Staphylococcus aureus ; interactions avec l'infection à rhinovirus. *Thèse doctorat* . Université De Lyon (France) .

IMMAROH N.Z., KULIAHSARI D.E., NUGRAHNI S.D. 2021. review: eucalyptus globulus essential oil extraction method. *Earth and environmental science*, 733.

HERZI Najia. 2013. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles. *Thèse Doctorat*. Université de Toulouse (France).

FABRE Nicolas. 2017. Conseils et utilisations des huiles essentielles les plus courants en officine. *Thèse Doctorat*. Université de Toulouse (France).

OUIS Naouel. 2015. Etude chimique et biologique des huiles essentielles de coriandre, de fenouil et de persil. *Thèse Doctorat*. University d'Oran (Algerie).

PAOULINI Julien. 2005. caractérisation des huiles essentielles par CPG/Ir, CPG/SM (IE et IC) et RMN du carbone-13 de Cistus albiduset de deux astériaceae endémique de corce: eupatoriumcannabium subsp. corsicum et doricum corsicum. *Thèse doctorat*. Université de Corse.

PEEYUSH KUMAR., SAPNA MISHRA., ANUSHREE MALIK., SANTASH SATYA. 2012. Analyse de la composition et activité insecticide de l'huile essentielle d'Eucalyptus globulus (famille : Myrtaceae) contre la mouche domestique (Musca domestica). *Acta Tropica* , 212-218.

PERDU Caroline. 2013. etude de deux proteines impliquées dans l'injection de toxines par la bactérie Pseudomonas aeruginosa. *Thèse doctorat*. Université de Grenoble.

PHARMACOPEE EUROPEENNE. 2008. 6 ème édition .

PIERRON Charles. 2014. Les huiles essentielles et leurs expérimentations dans les services hospitalier de france:

exemple d'application en gériatrie gérontologie et soins palliatifs . *Thèse Doctorat*.
Université de Lorraine (France).

RAHO G.B., 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 Biomedecine* , 2 (9), 739-742.

ROUESSAC F., ROUESSAC A. 2004. *ANALYSE CHIMIQUE: Méthodes et techniques instrumentales modernes* (éd. 6 édition). DUNOD, Paris.

RODET J.C. 2016. Les huiles essentielles - Processus d'extraction des huiles essentielles des plantes. *BIO LINEAIRES* , 1.

SARR S.O., FALL A.D., GUEYE R., DIOP A., DIATTA K., DIOP N., NDIAYE B., DIOP Y.M. 2015. Etude de l'activité antioxydante des extraits des feuilles de *Vitex doniana* (Verbenacea). *International Journal of Biological and chemical Sciences* , 9(3):1263-1269.

SABRAOUI A., EL BOUHSSINI M., LHALOUI S., BOULAMTAT R., BOUCHELTA A. 2016. Effet insecticide des huiles essentielles sur la mineuse de pois chiche, *Liriomyza cicerina* R. *Revue Marocaine de Protection des Plantes* (09), pp. 39-46.

SEBEI K., SAKOUHI F., HERCHI W., KHOUJA M L., BOUKHCHINA S. 2015. Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. *Biological research*, 48, 7.

SHARMA A.D., FARMAHA M., KOUR I., SINGH N. 2021. phytochemical analysis using GC-FID, FPLC fingerprinting, antioxydant, antimicrobial, anti-inflammatory activities analysis of traditionally used *Eucalyptus globulus* essential oil. *Drug analytical research* , 26-38.

SUGUMAR., GHOSH., NIRMALA., MUKHERJEE., CHANDRASERKARAN. 2014. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrasonics sonochemistry* , 21, 1044-1049.

Glossaire

Glossaire

Analgésique : qui supprime ou atténue la douleur.

Antiseptique : qui détruit les germes pathogènes et évite l'infection.

Antibactérien : qui inhibe le développement des bactéries.

Antifongique : qui agit contre les infections provoquées par les champignons et les levures.

Antispasmodique : qui lutte contre les spasmes musculaires, principalement digestifs et génito-urinaires.

Bactéries gram négatif : qui, lors de la coloration par méthode de gram, élimine le cristal violet et apparaît rose.

Bactéries gram positif : qui lors de la coloration par méthode de gram, reste colorée en violet ou mauve.

Cataracte : est une maladie qui se caractérise par la perte progressive de la vision. Elle est principalement due au vieillissement et se traduit par une opacification du cristallin de l'œil.

Cytokines : sont des messagers de nature protéiques solubles qui assurent les communications entre les cellules du système immunitaire.

Dermo-caustique : qui entraîne des brûlures de la peau et des muqueuses.

Expectorant : est un médicament ou une herbe qui intensifie l'expulsion du mucus de la trachée ou des bronches de la toux. Il dégage les voies respiratoires et aide à tousser, cracher, et donc à expectorer.

Méthicilline : est un antibiotique, du genre des β -lactamines et de la famille des pénicillines.

Prostaglandines : ce sont des cytokines impliquées dans de nombreuses réactions de l'organisme, notamment dans le développement de plusieurs manifestations inflammatoires, la vasodilatation et la douleur.

Polyarthrite : est une maladie inflammatoire qui touche généralement les articulations des mains et des pieds, donnant lieu à un gonflement, une douleur et, souvent la destruction des articulations.

Stéroïdes : sont un groupe de lipides dérivant de triterpénoïdes (30 atomes de carbones). En médecine, ils désignent les hormones lipidiques sécrétées par les glandes endocrines.

Calice : premier verticille floral, il constitue une protection pour la fleur.

Etamine : est un organe reproducteur composé d'un filet et d'une anthère

Opercule : petit couvercle de certains fruits à déhiscence circulaire.

Sessiles : se dit pour tout organe (feuilles, fleurs, fruits) qui est inséré directement sur la tige, sans pétiole ou pédoncule.

Falciforme : se dit pour les feuilles dont la forme arquée rappelle celle d'une faux ou d'une faucille.

Pétiole : est la pièce végétale qui relie le limbe de la feuille à la tige.

Résumé :

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude des propriétés physicochimiques et biologiques d'une plante aromatique et médicinale : *Eucalyptus globulus*. L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par entraînement à la vapeur. Le rendement en huile extraite était de l'ordre de 0.25%.

Les résultats des analyses physicochimiques (pH, Densité, Indice de réfraction, Indice d'acide et l'Indice de saponification) sont conformes à la pharmacopée Européenne et à la norme AFNOR. L'analyse par spectroscopie IRTF a montré la présence de différents groupements fonctionnels associés à la composition de notre huile.

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode des disques. Les résultats ont révélé un effet inhibiteur vis-à-vis toutes les bactéries testées à différentes concentrations 100%, 75% et 50%. Par contre, aucun effet inhibiteur n'est obtenu à la concentration de 25%.

L'activité antioxydante a été évaluée par le test de DPPH. La concentration maximale d'inhibition a été estimée à 67.77%.

Mots clés : *Eucalyptus globulus*, huile essentielle, activité biologique, DPPH.

Abstracts:

The objectives of our work are the study of the physicochemical and biological properties of an aromatic and medicinal plant, *Eucalyptus globulus*. The extraction of the essential oils was realized by steam distillation. The yield of the extraction is 0.25%.

The results of the physicochemical analyzes of the essential oils were compliant with the standards, European Pharmacopoeia and AFNOR. IR spectroscopy analysis showed the presence of different functional groups associated with the composition of our oil.

The antibacterial activity was evaluated by the disk method and revealed inhibitory effect against all the bacteria tested at different concentrations, 100%, 75% and 50%. On the other hand, no inhibitory effect at the concentration of 25%.

The antioxidant activity was evaluated by the DPPH test whose maximum concentration inhibition was estimated to be 67.77%.

Keywords : *Eucalyptus globulus*, essential oil, biological activity, DPPH.