

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA
Faculté des sciences Agro-Vétérinaires-Biologiques
Département de biologie

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : biotechnologie végétale

EXTRACTION DES COMPOSES ACTIFS

CHEZ Eucalyptus globulus

Par

Leila BOUKHALFOUN

Devant le jury composé de :

Pr F. SAIDI	Professeur	U. de Blida	Présidente
D ^r I. MEGHATLI	Maitre de conférences A	U. de Blida	Examineur
D ^r A. BERBER	Maitre de conférences B	U. de Blida	Examineur
D ^r N. BOUCHENAFI	Maitre de conférences B	U. de Blida	Promotrice
D ^r L.OUSSADOU	Maitre assistant A	U. de Blida	Copromoteur

Blida, Oct 2012

REMERCIEMENTS

Nous remercions Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la patience pour faire ce travail.

Je tiens à remercier messieurs et Mesdames les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Que Mme BOUCHENAFI. N, ma promotrice trouve ici l'expression de ma reconnaissance pour ses conseils et ses encouragements qu'elle m'a manifesté. Je remercie également Mr OUSSADOU. L pour m'avoir fait bénéficier de son expérience tout le long de mon mémoire.

Je tiens à remercier Mme SAIDI. F pour avoir accepté de présider ce jury.

Mes remerciements vont à Mr BERBER. A et Mr MEGHATLI. S qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je n'oublie pas d'exprimer mes vives reconnaissances à mon mari pour son soutien moral et physique dans les moments les plus difficiles.

Enfin, mes remerciements vont aussi à de nombreuses personnes qui m'ont aidé pour le bon déroulement de mon expérimentation.

RESUME

Notre travail repose sur l'étude de principaux principes actifs notamment l'huile essentielle, les flavonoïdes et les tanins d'*Eucalyptus globulus* L. et sur l'étude de l'effet antimicrobien de la plante.

L'utilisation de techniques et des méthodes développées ont permis d'identifier et de séparer les différents composés actifs d'*Eucalyptus globulus*.

L'extraction par entraînement à la vapeur d'eau a donné un rendement de 0.11%.

L'analyse chimique de cette huile essentielle par CGMS, nous a permis d'identifier le composé majoritaire : 1,8 cineole avec une teneur de 60%.

L'analyse des flavonoïdes et des tanins a donné respectivement des rendements, de 4.4% et de 16.96%.

In vitro, l'extrait méthanolique a présenté un très bon pouvoir antioxydant avec une concentration inhibitrice 50 de l'ordre de 0.08mg / ml.

L'extrait méthanolique et aqueux des feuilles d'*Eucalyptus globulus* ont montré une activité antimicrobienne in vitro contre *Staphylococcus aureus* ; *pseudomonas aerogenosa* ; *Bacillus subtilis* et *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 15 à 20 mm . Elles sont donc considérées comme des souches sensibles à l'extrait méthanolique et aqueux à 0.3009g/15ml.

Mots clés : *Eucalyptus globulus* L ; huile essentielle ; composés actifs ; extraction ; pouvoir antioxydant ; effet antimicrobien.

ABSTRACT

Our work is based on the study of active principle in particular essential oil, the flavonoids and tannins of *Eucalyptus globulus* L. and on the study of the antimicrobial effect of the plant.

The use of techniques and the developed methods made it possible to identify and separate the various active compounds from *Eucalyptus globulus*.

The extraction steam distillation gave a yield of 0.11%.

The chemical analysis of this essential oil by CGMS, allowed us to identify the major component: 1,8 cineole with a content of 60%.

The analysis of the flavonoids and tannins gave a respectively yield of 4.4% and 16.96%.

In vitro, the methanolic extract has the antioxidant capacity with inhibiting concentration 50 of 0.08 mg/ml.

The methanolic extract and aqueous of the leaves of *Eucalyptus globulus* showed an antimicrobial activity in vitro against *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* with a zone of inhibition of 15 to 20 mm. they are therefore considered as sensible strains to methanolic extract and aqueous to 0.3009g/15ml.

Key words: *Eucalyptus globulus* L; essential oil; active compounds; extraction; antioxidant capacity; antimicrobial activity.

المخلص

عملنا يرتكز حول دراسة المواد الفعالة , خاصة الزيت الاساسية, الفلافونويد ومادة الدباغ لنبات *E globulus* ودراسة أثرها المضاد للجراثيم والتقنيات المستعملة سمحت لنا بكشف وفصل مختلف الجزئيات الفعالة لـ *Eucalyptus globulus*. استخلاص الزيت الأساسية بتقنية التقطير البخاري أعطى مردودا بنسبة 0.11%. التحليل الكيميائي بالطور الغازي المرفق بالتحليل الطيفي أمكننا من تشخيص المكون السائد 1.8 سينبول بنسبة % 60.

ان معايرة الفلافونويد ومادة الدباغ بينت ان نسب هذه المواد على التوالي 4.4% و 16.96% المستخلص الميثانولي ابدى نشاط معتبر ضد الأكسدة بتركيز مثبط 50 بقيمة 0.08 مغ/ مل.

المستخلص الميثانولي والمائي لأوراق *Eucalyptus globulus*

بين فعالية ضد الميكروبات التالية *S aureus* , *P aerogenosa* , *B subtilis*, *E coli* بمسافة تثبيط تتراوح من 15 الى 20 مم مما يثبت أنها سلالات حساسة للمستخلص الميثانولي والمائي بتركيز 0.3009 مغ/ 15 مل

مفاتيح:، زيت أساسية، المادة الفعالة، استخلاص، نشاط ضد الأكسدة، أثر المضاد للجراثيم.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

INTRODUCTION.....	9
1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
1.1 La phytothérapie.....	11
1.1.1. Le développement de la phytothérapie.....	11
1.1.2. Définition.....	11
1.1.3. Les classes de la phytothérapie	12
1.1.4 Historique des plantes médicinales.....	12
1.1.5. Définition d'une plante médicinale.....	13
1.1.6. Culture et amélioration des plantes médicinales.....	13
1.1.7. Récolte.....	14
1.1.8. Conservation des plantes médicinales.....	15
1.1.9. Modes de préparation des plantes médicinales.....	17
1.1.10. Modes d'utilisation des plantes médicinales.....	19
1.2 Généralités sur la plante étudiée.....	20
1.2.1. Introduction.....	20
1.2.2. Historique de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	20
1.2.3. Dénominations internationales.....	21
1.2.4. Habitat et culture.....	21
1.2.5. Principales espèces d'Eucalyptus.....	22
1.2.6. Situation botanique.....	22
1.2.7. Description botanique.....	23
1.2.8. Culture.....	26
1.2.9. Composition chimique.....	26
1.2.10. Propriétés thérapeutiques.....	27
1.2.11. Modes d'emploi.....	27
1.3 Les principaux principes actifs chez <i>Eucalyptus globulus</i>	28

1.3.1. Les huiles essentielles.....	28
1.3.2. Les flavonoïdes.....	34
1.3.3. Les tanins.....	37
2. MATERIEL ET METHODES.....	44
2.1. Matériel biologique.....	44
2.2. Matériel non biologique.....	45
2.3 Méthodes.....	45
2.3.1. Identification botanique de la plante.....	45
2.3.2. Analyses phytochimiques.....	46
2.3.3. Tests biologiques.....	62
3 .RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	67
3.1. Etude botanique de la plante.....	67
3.2. Etude phytochimique de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	68
CONCLUSION.....	93
REFERENCES	
APPENDICES	

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1.1 : Limites définies par la pharmacopée européenne pour certains composants de l'huile essentielle d' <i>eucalyptus globulus</i>	29
Tableau 2.1 : Les souches pour l'évaluation antimicrobienne.....	64
Tableau 3.1 : Résultats de pesées d' <i>Eucalyptus globulus</i> .L après dessiccation.....	68
Tableau 3.2 : Représentation du taux d'humidité dans la matière végétale.....	69
Tableau 3.3 : Pourcentage en minéraux d' <i>Eucalyptus globulus</i>	70
Tableau 3.4 : Résultats de la détermination des MAT.....	70
Tableau 3.5: Les caractères organoleptique de l'huile essentielle des feuilles de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	71
Tableau 3.6 : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	77
Tableau 3.7 : Longueurs d'ondes et absorbance des composés apolaires	80
Tableau 3.8 : Longueurs d'ondes d'absorption des composés polaires.....	80
Tableau 3.9 : Résumé des réactions tests qui mettent en évidence les flavonoïdes	82
Tableau 3.10 : Représentation des Rf obtenus par CCM de l' <i>Eucalyptus globulus</i> ...	84
Tableau 3.11 : Résumé des réactions de caractérisation des tanins.....	85
Tableau 3.12 : Activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et l'infusé d' <i>Eucalyptus globulus</i>	88
Figure1.1 : Feuille jeune d' <i>Eucalyptus globulus</i>	24
Figure 1.2 : Feuille adulte d' <i>Eucalyptus globulus</i>	25
Figure 1.3 : La fleur d' <i>Eucalyptus globulus</i>	25
Figure1.4 : Le fruit d' <i>Eucalyptus globulus</i>	26
Figure1.5 : Biogénèse des terpènes.....	32
Figure 1.6 : Structure de base des flavonoides.....	35
Figure 1.7: Structure d'acide gallique.....	38
Figure 1.8 : Structure d'acide ellagique.....	38
Figure1.9: Les tanins condensés.....	39
Figure 1.10 : La biogénèse des tanins à partir de l'acide 5- dehydroshikimique....	41
Figure 1.11 : La biogénèse des tanins à partir du phenylpropane.....	41

Figure 2 .1 : Dispositif d'extraction (soxhlet) des composés non volatils par solvant	52
Figure 2.2 : Protocole d'extraction des flavonoïdes	58
Figure 2.3 : Protocole expérimental de l'extraction des tanins.....	61
Figure 3.1 : La fleur d' <i>Eucalyptus globulus</i> observé à l'œil nu.....	67
Figure 3.2 : Fruit d' <i>Eucalyptus globulus</i> observé à l'œil nu.....	68
Figure 3.3 : Teneur en eau de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	69
Figure 3.4: Chromatogramme de l'huile essentielle d' <i>Eucalyptus globulus</i>	72
Figure 3.5 : Spectre de masse de α pinène.....	73
Figure 3.6 : Spectre de masse de α phéllandréne.....	74
Figure 3.7 : Spectre de masse d'eucalyptol.....	74
Figure 3.8 : Spectre de masse du sabinol.....	75
Figure 3.9 : Spectre de masse d'isocarvéol.....	75
Figure 3.10 : Spectre de masse de méthyleugénol.....	76
Figure 3.11 : Coupe transversale dans la feuille d' <i>Eucalyptus globulus</i>	78
Figure 3.12 : Spectre d'absorption des composés apolaires.....	81
Figure 3.13: Spectre d'absorption des composés polaires.....	81
Figure 3.14 : Chromatogramme des flavonoïdes d' <i>Eucalyptus globulus</i>	83
Figure 3.15 : Chromatogramme des tanins d' <i>Eucalyptus globulus</i>	85
Figure 3.16 : L'activité antioxydante du tocophérol de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	87
Figure 3.17 : L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de l' <i>Eucalyptus globulus</i>	87
Figure 3.18 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Eucalyptus globulus</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
Figure 3.19 : Effet de l'infusé d' <i>E globulus</i> sur <i>Bacillus subtilis</i>	89
Figure 3.20 : Effet de l'infusé d' <i>Eucalyptus globulus</i> sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
Figure 3.21 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>Eucalyptus globulus</i> sur <i>B subtilis</i> ...	90
Figure 3.22 : Effet de l'infusé d' <i>E globulus</i> sur <i>S.aureus</i>	90
Figure 3.23 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>E globulus</i> sur <i>S aureus</i>	91
Figure 3.24 : Effet de l'infusé d' <i>E globulus</i> sur <i>E coli</i>	91
Figure 3.25 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>E globulus</i> sur <i>E.coli</i>	91
Figure 3. 26 : Effet de l'extrait méthanolique d' <i>E globulus</i> sur <i>Candida albicans</i> ...	92

INTRODUCTION

Depuis la nuit des temps, l'homme constatant la fragilité de sa santé, s'est soigné, parce que la nature mettait à sa disposition les plantes [1].

L'utilisation des plantes médicinales est très courante, non seulement dans beaucoup de médecines traditionnelles comme la médecine chinoise, elle se retrouve aussi chez la plupart des peuples dits primitifs d'Afrique, d'Amérique et d'Océanie [2].

Emerveillé au départ par toutes ses découvertes fantastiques, l'homme isola les principes actifs des plantes, puis les synthétisa afin d'obtenir des produits nouveaux.

Plus de cinq millions d'individus à travers le monde se soignent par la phytothérapie, avec une progression annuelle d'environ 15% ; 40% des médicaments sont à base de composants actifs issus de plantes [2].

Le continent africain est un des continents dotés d'une biodiversité la plus riche dans le monde. L'Algérie possède une richesse floristique considérable, ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêt et constituent un axe de recherche scientifique et plus particulièrement dans le domaine des substances naturelles [3].

Parmi les nombreuses plantes à vertus thérapeutiques, nous nous sommes intéressés à *Eucalyptus globulus* L. connu sous le nom de gommier bleu couramment utilisé en phytothérapie pour ses propriétés antiseptiques des voies respiratoires et astringentes.

Ce travail vise à étudier les principaux principes actifs de l'*Eucalyptus globulus* tels que l'huile essentielle, flavonoïdes et les tanins.

Pour cela nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

L'étude phytochimique de la plante par l'analyse de ses composés chimiques actifs en utilisant diverses techniques d'extraction et d'identification.

L'étude biologique portant sur l'effet antimicrobien et antioxydant d'*Eucalyptus globulus* L.

CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 La phytothérapie

1.1.1 Le développement de la phytothérapie :

Depuis la nuit des temps, les hommes apprécient les vertus apaisantes et analgésiques des plantes [4].

C'est au médecin Parisien Henri Leclerc (1870-1955) que nous devons le concept de phytothérapie. Il est l'auteur de plusieurs articles sur l'utilisation des plantes médicinales ; parus pour la plupart, dans la presse médicale et d'ouvrage publiés sous le titre de précis de phytothérapie ; dans lequel, il livre la somme de ses connaissances [2].

La mise à jour de la phytothérapie repose désormais entre les mains d'un petit nombre de chercheurs en pharmacie et d'universitaires qui en dépit des obstacles, travaillent d'arrache pied par des recherches pharmacologiques et cliniques sur les propriétés et les utilisations possibles des plantes médicinales [2].

Dans les laboratoires, des chercheurs récupèrent de précieux échantillons et les dissèquent. Déjà 170000 molécules ont été identifiées à partir de plantes : digitaline, quinine, morphine, Colchicine [5].

Aujourd'hui encore les deux tiers de la pharmacopée ont recours à leur propriété curative [6].

1.1.2. Définition :

Etymologiquement la phytothérapie vient du grec phytos qui veut dire plantes et thérapia qui veut dire soins ou traitement [1].

La phytothérapie est donc l'art de se soigner par les plantes médicinales [1, 7].

C'est le traitement curatif ou préventif des maladies et des troubles subjectifs par l'utilisation de préparations obtenues à partir de plantes entières ou d'organes de plantes-feuilles, fleurs, racines, fruits, graines [2].

La plante ou l'organe utilisé pour ses propriétés médicinales contient toujours plusieurs principes [2].

La phytothérapie n'est qu'une des branches de la connaissance des plantes médicinales, vaste ensemble qui comprend aussi la phytochimie, la phytopharmacie et la phytopharmacologie.

Elle décrit les possibilités et les limites de l'application des produits phytothérapeutiques aux indications de médecine humaine. Elle intéresse principalement les médecins et les paramédicaux ayant recours aux plantes médicinales [2].

1.1.3. Les classes de la phytothérapie :

On en distingue deux sortes :

1.1.3.1. La phytothérapie classique :

Ce sont les formes galéniques que l'on utilisait au siècle dernier : infusion, décoction, macération [1,7].

A partir des données de la phytothérapie classique et grâce aux nombreuses recherches physico-chimiques, on a pu déterminer les propriétés pharmacologiques et pharmacodynamiques de la plantes.

Grace à ces recherches, nous en sommes venus aux gélules, ce que nous nommons la nouvelle phytothérapie [1].

1.1.3.2. La phytothérapie moderne :

De nombreux laboratoires ont mis au point différents procédés d'utilisation des plantes avec un mode d'administration plus facile [7].

Les gélules sont pratiques à emporter, d'une prise orale facile ressemblant à la prise allopathique qui est rentrée dans toutes les mentalités [1].

1.1.4. Historique des plantes médicinales :

Les vertus médicinales des plantes sont reconnues dans le monde entier depuis des millénaires. Les plantes médicinales étaient utilisées aussi bien dans la Chine impériale que dans l'ancienne Egypte [8].

Près de 2000 ans avant Jésus Christ, le roi assyrien Hammourabi encourageait la culture des plantes médicinales [9].

Les traditions égyptiennes et arabes ont été reprises par les civilisations gréco-romaines d'où sont issus des médecins célèbres comme Hippocrate, puis les plantes médicinales ont franchi les frontières jusqu'en Europe centrale où elles ont été cultivées dans les monastères. Au moyen âge, il y eut des herbiers très populaires, dont certains plusieurs fois ont été réédités pour vulgariser la connaissance des vertus médicinales de la nature [8].

1.1.5. Définition d'une plante médicinale :

On appelle plante médicinale toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capable de prévenir, soulager ou guérir des maladies [10].

Les plantes médicinales ou pharmaceutiques sont celles qui, après avoir été séchées ou traitées selon d'autres méthodes interviennent dans la préparation des médicaments [7].

En médecine les remèdes tirés des plantes portent le nom de préparations galéniques [7].

1.1.6. Culture et amélioration des plantes médicinales :

1.1.6.1. Culture

La plupart des plantes utilisées en médecine populaire sont indigènes. D'autres sont cultivées depuis des siècles dans nos jardins.

Pour se procurer les grandes quantités nécessaires de certaines drogues, on est obligé de cultiver des plantes, même si elles croissent à l'état sauvage [11].

1.1.6.2. Amélioration

Son but est de produire des plantes médicinales de haute qualité et faciles à cultiver avec l'obtention d'une forte teneur en principes actifs en choisissant pour la reproduction d'une espèce ; les individus les plus intéressants ou en modifiant expérimentalement le patrimoine héréditaire de l'espèce considérée [11].

1.1.7. Récolte :

La récolte des échantillons constitue une opération importante, on doit la réaliser avec soin puisque les plantes sont destinées à être conservées : choix de la période, conditions, procédés [12].

1.1.7.1. Epoque de la récolte :

La composition chimique d'une plante médicinale varie avec le cycle végétatif de la plante.

Les variations peuvent être qualitatives : apparition d'un principe actif et disparition d'un autre.

Elles peuvent être quantitatives : la teneur en principes actifs peut passer par un maximum et décroître ensuite rapidement [11,13].

D'une manière générale :

- Les parties souterraines se récoltent soit en automne, c'est-à-dire après que la plante y a accumulé ses réserves, soit au printemps, avant que ces réserves ne soient mobilisés [14].
- Les écorces sont détachées au printemps, au moment de la montée de la sève, ou en automne, au début de la période de repos [11].
- Le bois est récolté au début ou à la fin de la période de la croissance donc au printemps ou en automne [15].
- Les tiges herbacées et les feuilles sont recueillies au début de floraison [11].
- Les fleurs et les sommités fleuries sont souvent cueillies un peu avant leur complet épanouissement [11].
- Les fruits doivent être cueillis très mûres pour être consommés immédiatement mais toutefois les cueillir un peu avant leur maturité lorsque l'on veut les faire sécher [3].
- Les semences doivent être récoltées à complète maturité, lorsque la plante commence à se dessécher un peu [14].

1.1.7.2. Conditions et modalités de la récolte :

Seule les plantes très saines doivent être récoltées. Par ailleurs, quelle que soit la plante ou la partie de la plante que l'on veut obtenir, la récolte doit être faite par temps sec et non orageux après le lever du soleil et la disparition de la rosée [14].

Les plantes à huile essentielle sont cueillies le matin avant le lever du soleil.

Les procédés de récolte sont variables :

- Souvent la récolte à la main est nécessaire, c'est le cas pour de nombreuses fleurs.
- Parfois elle est mécanisée : récolte des parties aériennes, des sommités fleuries, de certains fruits ou certaines graines [11].

1.1.8. Conservation des plantes médicinales :

Les plantes médicinales doivent être conservées dans de bonnes conditions.

Les principes actifs peuvent subir des hydrolyses, des oxydations, des isomérisations aboutissant à une perte d'activité de la drogue [16].

Ces dégradations peuvent être évitées par différents moyens, les principaux sont :

1.1.8.1. La dessiccation :

La teneur en eau d'un matériel frais est généralement élevée, 80% dans une feuille, 75% dans une racine, 35% dans une écorce.

La dessiccation a pour but d'abaisser cette teneur en eau de telle façon que les réactions enzymatiques ne puissent plus avoir lieu, en même temps, elle évite la prolifération sur la drogue, des bactéries et des moisissures [11, 16].

De nombreuses méthodes sont utilisées :

1.1.8.2. Séchage à l'air libre :

- Au soleil : il est pratiqué dans les pays à climat chaud et sec pour les plantes peu fragiles.
- A l'ombre et sous abri : on étale les plantes sur des claies ou on les suspend en bouquets dans des hangars ou des séchoirs bien ventilés [11, 16].

1.1.8.3. Séchage par l'air chaud :

On dispose, le plus souvent, de séchoirs-tunnels, dont on règle la température et la ventilation [11, 16].

1.1.8.4. Séchage sous vide :

A chaud, il est peu pratiqué.

A froid, c'est la cryodessiccation ou lyophilisation qui est une dessiccation par sublimation directe de l'eau du végétal préalablement congelé [11, 16].

1.1.8.5. La stabilisation :

La stabilisation dénature irréversiblement les enzymes.

On distingue plusieurs méthodes de stabilisation :

1.1.8.5.1. Traitement par l'alcool bouillant :

La drogue convenablement divisée est projetée par petites quantités dans l'alcool bouillant, les enzymes sont détruites, mais en même temps sont extraits tous les principes de la plante soluble dans l'alcool [11].

1.1.8.5.2. Utilisation de la chaleur humide :

- Vapeurs d'alcool :

La stabilisation s'effectue en autoclave au sein de vapeurs d'alcool à 95°, il y a, à la fois action dénaturante de la chaleur et de l'alcool.

- Vapeur d'eau :

On remplace ici les vapeurs d'alcool par des vapeurs d'eau. Ce procédé n'est utilisé que pour les drogues peu fragiles : racines, écorce, graines [11].

1.1.8.6. Le stockage :

Un échantillon de plante médicinale mal conservé ou trop ancien perd une grande partie de sa valeur thérapeutique.

Une bonne conservation dépend des conditions de stockage et des matériaux employés [12].

Elle nécessite certaines précautions car il faut limiter l'action de certains facteurs :

- Air, favorable aux réactions d'oxydations ;
- Humidité, pouvant faciliter le développement de moisissures sur la drogue et la détérioration des principes actifs ;
- Lumière, à l'origine des phénomènes lumi-altération ;
- Protection de l'échantillon de l'attaque des animaux : rongeurs, insectes, et autres parasites [9,11].

1.1.9. Modes de préparation des plantes médicinales :

Les plantes peuvent s'employer de différentes manières, voici les préparations les plus courantes :

Bains :

Immersion du corps tout entier ou d'une partie seulement dans le liquide préparé à cet effet. Il peut être aromatique émollient, stimulant, fortifiant. Les bains stimulent et rafraichissent le corps, ils constituent en outre un excellent tranquillisant [3].

Cataplasmes :

Préparations de consistance pâteuse que l'on applique sur la peau, on emploie généralement de la farine, de lin ou de la fécule de pomme de terre, ils peuvent être rubéfiants, émollients, calmants [3].

Compresse :

Elles stimulent les tissus et les organes au travers de la peau, on les utilise en cas de blessures [3].

Décoction :

La décoction consiste à faire bouillir dans de l'eau les plantes de 5 à 20 minutes. Si les drogues sont finement coupées, 5 minutes suffisent ; si elles sont dures ou ligneuses, 20 minutes sont nécessaires pour en faire une bonne extraction, surtout si les plantes ont été préalablement trempées dans l'eau froide et lentement amenées à ébullition [10].

Inhalations :

Les inhalations utilisent les effets de la vapeur d'eau chaude mélangée à l'arome de substances volatiles, comme l'eucalyptus, le thym ou le romarin, elles s'obtiennent en plongeant l'herbe sélectionnée dans l'eau bouillante en recouvrant la tête, les épaules et le récipient avec une même serviette, inspirer puis expirer profondément pendant 15 minutes [3].

Infusions :

On verse l'eau bouillante sur les plantes dans un récipient dont le couvercle ferme bien et on laisse extraire 5 à 15 minutes puis on filtre [17].

Lavements :

Préparations liquides destinées à être introduites par le rectum dans le gros intestin, infusion ou décoction de plantes émoullientes, calmantes ou purgatives [3].

Lotions :

Liquides obtenus par infusion ou décoction de plantes émoullientes ou vulnérables que l'on utilise en les passant sur la partie à soigner à l'aide d'un coton hydrophile [3].

Macérations :

La macération est une extraction aqueuse opérée à la température ordinaire pendant quelques heures, généralement 2-12h [10,17].

Teintures :

Résulte du contact prolongé de l'alcool à divers degrés, avec des plantes sèches L'action de l'alcool sur les substances végétales permet d'obtenir la dissolution de leurs principes actifs [17].

Pommade :

En mélangeant la plante choisie avec une substance grasse comme la vaseline, les huiles de coco ou d'amandes [3].

L'extrait :

Ce sont des macérations aqueuses ou alcooliques que l'on concentre plus ou moins par évaporation, on obtient de cette manière des extraits fluides, épais, ou solides [3,17].

Le sirop :

Dissolution de 180g de sucre dans 100g d'eau à laquelle est incorporé le principe thérapeutique voulu [3].

La poudre :

Les plantes séchées à l'ombre sont finement coupées puis pulvérisées dans un mortier [10].

1.1.10. Modes d'utilisation des plantes médicinales :

Les divers modes de préparation à base de plantes sont susceptibles d'être utilisés de différentes façons.

La médecine végétale, et ses nombreuses applications thérapeutiques possibles, pratique deux usages distincts :

1.1.10.1. L'usage par voie interne :

Il est un moyen d'action thérapeutique consistant uniquement en l'ingestion par voie buccale de tisanes généralement préparées sous forme d'infusion ou de décoction, de même que tout autre produit d'origine végétale présente sous forme extractive.

On recourt plus accessoirement à la poudre, aux sucs et à la cendre des végétaux [17].

1.1.10.2. L'usage par voie externe :

Consiste essentiellement à recourir à diverses formes d'application locales ainsi qu'aux bains partiels et généraux; en vue d'agir thérapeutiquement sur des régions distinctes du corps [17].

1.2. Généralités sur la plante étudiée

1.2.1. Introduction

Parmi les arbres et arbustes persistants cultivés dans les jardins ou comme arbres ornementaux, beaucoup ne sont pas originaires du bassin méditerranéen, mais ont été importés de pays étrangers, souvent depuis des siècles et sont depuis en partie adoptés, c'est principalement le cas des espèces d'eucalyptus utilisées pour le reboisement ou plantées pour la production de pâte à papier.

En Italie et dans les pays subtropicaux, des espèces d'eucalyptus, ont été plantés avec succès pour l'assèchement de zones marécageuses [8].

Eucalyptus vient du grec eu « bien » et kalypto « je recouvre » soit je recouvre bien allusion au couvercle du bouton floral qui a pour fonction de recouvrir les étamines [18].

1.2.2. Historique de l'*Eucalyptus globulus* :

Cet eucalyptus a été découvert par Labillardiere, naturaliste qui accompagnait l'expédition de l'explorateur français Bruni d'Entrecasteaux en Tasmanie en 1791.

En 1792, il lui a donné le nom d'*Eucalyptus globulus* Labill[19].

L'espèce a été introduite en Europe pour la première fois vers 1804 mais c'est grâce aux efforts de Ramel à son retour d'Australie en 1857, que des plantations ont été créées dans le sud de l'Europe et en Afrique du nord.

A peu près à la même date, des eucalyptus (principalement *globulus*) ont été introduits au Portugal, en Californie, en Amérique du nord, au Chili (1823), en Afrique du sud (1828), en Inde (1843), en Argentine (1857), en Egypte et en Andalousie.

Dès 1883, Balbino mentionne la présence d'*Eucalyptus globulus* en Europe et indique que les arbres ont été plantés pour la première fois près de Santander en Espagne en 1863. Ces plantules venaient des îles d'Hyères, près de Toulon en France.

Les arbres mère de ces plantules provenaient des collectes faites par Labillardiere en Tasmanie, puisque à l'époque il n'aurait pas été possible de trouver de graines provenant d'autres collections [19].

1.2.3. Dénominations internationales :

La dénomination internationale selon AIT YOUCEF [18] est la suivante :

Français : Eucalyptus globuleux, arbre à fièvre, gommier bleu, eucalyptus officinal.

Anglais: blue gum tree, fever tree

Allemand: Eukalyptus blatter

Arabe: Kalitus, calibtus kofer

1.2.4. Habitat et répartition :

1^{er} Eucalyptus introduit en Europe et en Amérique du nord [20].

Le gommier bleu pousse à l'état naturel en Tasmanie mais aussi dans une partie à l'état de Victoria, au sud-est du continent australien, c'est probable l'espèce d'Eucalyptus la plus couramment cultivée car elle pousse bien partout à condition que les hivers ne soit pas froids. En grande Bretagne, elle survit rarement à plus de 3 à 4 hivers, sauf dans les régions protégées, mais cela lui suffit néanmoins pour atteindre 10 m de hauteur.

Dans le nord-est de l'Espagne et dans d'autres régions chaudes, on cultive fréquemment cet arbre forestier, pour son bois utilisé principalement pour faire de la pâte à papier [21].

Le gommier bleu est introduit en Algérie en 1856 par Ramel qui l'importe d'Australie dans le but d'assainir les régions marécageuses, cet arbre aimant les régions humides. Depuis on le retrouve sur tout le littoral Algérien et marocain [3].

Au Maroc, on voit ces Eucalyptus de la même façon que dans la plupart des régions tempérées et relativement humides du pays.

En Tunisie, 92 espèces d'Eucalyptus sont retrouvées cultivées dans la plupart des régions des grandes plaines littorales [18].

1.2.5. principales espèces d'Eucalyptus :

Les principales espèces d'Eucalyptus sont les suivantes :

- *Eucalyptus globulus* : très en faveur autrefois en Afrique du nord ;
- *Eucalyptus rostrata* : il couvre des surfaces tres importante en Afrique du nord, espèce rustique et plus tolérante vis-à-vis des sols carbonaté et de la sécheresse ;

- *Eucalyptus gomphocephala* : très intéressant car il pousse très bien sur le calcaire. Introduit en Californie, Afrique du sud, Espagne, Afrique du nord ;
- *Eucalyptus citriodora* : son huile essentielle lui procure une odeur de citronnelle et de verveine ;
- *Eucalyptus cladocalyx* : a été introduit sur toutes sortes de sols et climats, cet Eucalyptus est très répandu en Australie ;
- *Eucalyptus astringens* : se contente de terrains pauvres. Exploité d'une façon excessive pour son tanin [22].

1.2.6. Situation botanique :

La classification d'*Eucalyptus globulus* selon GHEDIRA [23] est la suivante :

1.2.6.1. Classification phylogénétique :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtaceae

Genre : Eucalyptus

Espèce : *Eucalyptus globulus*

1.2.6.2. Classification classique :

Règne : végétal

Embranchement : Phanérogames

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Dialypétales

Série : Caliciflores

Ordre : Myrtales

Famille : Myrtacées

Genre : Eucalyptus

Espèce : *Eucalyptus globulus*

1.2.7. Description botanique :

L'Eucalyptus est un arbre originaire d'Australie où il compose plus de 90% des Forêts naturelles. Le genre est très vaste puisqu'on dénombre près de 700 espèces [24].

1.2.7.1. L'aspect :

Grand arbre, hétérophyle, poussant rapidement, pouvant atteindre 80 à 100m de hauteur en Tasmanie, et 40m en région méditerranéenne, à tronc lisse [16, 25, 26,27], 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 [23,28].

1.2.7.2. Les rameaux :

Les rameaux jeunes sont des tiges quadrangulaires ailées, elles sont pruineuses à leur surface, ses rameaux adultes sont des tiges cylindriques, leur surface est dépourvue de pruine [18].

1.2.7.3. Les feuilles :

Les feuilles sont de deux sortes, selon qu'elles proviennent de jeunes plants ou de rameaux plus âgés [29].

- Les feuilles jeunes :

Sont opposées, sessiles, embrassantes, de forme ovale oblongue, cordée à la base [27,28].

Elles mesurent de 10 à 15cm de long sur 4 à 8cm de large [18,30].

Leur limbe est entier, il renferme dans son mésophyle des nodules sécréteurs visibles par transparence, sa nervure médiane est proéminente à la face inférieure, les nervures secondaires se détachent sous un angle assez ouvert de la nervure

médiane et se réunissent en une ligne marginale ondulée, jeunes rameaux et jeunes feuilles sont de teinte vert glauque et recouverts d'un enduit cireux pruineux [18,31] (Figure 1.1).

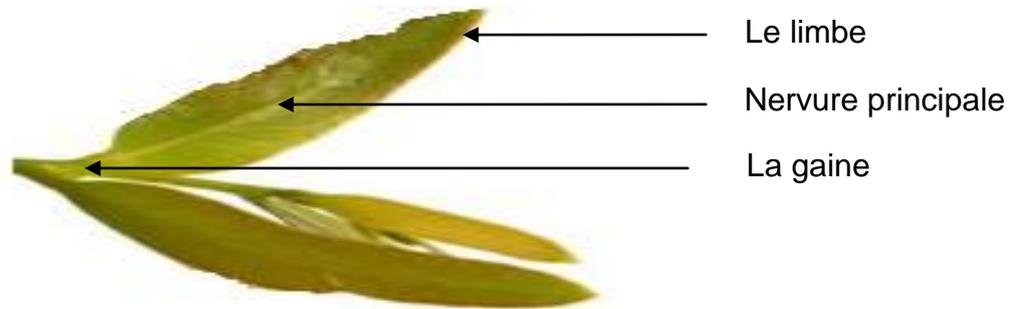


Figure 1.1 : Feuille jeune d'*Eucalyptus globulus* (original).

- Les feuilles adultes :

Sont alternes, pendantes, coriaces, courtement pétiolées, elles sont à la fois falciformes et lancéolées. Elles font de 16 à 25cm de long sur 2 à 5cm de large [13,31].

Leur limbe est entier à faces semblables et présente des nodules nombreux translucides qui sont les poches sécrétrices d'une huile aromatique d'une odeur balsamique forte et très agréable [3]. Ce limbe est assez mince et cassant une fois desséché, la nervure médiane et proéminente à la face inférieure, les nervures secondaires se détachent de la nervure principale sous un angle aigu et dessinent une ligne marginale festonnée comme sur le limbe des feuilles jeunes [18].

Le feuillage adulte est vert gris [32] (Figure 1.2).

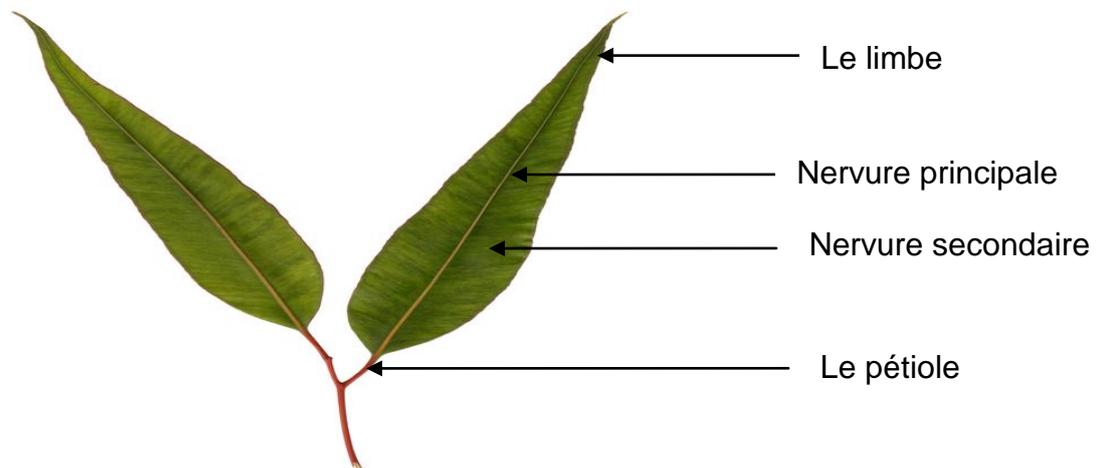


Figure 1.2 : feuille adulte d'*Eucalyptus globulus* (original).

1.2.7.4. La fleur

Souvent solitaire ou par 3 ou 7 en ombelles mellifères [23].

Elle ressemble schématiquement à une sorte de boîte s'ouvrant par un couvercle, ayant la forme d'une urne quadrangulaire dont les quatre arêtes saillantes correspondent aux quatre sépales .Le couvercle formé par les quatre pétales se détache à l'anthèse, laissant apparaître de nombreuses étamines à long filet blanchâtre et disposées en bouquets [3, 33,31].

L'ovaire est infère à 4 loges multiovulées donne à maturité une capsule ligneuse, en pyramide quadrangulaire renversée déhiscente au sommet [3, 31,34] (Figure 1.3).



La fleur

Figure 1.3 : la fleur d'*Eucalyptus globulus* (original).

1.2.7.5. Le fruit

Bleu prumineux, de 1 à 1,5cm de long et de 1,5 à 3cm de large, globuleux, aplati au sommet et parcouru de quatre sillons, se prolongeant dans le pédoncule [21,33] (Figure1.4).



Sillons

Figure 1.4 : le fruit d'*Eucalyptus globulus* (original).

1.2.8. Culture :

L'*Eucalyptus globulus* est bien acclimaté dans les régions tempérées chaudes, il ne supporte pas les températures au dessous de +4°C, sa multiplication se pratique par semis des graines à l'automne dans des godets sous serre.

On repique les plants au printemps, et on récolte les feuilles durant tout l'été en choisissant les plus allongées et étroites, portées par les rameaux âgés [20].

La grande majorité des espèces ne tolèrent que de très légères gelées. Leur résistance à la sécheresse varie également.

Les eucalyptus survivent rarement à la transplantation et les plantes en contenant ne durent pas très longtemps.

Ils apprécient le plein soleil à tous les stades de leur croissance [20].

1.2.9. Composition chimique :

La teneur en huile essentielle est comprise entre 5 et 35 ml/kg. Le 1,8-cineole est le constituant majoritaire (70-80%), les autres constituants sont majoritairement terpéniques [13]. La feuille renferme également de l'eau, des matières minérales, des lipides, un tanin, une résine, des substances particulières de découverte récente dénommées « euglobals » qui sont des hétérocycles oxygénés à structure acylphoroglucinol-mono ou sesquiterpénique, des flavonoïdes de plusieurs sortes tels que rutoside, hyperoside, et flavones méthylés.

Enfin des acides phénols et composés phénoliques [31].

1.2.10. Propriétés thérapeutiques :

On a introduit depuis quelques temps dans la thérapeutique les feuilles d'*Eucalyptus globulus*, qui ont les propriétés suivantes :

- Une propriété balsamique, ayant la fonction d'un baume adoucissant pour les muqueuses respiratoires [3,20].
- Une propriété antiseptique des voies respiratoires et à ce titre, il soigne les rhumes, gripes et maux de gorge [29,35].
- Une propriété astringente et fébrifuge [29].
- Une propriété hypoglycémiant et vermifuge [36].
- Une action détoxifiante vis-à-vis des toxines diphtériques et tétaniques, et antimicrobienne sur les bactéries Gram+ [18].

- Une action anti catarrhale [29].

1.2.11. Mode d'emploi :

Le mode d'emploi se réalise en deux usages :

1.2.11.1. Usage interne :

- En infusion à raison de 25 à 30g de feuilles par litre d'eau, infusion à laquelle, on peut ajouter 2-3 bourgeons de sapin par tasse, valable dans le traitement du catarrhe des bronches, de la bronchite aiguë, toux et rhume [3, 37].
- En sirop [37].
- En mâchant les feuilles fraîches pour calmer les maux de dents [29].
- En poudre pour les feuilles séchées et réduites.
- En suppositoires pour le traitement des affections pulmonaires et des gripes [38].
- En ampoules injectables [38].

1.2.11.2. Usage externe :

En fumigation et gargarisme contre les maux de la gorge [3].

Fumigation d'huile essentielle ou vit le malade, à raison de 10 gouttes par litre d'eau [3].

Les feuilles sont appliquées en cataplasme sur la tête pour faire baisser la fièvre [18].

1.3. Les principaux principes actifs chez *Eucalyptus globulus*

Chaque espèce végétale contient un certain nombre de substances, lesquelles sont tirées du métabolisme de la plante et s'élaborent comme produits secondaires.

Eucalyptus globulus serait composé principalement de l'huile essentielle, flavonoïdes et de tanin, c'est pourquoi nous nous intéresserons qu'à ces trois familles de principes actifs.

1.3.1. Les huiles essentielles :

1.3.1.1. Définition :

Les huiles essentielles, appelées communément « essences », constituent l'ensemble des substances odorantes volatiles présentes dans les végétaux, leur volatilité les opposant aux huiles fixes qui sont des lipides. Ces huiles essentielles sont des mélanges de constituants plus ou moins complexes, et se présentent généralement sous forme liquide [39].

La définition AFNOR précise qu'il s'agit de produits obtenus soit à partir de matières premières naturelles par entraînement à la vapeur d'eau, soit à partir de l'épicarpe des fruits de citrus par des procédés mécaniques et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques, soit enfin par distillation sèche [31,39].

Pour la huitième édition de la pharmacopée française, les huiles essentielles sont des produits de composition généralement assez complexe renfermant les principes volatils contenus dans les végétaux et plus ou moins modifiés au cours de la préparation [13].

En France, l'huile essentielle d'Eucalyptus est définie comme étant obtenue par entraînement à la vapeur d'eau suivi de rectification à partir des feuilles fraîches ou des tiges terminales fraîches de plusieurs espèces d'Eucalyptus riches en 1,8-cineole. Les espèces principalement utilisées sont *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker et *Eucalyptus smithii* R.T. Baker [39].

Selon la monographie de pharmacopée européenne cinquième édition, l'huile essentielle d'eucalyptus de qualité pharmaceutique, du point de vue de sa composition, doit être conforme aux caractéristiques chimiques suivantes (tableau 1.1) [31].

Tableau 1.1 : Limites définies par la pharmacopée européenne pour certains composants de l'huile essentielle d'eucalyptus [31].

α pinène	état de traces
β pinène	moins de 1,5%
α phellandrene	moins de 1,5%
Limonène	état de traces à 12,0%
1,8-cineole	au minimum 70,0%
Camphre	moins de 0,1%

1.3.1.2. Historique :

Les huiles essentielles ont été utilisées depuis des millénaires. Ainsi, leur usage est rapportée dans la civilisation égyptienne, qui recherchait au Liban les produits extraits du cèdre afin d'embaumer les momies. Lors des Croisades, la connaissance empirique par les Arabes de la préparation et de certaines propriétés thérapeutiques des huiles essentielles sera introduite en Europe vers le XI^e siècle et celles-ci feront leurs preuves lors des grandes épidémies de peste au XIV^e siècle [31].

A partir du XI^e siècle, l'usage des huiles essentielles est largement répandu.

Aux XVIII^e et XIX^e siècles, les connaissances chimiques sur la composition des huiles essentielles s'affinent avec les progrès de la chimie analytique. Des scientifiques tels que le Français Valnet [14] parvient à identifier certains composants spécifiques des végétaux et à isoler les principes actifs de quelques huiles essentielles. Aujourd'hui de nombreux ouvrages précisent les méthodes de contrôle à mettre en place afin de garantir leur qualité [31].

1.3.1.3. Répartition et localisation :

1.3.1.3.1. Répartition :

Les huiles essentielles, sont largement réparties dans le règne végétal, certaines familles en sont particulièrement riches (Conifères, Rutacées, Myrtacées, Umbellifères, Labiées, Composées) [11].

Elles peuvent se rencontrer dans tous les organes végétaux : sommités fleuries (lavande, menthe), mais aussi feuilles (Eucalyptus), écorces, racines, fruits, bois. Dans une même plante, elles peuvent être présentes à la fois dans différents organes, la composition des essences peut alors varier d'un organe à l'autre [11].

1.3.1.3.2. Localisation :

Les essences peuvent être localisées dans des cellules sécrétrices isolées (Lauracées), mais on les trouve le plus souvent dans des organes sécréteurs : poches sécrétrices schizogènes (Myrtacées), canaux sécréteurs (Conifères), poils sécréteurs (Labiées) [11].

1.3.1.4. Rôle dans la plante :

Beaucoup de plantes produisent les huiles essentielles en tant que métabolites secondaires, mais leur rôle dans les processus de la vie de la plante est mal connu [40].

Pour certains auteurs, les huiles essentielles auraient un rôle attractif vis-à-vis des insectes et favoriseraient donc la pollinisation. Pour d'autres, elles exerceraient une action antiseptique vis-à-vis de certains microorganismes (champignons) et auraient donc un rôle protecteur [11].

1.3.1.5. Propriétés physiques :

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun un certain nombre de propriétés physiques.

- Ce sont des liquides à la température ordinaire [11,13].
- Leur volatilité les oppose aux huiles fixes [11].
- Elles sont généralement incolores ou jaunes pâles quand elles viennent d'être préparées [13].
- Leur densité, est le plus souvent inférieure à celle de l'eau [13].
- Elles sont douées de pouvoir rotatoire, et possèdent un indice de réfraction souvent élevé [13].
- Solubles dans les solvants organiques usuels et très peu solubles dans l'eau [11].

- Elles sont très altérables, sensibles à l'oxydation, elles ont tendance à se polymériser en donnant lieu à la formation de produits résineux [11].

1.3.1.6. Composition chimique :

La composition chimique d'une huile essentielle est assez complexe. On y trouve généralement de nombreux constituants. Ceux-ci appartiennent principalement à deux grands groupes chimiques :

- Les composés terpéniques
- Les composés aromatiques dérivés du phenylpropane

Les huiles essentielles peuvent également renfermer divers produits issus de dégradation de composés non aromatiques [11,13].

1.3.1.6.1. Composés terpéniques :

Ils sont formés d'unités isopréniques (en C5) et comprennent :

- Les mono terpènes (C10)
- Les sesquiterpènes (C15)
- Les di terpènes (C20)
- Les tri terpènes (C30)

La biosynthèse des terpenoides implique l'addition de l'unité isoprène avec son isomère pour former le geranyl di phosphate (C10) précurseur des mono terpènes ; condensé avec une autre unité isopentenyle pyrophosphate forment le di phosphate de farnesyle (C15) à l'origine des sesquiterpènes.

Les précurseurs parentaux compte tenu de la modification structurale par l'oxydation, la réduction, l'isomérisation, et/ou d'autres transformations donnent une variété de terpenoides [11,41].

Les mono et sesquiterpènes sont les composants principaux des huiles essentielles, ils peuvent être acycliques (myrcenes), monocycliques (limonène), bi cycliques (pinène, camphene), tricycliques, etc. [40].

A côté des hydrocarbures, on rencontre des dérivés oxygénés divers : alcools, aldéhydes, époxy, cétones, acides (Figure 3.1) [11,40].

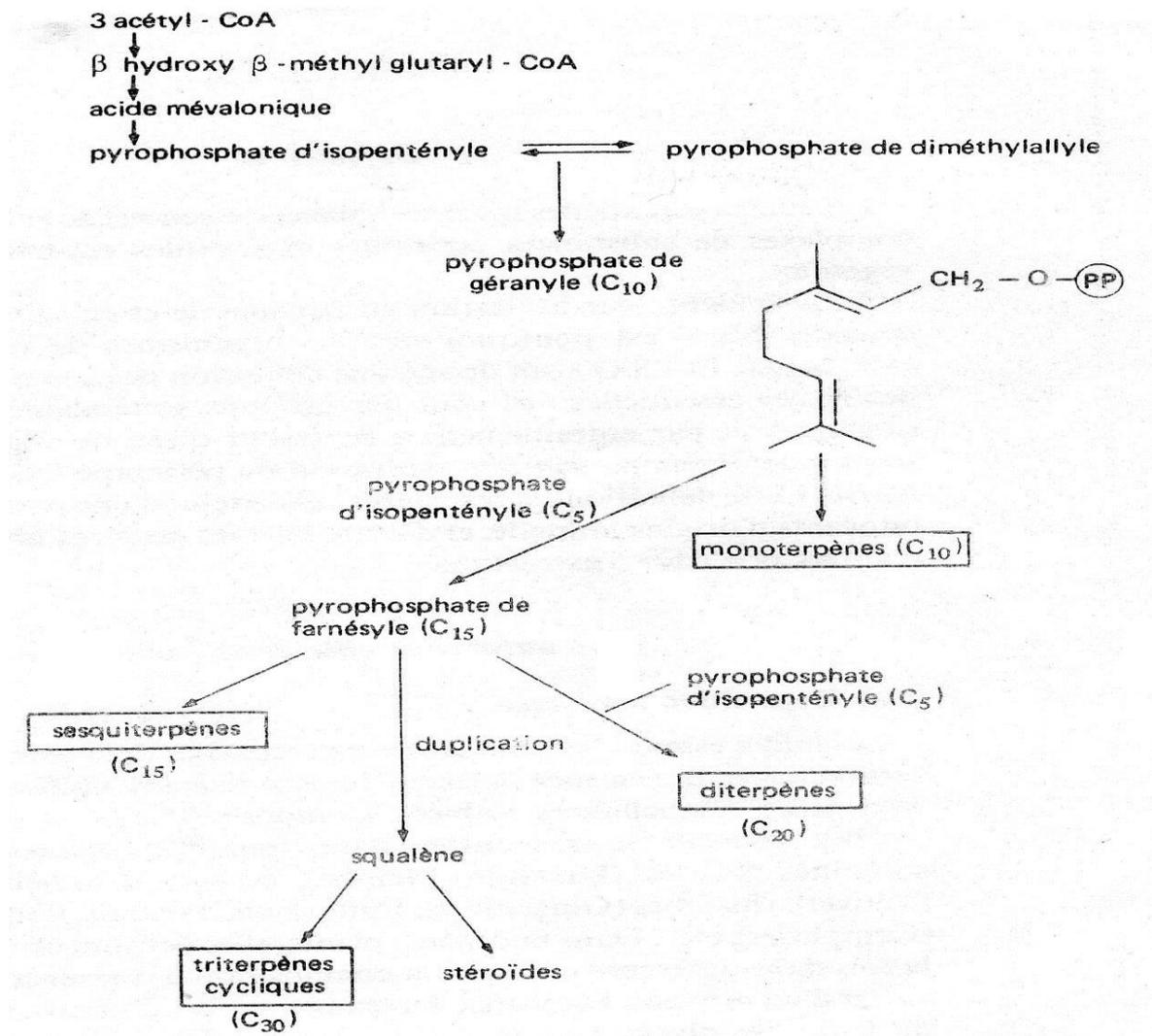


Figure 1.5 : biogénèse des terpènes [11].

1.3.1.6.2. Composés aromatiques dérivés du phenylpropane :

Les huiles essentielles renferment aussi des composés aromatiques plus particulièrement des composés « phenyl propanoïdes ».

Leur biogénèse conduit à l'acide préphenique précurseur de phénylalanine, de la tyrosine et d'autres composés en C₆-C₃, à partir de l'acide shiquimique. Ainsi sont obtenus divers composés naturels ; certains possèdent, dans leur chaîne latérale, une liaison éthylénique : exemple dérivés de l'acide et de l'aldéhyde

cinnamiques ; d'autres sont porteurs de groupements OH ou OCH₃ sur le cycle aromatique, d'autres à structure enC₆-C₁ [11,40].

1.3.1.7. Propriétés physiologiques:

Les huiles essentielles ont des propriétés médicinales nombreuses et variées. Elles agissent quasiment dans tous les domaines de la santé et de la maladie.

Propriétés digestives :

Les huiles essentielles favorisent la motricité intestinale, stimulent les fonctions hépatobiliaires, ont un pouvoir anti fermentaire [42].

Propriétés antiseptiques :

- Au niveau respiratoire (huile essentielle d'eucalyptus)
- Au niveau des voies urinaires

Propriétés tonifiantes

Elles ont un effet stimulant, dynamisant du système nerveux. Certaines ont des effets aphrodisiaques.

Les huiles essentielles sont anti-inflammatoires :

Elles sont donc très utilisées pour traiter les troubles articulaires inflammatoires, les tendinites [42].

Propriétés endocrino-régulatrices :

Les huiles essentielles exercent une action régulatrice sur l'ensemble des glandes endocriniennes de l'organisme. Elles peuvent rééquilibrer le système endocrinien, favorisent l'équilibre de la production hormonale [42].

1.3.1.8. Emplois :

1.3.1.8.1. En pharmacie :

Les plantes à huile essentielle peuvent être utilisées :

Pour leurs actions physiologiques.

Pour l'isolement de certains constituants (eugenol,anethole,pinenes).

Comme excipients de nombreux médicaments [11].

1.3.1.8.2. Dans l'industrie

Parfumerie et cosmétologie :

De nombreux parfums sont toujours d'origine naturelle et certaines huiles essentielles constituent des bases de parfums irremplaçables [11].

Alimentation :

Les huiles essentielles sont très utilisées comme aromatisants des aliments [11].

1.3.2. Les flavonoïdes:

1.3.2.1. Introduction:

Les flavonoïdes, au sens strict, sont des pigments jaunes, généralement poly phénoliques, présents dans de très nombreuses espèces végétales, dans les feuilles, les fleurs, le pollen et les fruits. Leur concentration augmente avec l'exposition au soleil, constituant de ce fait un écran protecteur contre les photo- et thermo dégradations [43].

Les flavonoïdes sont le plus souvent sous forme d'hétérosides ou flavonosides dont les genines sont des dérivés de la phenylchromone [11].

Dans les flavonoïdes au sens large, on inclut tous les composés en $C_6.C_3.C_6$ comprenant en plus les dérivés du phenyl-chromane ou flavannes ; ce sont :

- Les catéchols (catéchines) ou dérivés de l'hydroxy3-flavanne
- Les proanthocyanidols ou dérivés du di-hydroxy 3 ,4flavanne [11].

1.3.2.2. Distribution :

A ce jour, la présence des flavonoïdes chez les algues n'a pas été démontrée. Les flavonoïdes sont fréquents chez les bryophytes.

Chez les ptéridophytes ou il n'y a pas de grandes variétés structurales des flavonoïdes on retrouve des bi flavonoïdes, les O hétérosides de flavonols et des chalcones.

Chez les gymnospermes, les proanthocyanidols sont constants. C'est chez les angiospermes que la diversité structurale des flavonoïdes est maximale : ainsi une trentaine de types flavonoidiques ont pu être identifiés chez les Asteraceae [13].

1.3.2.3. Localisation :

Les formes hétérosidiques des flavonoïdes hydrosolubles, s'accumulent dans les vacuoles et selon les espèces, se concentrent dans l'épiderme des feuilles ou se

repartissent entre l'épiderme et le mesophylle. Dans les fleurs elles sont concentrées dans les cellules épidermiques [13, 44].

1.3.2.4. Constitution chimique :

Les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et par conséquent possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbone, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (A, B) reliés par une chaîne en C₃ [13] (Fig 1.6).

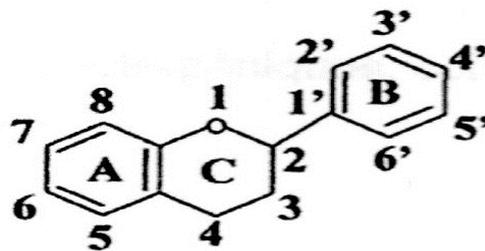


Figure 1.6 : Structure de base des flavonoïdes [13].

Il y a six classes des flavonoïdes, qui diffèrent par leur structure chimique : flavanols, flavones, flavonols, flavonones, isoflavone et anthocyanidines [45].

1.3.2.5. Origine biosynthétique:

La biosynthèse des flavonoïdes se fait à partir d'un précurseur commun la 4,2',4',6'-tétra hydroxychalcone, cette chalcone tend à métaboliser sous l'action d'enzyme la chalcone isomérase, en naringénine. Sur cette dernière agit la flavone synthase pour donner apigénine ou le dihydroflavonol.

Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase, se métabolise en kaempférol ou en leucoanthocyanidol. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3,4-ols et anthocyanidols [13, 46], ce dernier, sous l'action de la 3-O-glycosyl transférase se transforme en anthocyanoside (Appendice B) [47,48].

1.3.2.6. Action physiologique :

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse, leur action se situe au niveau des petites veines ou des capillaires [11].

En dehors de cette action physiologique générale, certains flavonoïdes possèdent des activités particulières : diurétique (fleur du genêt), antispasmodique, antiulcéreux, anti inflammatoire et anti hépatotoxique [11].

Ce sont des antioxydants efficaces, ayant la capacité de piéger les radicaux libres. In vitro, ils ont montré une inhibition de la croissance de diverses variétés de lignées de cellules cancéreuses d'animaux de laboratoire [49].

1.3.2.7. Propriétés physicochimiques :

Les flavonoïdes sont des solides cristallisés dont la teinte varie du blanc ivoire au jaune vif [11].

Les hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool, insolubles dans les solvants organiques apolaires.

Les flavonoïdes sont solubles dans les solutions alcalines en donnant une coloration jaune.

Ils possèdent un spectre d'absorption dans l'ultraviolet [11].

1.3.2.8. Emplois :

Anciennement employées comme colorants.

Un certain nombre de drogues à dérivés flavoniques sont utilisées aujourd'hui en thérapeutique, soit en nature, soit pour l'extraction des flavonoïdes [11].

1.3.3. Les tanins :

1.3.3.1. Définition :

Le terme de tanins désigne théoriquement les composés phénoliques hydrosolubles, de structure variée, de saveur astringente, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible.

Leur poids moléculaire est compris entre 500 et 3000, capables de précipiter les alcaloïdes et les protéines [43].

1.3.3.2. Répartition :

Les tanins sont très répandus dans le règne végétal, sont particulièrement abondants dans certaines familles : Cupulifères, Polygonacées, Rosacées, Légumineuses, Myrtacées, Rubiacées.

Ils peuvent exister dans divers organes : racines ou rhizomes, écorces, bois, mais on en trouve aussi dans les feuilles, les fleurs, les fruits et les graines.

Ils sont localisés dans les vacuoles des cellules, ils sont quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes.

Leur teneur est parfois très élevée, 70% dans la galle du chêne, 10 à 40% dans certaines écorces [11].

1.3.3.3. Classification :

La classification admise actuellement est établie d'après la constitution chimique des différents tanins, ceux-ci sont divisés en deux groupes :

- Tanins hydrolysables
- Tanins condensés [40].

1.3.3.3.1. Les tanins hydrolysables :

Anciennement appelés tanins pyrogalliques, ce sont des polyesters de glucides et d'acides phénols. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes (tannases) en oses et en acide – phénols.

Selon la nature de celui-ci, on distingue les tanins galliques et les tanins ellagiques [40].

Les tannins galliques ou gallo- tannins donnent par hydrolyse, des oses et de l'acide gallique (figure 1.7).

Les tanins ellagiques ou ellagi-tannins sont scindés par les acides ou les enzymes en oses et en acide ellagique (figure 1.8).

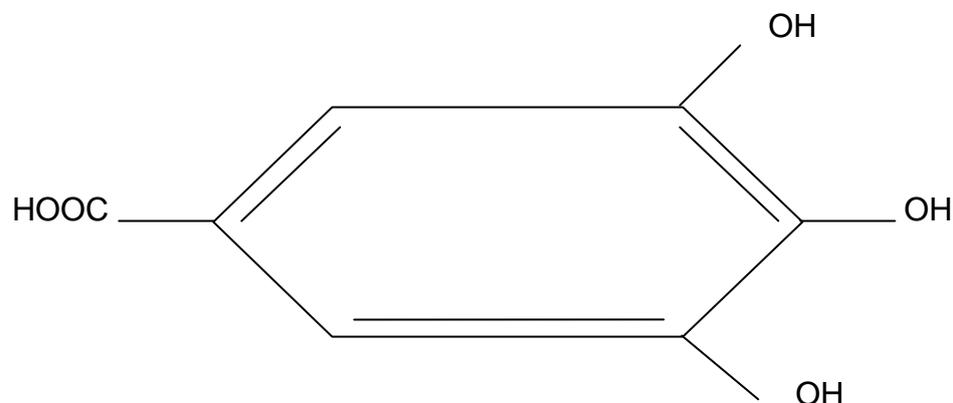


Figure 1.7 : structure chimique d'acide gallique [43].

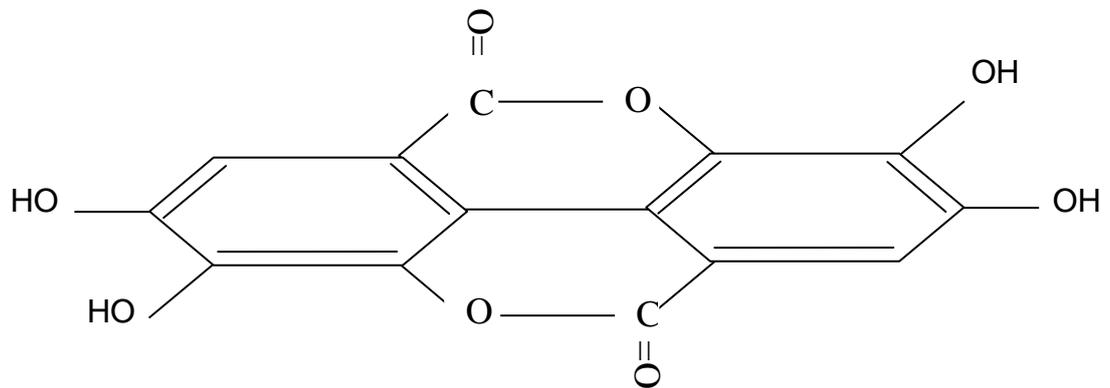


Figure 1.8 : structure chimique d'acide ellagique [43].

1.3.3.2. Les tanins condensés:

Les tanins condensés sont des polymères flavaniques. Ces tanins se rencontrent chez l'ensemble des végétaux, des fougères aux plantes à fleurs.

A la différence des tanins galliques, ils ne s'hydrolysent pas sous l'action des acides minéraux dilués, ils ont au contraire, tendance à se polymériser pour donner des produits de coloration rouge ou brune, nommés phlobaphènes insolubles dans de très nombreux solvants [40] (figure 1.9).

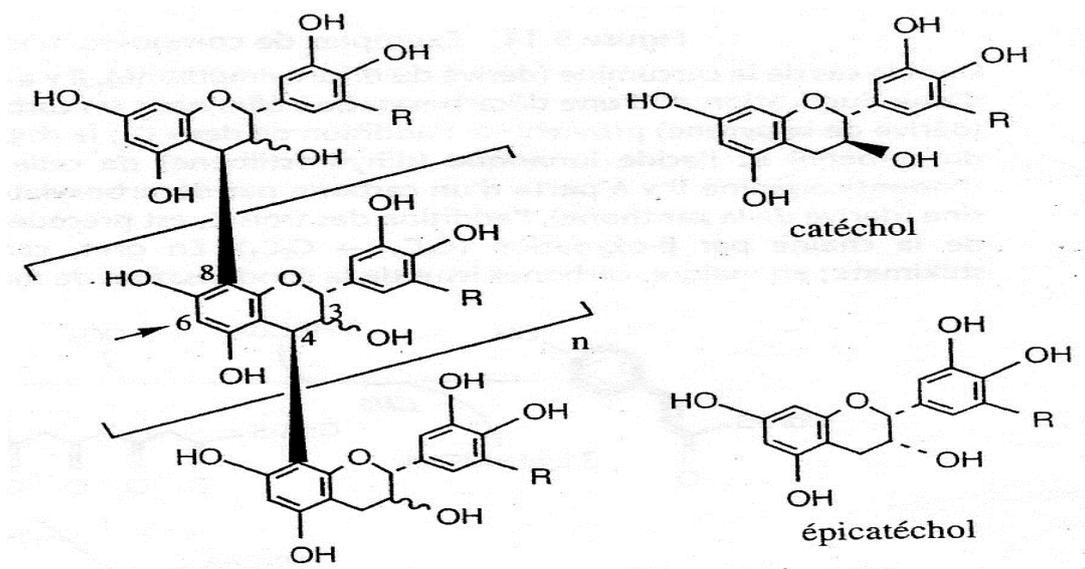


Figure 1.9 : les tanins condensés [40].

1.3.3.4. Structure des tanins :

1.3.3.4.1. Structure des tanins hydrolysables :

En règle générale, les tanins galliques sont des esters de l'acide gallique et du glucose.

- tanins hydrolysables monomères :

Le penta ester est le tanin le plus commun. Il occupe une position centrale dans le métabolisme des tanins [13].

- tanins hydrolysables oligomères :

Le couplage oxydatif (C-C ou C-O-C) intermoléculaire explique l'existence d'un grand nombre d'oligomères ellagiques de masse moléculaire comprise entre 2000 et 5000. La distribution des formes oligomères des tanins hydrolysables semble limitée aux dicotylédones [13].

1.3.3.4.2. Structure des tanins condensés :

Initialement fondée sur le nom de l'anthocyanidols formés lorsque le polymère est traité à chaud par un acide [13].

Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavanne 3-ols (catéchols ou catéchines) ou de flavanne 3,4 diols (leuco anthocyanes ou proanthocyanidols)

Ils peuvent aussi résulter de l'union de ces deux types de molécules [11].

Le catéchol peut se trouver à l'état de monomère mais il ne possède pas alors de propriétés tannantes. Les proanthocyanidols ne sont jamais sous forme monomères ; la forme la moins condensée est la forme biflavanne, l'union se fait le plus souvent par les carbones 4 et 8 et les carbones 4 et 6 [11].

1.3.3.5. Propriétés physicochimiques :

Selon Paris et Hurabielle [11] et Bruneton [13], les tanins sont des corps amorphes, solubles dans l'eau et dans l'alcool, insolubles dans les solvants organiques apolaires.

Les tanins sont précipités par les sels de métaux lourds : fer, plomb, zinc, cuivre ; avec les sels ferriques, les tanins galliques et ellagiques donnent des colorations et des précipités bleu- noir et les tanins condensés des précipités brun- verdâtre ,

ainsi ils sont précipités par l'eau de chaux, la baryte, le tungstate de sodium, le réactif de Stiasny ou formol chlorohydrique (tanins catechiques uniquement).

Les tanins ont la propriété de précipiter les albumines, c'est la raison pour laquelle ils transforment la peau animale en cuir [50].

Les tanins possèdent des propriétés réductrices vis-a- vis des acides phosphotungstiques, phosphomolybdiques, du ferricyanure ferriques, etc. [11].

1.3.3.6. Biogenèse :

On admet aujourd'hui que l'acide gallique dérive de l'acide shikimique :

- Soit par l'intermédiaire de l'acide 5- dehydroshikimique [11] (Figure 1.10).

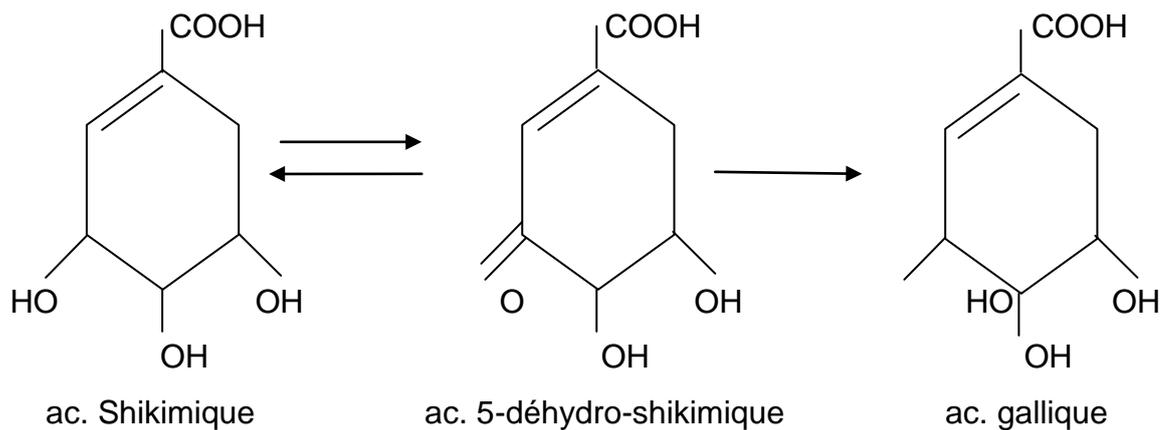


Figure 1.10 : la biogénèse des tanins à partir de l'acide 5- dehydroshikimique [11].

- Soit à partir des dérivés du phenylpropane [11] (Figure 1.11).

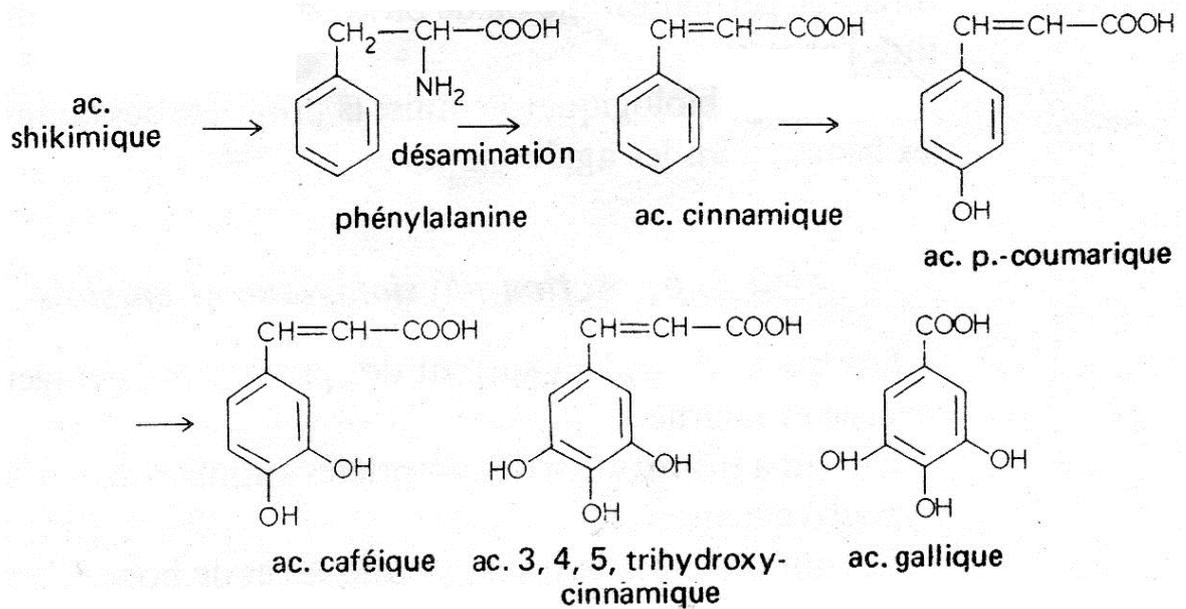


Figure 1.11 : la biogénèse des tanins à partir du phenylpropane [11].

Il dérive aussi de produits de la dégradation du glucose. Des molécules d'acide gallique s'associent ensuite sous forme de depsides, liés à des oses, pour donner des tanins plus ou moins complexes [11].

D'autre part, selon Paris et Moyse [16], les catéchols sont considérés comme les précurseurs des tanins catechiques.

1.3.3.7. Propriétés biologiques :

La plupart des propriétés biologiques des tanins sont liées au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines (enzymes digestives et autres, protéines fongiques ou virales).

Selon Paris et Moyse [16] et Bruneton [13], les différentes propriétés des tanins sont :

- Astringente à l'extérieur
- Anti- diarrhéique à l'intérieur (ralentit le péristaltisme intestinal)
- Action antiseptique
- Vaso- constricteur de petits vaisseaux (hémorroïdes, blessures superficielles)
- Anti- inflammatoires dans les cas de brûlures

- Cholagogues notamment l'acide gallique

Les familles des plantes riches en tanins sont astringentes, elles forment sur les blessures ou sur les muqueuses une mince couche de coagulation. Elles sont très efficaces en compresses ou en bains, en cas d'inflammation, d'enflures ou de rougeurs. Pour les tisanes, on recherche les plantes dans lesquelles le tanin est accompagné d'essences. Ces thés sont désinfectants et soulagent en cas de bronchite, de stomatite ou d'hémorroïdes. Mais les tanins deviennent rapidement corrosifs, et il faut être prudent en cas de diarrhées graves ou de brûlures [9].

Les tanins possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes, antivirales et hypoglycémiantes, ce sont des inhibiteurs enzymatiques et de bons contre-poisons des alcaloïdes et des métaux lourds [11].

1.3.3.8. Emplois des tanins :

Les emplois sont nombreux :

- En pharmacie, on les utilise pour leur action astringente, comme anti-diarrhéiques, vasoconstricteurs (veines et petits vaisseaux) et hémostatiques mais surtout comme protecteurs veineux dans le traitement des varices et hémorroïdes ;
- En cosmétologie, ce sont aussi des astringents très utilisés notamment sous forme de lotions ;
- Dans l'industrie, ils sont largement employés, dans l'industrie du cuir surtout, dans celle de vernis et peintures [11].

1.3.3.9. Toxicité :

La toxicité potentielle des tanins pour l'homme est plutôt mal connue.

On reconnaît par contre bien le risque que représentent, pour le bétail, les glands, et les jeunes feuilles des chênes. Le pronostic de l'intoxication marquée par une constipation initiale opiniâtre et une atteinte rénale profonde est généralement sombre. Là encore on ne sait pas si ce sont les tanins ou leurs métabolites qui sont les véritables agents toxiques [13].

1.3.3.10. Rôle des tanins chez les plantes :

Selon Guignard [40], le rôle des tanins dans la plante est mal connu, l'importante quantité de tanins rencontrée chez les plantes parasitées correspond à une réaction de défense. La disparition des tanins chez de nombreux fruits lors de leur maturation indique qu'ils peuvent être réutilisés par la plante, mais beaucoup de tanins apparaissent plutôt comme des substances de déchet.

CHAPITRE 2

MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel biologique

Notre étude biologique porte principalement sur *Eucalyptus globulus* Labill. Appelé également “ Tasmanien Blue gum”, du fait que cette espèce est de la plus grande importance, utilisée dans le traitement des affections respiratoires.

2.1.1. Matériel végétal

La plante a été récoltée durant le mois de juin 2009 au niveau de l'université Saad Dahleb de Blida. La récolte a été effectuée sur les parties aériennes(les feuilles) de la plante.

Pour l'ensemble de nos expérimentations, nous avons utilisés approximativement 3Kg de matière végétale fraîche.

Des échantillons ont été conservés à l'état frais afin de pouvoir déterminer la teneur en eau et le rendement en huile essentielle. Tout le reste de la récolte a été séché à l'air libre dans un endroit sec et aéré, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Les feuilles ainsi séchées ont été pulvérisées pour obtenir une poudre fine à l'aide d'un broyeur électrique. Ces poudres ont été utilisées pour les différentes extractions.

2.1.2. Matériel bactériologique

Les tests antibactériens et anti fongiques ont été réalisés sur les souches suivantes provenant du laboratoire de contrôle de stérilité du complexe antibiotical Sidal Médéa et sont :

Les bactéries Gram positif :

- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus subtilis*
- *Enterococcus faecalis*
- *Salmonella typhimurium*

Les bactéries Gram négatif :

- *Escherichia coli*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Les levures :

- *Candida albicans*

2.2. Matériel non biologique

- Cf. Appendices C et D

2.3. Méthodes

Lieu d'expérimentation :

Nos expérimentations ont été réalisées sur une durée d'une année, de mai 2009 à juin 2010, et ont été effectuées au niveau :

- Du laboratoire de recherche de biologie végétale du département de biologie de l'université Saad Dahleb de Blida ;
- Du laboratoire de chimie organique du département de chimie industrielle de l'université Saad Dahleb de Blida ;
- Du laboratoire de contrôle de qualité de l'institut national spécialisé de la formation professionnelle de Bougara wilaya de Blida.

2.3.1. Identification botanique de la plante

L'identification botanique de l'échantillon, récolté sur le terrain, a été faite au laboratoire de botanique du département d'agronomie de l'université Saad Dahleb de Blida, de plus un certain nombre d'ouvrages essentiels a été consulté et on cite à titre d'exemple l'abrégé de matière médicale : Paris et Hurabielle, (1980). D'autres ouvrages plus récents ont été utilisés pour la reconnaissance de l'espèce tels que : plantes médicinales de Kabylie (Ait Youcef, 2006) ; plantes médicinales d'Algérie, (Delile, 2007).

Pour l'identification, nous avons procédé à l'examen macroscopique de la fleur et du fruit en comparaison à ceux archivés au niveau de l'herbier de département d'agronomie de l'université Saad Dahleb.

2.3.2. Analyses phytochimiques

2.3.2.1. Détermination de la teneur en eau :

Le matériel végétal a été pesé après séché dans l'étuve réglée à 75°C, toutes les 24h jusqu'à obtention d'un poids constant [51].

La teneur en eau est donnée par la relation :

$$T \% = (PF - PS) / PF \times 100$$

T : teneur en eau en pourcentage

PF : poids frais en gramme

PS : poids sec en gramme

2.3.2.2. Détermination de l'humidité dans la poudre

L'humidité est une perte de masse lors de séchage de la matière végétale. Les plantes médicinales ne doivent pas contenir une quantité d'humidité dépassant la norme qui est estimée de 12 à 15%.

Le contenu en humidité de la poudre a été déterminé par le procédé de séchage à l'étuve à une température réglée à 105°C pendant 2 h jusqu'à l'obtention d'un poids constant [52,53].

le pourcentage d'humidité est calculé par la formule suivante :

$$H\% = (M - M1) / M \times 100$$

M : masse d'échantillon frais en g

M1 : masse d'échantillon après le séchage en g

2.3.2.3. Détermination des matières minérales :

Le mode opératoire consiste à porter au four à moufle la capsule en porcelaine contenant la prise d'essai p (1g) séchée. Chauffer progressivement afin d'obtenir une combustion sans inflammation de la masse pendant 1h 30 mn à 200°C puis 2 h 30 mn à 500°C.

L'incinération doit être poursuivie jusqu'à combustion complète du charbon formé et obtention d'un résidu blanc ou gris clair. Après Refroidissement toute la nuit

mettre la capsule contenant le résidu de l'incinération au dessiccateur, puis peser rapidement.

Soit P1 le poids des cendres contenues dans la capsule. La teneur en matières minérales est donnée par la relation :

$$\text{Teneur en MM\%} = P1 / P \times 100$$

2.3.2.4. Détermination des matières azotées totales :

L'azote total est dosé par la méthode de KJELDAHL selon le protocole de DIDIER [54].

Minéralisation :

Opérer sur un échantillon de 1g. L'introduire dans un matras de 250ml, ajouter 2g de catalyseur (composition est en appendice C) et 20 ml d'acide sulfurique concentré. Porter le matras sur le support d'attaque et chauffer jusqu'à l'obtention d'une coloration verte stable. Laisser refroidir, puis ajouter peu à peu avec précaution 200ml d'eau distillée en agitant et en refroidissant sous un courant d'eau.

Distillation :

Transvaser 50 ml du contenu du matras dans l'appareil distillateur, rincer la Burette graduée. Dans un erlenmeyer destiné à recueillir le distillat, introduire 20 ml de l'indicateur (composition est en appendice C).

Verser lentement dans le matras de l'appareil distillateur, 50 ml de lessive de soude, mettre en marche l'appareil, laisser l'attaque se faire jusqu'à l'obtention d'un volume de distillat de 100ml au moins, titrer en retour par de l'acide sulfurique N/50 jusqu'à l'obtention à nouveau de la couleur initiale de l'indicateur.

$$N_g = X \cdot 0.0007 \cdot 100 / Y \cdot 200 / A$$

X : descente de la burette (ml)

Y : poids de l'échantillon de départ

A : volume de la prise d'essai.

$$\text{Teneur en MAT} = N_g \times 6.25$$

2.3.2.5. Extraction des principaux principes actifs de l'*Eucalyptus globulus* :

Nous avons procédé à l'étude des principes actifs de l'*Eucalyptus globulus* par les méthodes d'extraction ainsi que les méthodes d'analyses biochimiques.

2.3.2.5.1. Huile essentielle :

2.3.2.5.1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

2.3.2.5.1.1.1. Principe :

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.

La partie contenant les composés hydrosolubles est appelée hydrolat.

2.3.2.5.1.1.2. Mode opératoire

L'opération se déroule en quatre étapes :

- Extraction par entraînement à la vapeur d'eau

1180g de matériel végétal frais est placé dans un ballon d'extraction alimenté par un courant de vapeur d'eau après avoir vérifié le bon fonctionnement du dispositif que nous venons de chauffer, après ébullition de l'eau, les vapeurs, en traversant la matière végétale, font éclater les cellules et entraînent avec elles l'huile. Après condensation et liquéfaction, l'huile surmonte l'eau de l'ampoule de décantation.

- Séparation liquide-liquide par ampoule à décanter :

La séparation des deux phases huile- eau est réalisée après la décantation du distillat par l'utilisation d'un solvant «éther di éthylique» sélectionné pour son affinité vis- vis des huiles essentielles.

- déshydratation par sulfate de sodium anhydre :

L'huile séparée de l'eau aromatique est déshydratée par sulfate de sodium anhydre pour éliminer toutes traces d'eau.

- Evaporation de l'éther di éthylique :

La phase obtenue (éther-huile) est évaporée sous pression réduite à une température de 50°C par un rota vapeur. Le résidu restant représente l'huile essentielle. Cette dernière est conditionnée dans des flacons 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.

2.3.2.5.1.2. Evaluation de quelques propriétés organoleptiques de l'huile essentielle :

L'appréciation des caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles consiste à évaluer l'aspect, l'odeur, et la couleur ; en utilisant les sens.

2.3.2.5.1.3. Calcul du rendement:

Le rendement en huile essentielle est le rapport entre le poids de l'huile extraite et le poids de la matière végétale utilisée.

Le rendement exprimé en pourcentage est calculé par la formule ci- dessous :

$$R_{HE} = (Ph / Pmv) .100$$

Où :

- R_{HE} : rendement de l'huile en %
- Ph : poids de l'huile en gramme
- Pmv : poids de la matière végétale utilisée en gramme

2.3.2.5.1.4. Analyse de l'huile essentielle par CG/ MS :

Les paramètres de l'instrument sont :

- Méthode SCAN en électron – impact (EI)
- Chromatographe HP 6890N
- Volume injecté : 1micronlitre
- Type de solvant : n-hexane
- La colonne est capillaire HP-5MS, longueur 30m, d i : 0,25mm, épaisseur du film 0,25 micron mètre
- La température initiale : 40°C (2mn)
- La température finale : 300°C

- La température de la source d'ionisation : 200°C
- Le gaz vecteur est l'hélium avec un débit de 1,4ml/mn
- L'analyse est effectuée sous ionisation à 70 eV
- L'identification est faite par comparaison des spectres de masses avec les banques de données NIST et WILEY.

2.3.2.5.1.5. Etude histologique:

Pour cette partie nous avons fait des coupes histologiques au niveau des feuilles, afin d'observer au microscope photonique les différents constituants histologiques de notre plante (*E.globulus*) et de localiser les poches de sécrétion des huiles essentielles.

- Préparation du végétal :

La récolte du végétal a été faite la matinée, donc l'échantillon était frais.

- confection des coupes :

Nous avons utilisé la technique de la double coloration.

Les feuilles sont coupées à main levée à l'aide d'une lame de rasoir. Le mouvement doit être rapide et le plan de la coupe doit être perpendiculaire au grand axe de l'organe pour avoir des sections très fines transversales.

Ces coupes ainsi réalisées, ont subi une série de traitements pour observations sous microscope photonique.

Ce traitement est résumé dans les étapes suivantes :

Un bain d'eau de javel pendant 3h, car les feuilles d'eucalyptus sont très épaisses, afin d'éliminer toute la chlorophylle.

Après rinçage à l'eau courante pendant 20mn, les coupes sont traitées par l'acide acétique 10% pendant 30 à 40 secondes pour faciliter la diffusion des colorants.

Elles sont ensuite lavées pendant 20 mn, et placées dans le vert de méthyle pendant 30 à 40mn.

Un rinçage est suivi à l'eau courante pendant 20mn pour éliminer l'excès de colorant.

Une deuxième coloration dans du rouge Congo pendant 10mn.

Après lavage à l'eau courante, les coupes sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.

2.3.2.5.2. Etude des composés non volatils polaires et non polaires :

2.3.2.5.2.1. Extraction

Les composés non volatils ont été extraits à l'aide du soxhlet.

2.3.2.5.2.1.1. Principe

L'extracteur de soxhlet est un appareil spécifique conçu pour l'extraction solide-liquide. Il permet le traitement de solides de toutes tailles avec des solvants en phase liquide ou partiellement vaporisés.

Le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant. La solution est soutirée périodiquement par l'amorçage d'un siphon. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit donc progressivement en composés solubles.

Le cycle peut se répéter indéfiniment, jusqu'à épuisement complet du solide (Figure 2.1) [57].

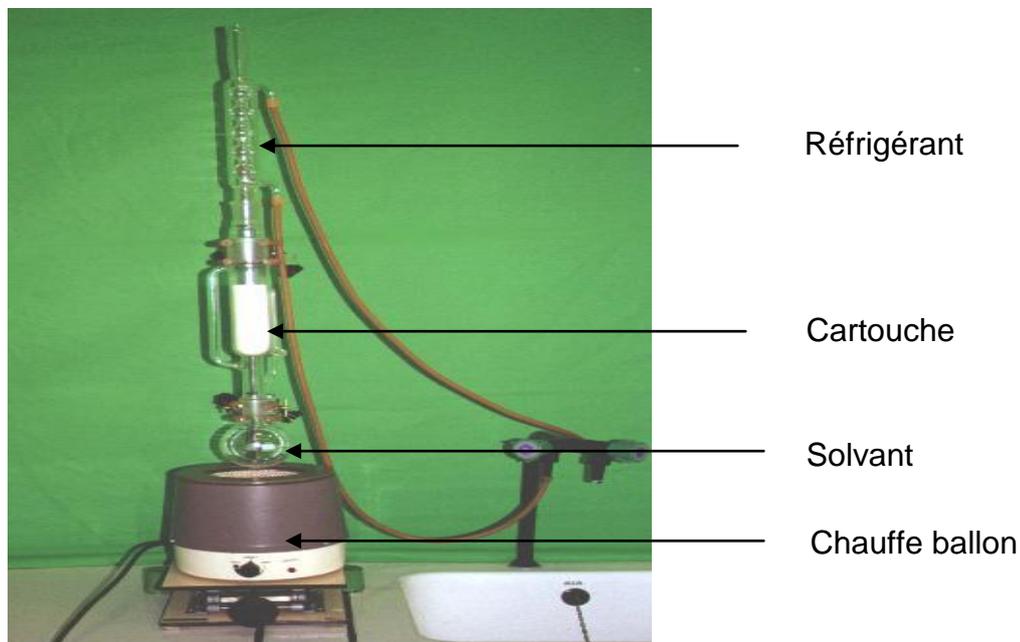


Figure 2.1 : Dispositif d'extraction (soxhlet) des composés non volatils par solvant

2.3.2.5.2.1.2. Protocole expérimental :

45g de la poudre végétale sèche, est enveloppée dans une cartouche en papier filtre afin d'éviter son entrainement avec le solvant et placée au niveau du soxhlet.

450ml d'éther de pétrole sont introduits dans un ballon à fond plat.

A l'aide d'une plaque chauffante, porter le solvant à ébullition, celui-ci passe par la tubulure et est condensé par le réfrigérant. Il tombe alors dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise la poudre.

Après une quinzaine de siphonages, nous récupérons, d'une part le ballon contenant le solvant et les substances solubles (concrète lipidique), d'autre part le marc qu'on laisse sécher à l'air libre.

Le marc séché est réintroduit dans une seconde cartouche en papier filtre et inséré pour la seconde extraction dans la nacelle du soxhlet, en utilisant cette fois ci du méthanol afin de récupérer les composés polaires solubles dans les alcools.

Après une dizaine de siphonages, nous récupérons le marc et le ballon contenant le solvant et la concrète polaire de la plante.

Pour le recyclage des solvants (éther de pétrole et méthanol), on a eu recours à une évaporation en utilisant l'évaporateur rotatif.

On obtiendra d'une part le solvant (éther de pétrole ou méthanol) et d'autre part le résidu sec.

Les ballons contenant les résidus secs sont pesés avant et après extraction afin de déterminer la teneur respective de chacune des substances.

2.3.2.5.2.2. Analyse de la concrète apolaire et polaire par spectrophotomètre UV-visible :

2.3.2 5 .2.2.1. Principe :

La spectrométrie d'absorption moléculaire dans l'UV et le visible qui permet, la mesure de la concentration d'un composé dissous dans une solution, s'effectue dans le domaine allant de 190nm à 800nm. A la température ambiante, la plupart des molécules sont dans leur état électronique et leur état de vibration fondamental. Ces molécules vont donc pouvoir absorber des photons UV-visible et changer leurs états énergétiques électroniques [58]. Ceci se traduit par une loi d'absorption : loi de Beer-Lambert :

$$A = E.L.C$$

A : absorbance (sans unité)

E : coefficient d'extinction molaire (cm². mol⁻¹)

C : concentration de la substance dans la solution mol/l

L : trajet optique en cm

2.3.2.5.2.2.2. Conditions opératoires :

Les concrètes apolaires et polaires sont reprises respectivement dans quelques ml d'éther et de méthanol. Elles sont soumises à un balayage en spectrophotomètre entre 220 et 800nm pour vérifier la présence de substances actives.

2.3.2.5.3. Les flavonoïdes:

2.3.2.5.3.1. Protocole d'extraction:

Nous avons suivi la méthode décrite par Bruneton [13] (figure 2.2).

Les flavonoïdes sont extraits à partir de l'eucalyptus à l'aide des alcools éthanol ou méthanol.

2.3.2.5.3.1.1. Macération et évaporation :

30g de matière végétale sèche pulvérisée sont mis dans 100ml de méthanol et laisser macérer pendant 72h.

Après filtration, l'extrait alcoolique doit être évaporé à l'aide d'un rotavapor. La température d'évaporation de méthanol est 60°C sous vide.

Le résidu sec obtenu est traité par 50ml d'eau tiède pour l'obtention d'un extrait aqueux.

2.3.2.5.3.1.2. Extraction liquide- liquide

L'extraction liquide- liquide est une opération qui permet la séparation d'un ou plusieurs constituants par des solvants non miscibles à l'eau.

- Élimination de la chlorophylle et les lipides par l'éther de pétrole :

Verser l'extrait aqueux dans l'ampoule à décanter, et ajouter 30ml d'éther de pétrole, laisser décanter, jusqu'à la formation de deux phases bien séparées.

Éliminer la phase organique, refaire sur plusieurs reprises jusqu'à l'élimination totale de la fraction lipidique et chlorophyllienne.

Récupération de la phase aqueuse.

- Élimination des genines libres

Ajouter à la phase aqueuse obtenue 30ml d'éther di éthylique, et laisser décanter. Formation de deux phases, récupérer l'hypo phase aqueuse avec élimination de l'épiphase (éther di éthylique et quelques genines libres). Refaire sur plusieurs reprises jusqu'à élimination totale des génines.

- Élimination des monosides

Verser 30ml d'acétate d'éthyle dans l'ampoule qui contient l'extrait aqueux. Laisser décanter, jusqu'à la formation de deux phases, procéder les mêmes démarches que celles décrites ci-dessus jusqu'à l'entraînement total des monosides.

- Récupération des flavonoïdes :

Pour la séparation des flavonoïdes, on procède à une extraction par du n – butanol, à l'aide d'une ampoule à décanter, deux phases apparaissent : L'hypo phase aqueuse de couleur brunâtre est éliminée. L'épiphase alcoolique de couleur verdâtre contenant les flavonoïdes est récupérée.

- Évaporation sous vide de butanol :

Le résidu sec est obtenu par évaporation du n- butanol grâce à un évaporateur rotatif. La température d'évaporation du butanol est de 55°C.

2.3.2.5.3.2. Calcul du poids de résidu des flavonoïdes :

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein et le poids du ballon vide.

$$M_f = P_2 - P_1$$

Où:

M_f : masse de l'extrait sec des flavonoïdes.

P₂ : poids du ballon avec l'extrait sec des flavonoïdes.

P₁ : poids du ballon vide.

2.3.2.5.3.3. Mise en évidence des flavonoïdes

La présence ou l'absence des flavonoïdes peut être mise en évidence par des réactions de caractérisation décrites par Makan [59].

- Préparation de l'infusé :

On met 3g de poudre avec 75ml d'eau dans une fiole. Le mélange est porté à ébullition pendant 15mn. On filtre et on laisse refroidir.

- Réactions générales de caractérisation des flavonoïdes :

- Coloration en milieu alcalin :

En milieu alcalin, les flavonoïdes se dissolvent facilement en donnant des colorations allant du jaune au brun.

A 2ml de l'extrait, on ajoute quelques ml de soude (0.1N) dans un tube à essai.

- Coloration par le perchlorure de fer (FeCl₃) :

Les flavonoïdes, du fait de la présence de fonctions phénoliques dans leurs genines, donnent des colorations variées avec des solutions diluées de FeCl₃.

A 2ml de la solution extractive, on ajoute 2 à 3 gouttes d'une solution diluée de FeCl₃ à 2%.

- Réaction de la cyanidine :

En solution alcoolique, en présence d'hydrogène naissant, produit in situ par action de l'acide chlorhydrique sur du zinc, les flavonoïdes donnent des colorations variées allant du rouge orangé au violet.

On introduit dans un tube à essai 2ml de l'extrait, on ajoute 2ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 96°C = 2 volumes, eau = 2 volumes, HCl concentré = 1 volume) avec 10 mg de zinc.

2.3.2.5.3.4. Analyse des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince :

2.3.2.5.3.4.1. Principe :

La CCM utilise des phases stationnaires fixées sur des supports rigides maintenues verticaux dans une cuve à chromatographie. La phase mobile est un solvant organique (ou un mélange de solvants) qui est déposé au fond de la cuve, à la base de la plaque de chromatographie. Cette phase mobile monte le long de la plaque par capillarité, les différentes étapes sont : dépôt, développement, révélation. La méthode CCM est efficace et rapide et associe la sensibilité à la simplicité [60,61].

Le support peut être différent de la cellulose, par exemple un gel, un échangeur d'ions, un adsorbant et, de ce fait, ses applications sont plus vastes.

2.3.2.5.3.4.2. Mode opératoire :

Le résidu sec obtenu est solubilisé dans quelques millilitres de méthanol afin de subir une chromatographie sur couche mince.

Pour cela on utilise :

La phase fixe est constituée d'une mince couche de gel de silice fixée sur une plaque d'aluminium de 20 x 20 cm et on dépose 10 μ L de notre échantillon.

La phase mobile ou éluant est composée de : :acétate d'éthyle/ acide acétique glacial/ acide formique/ eau distillée (9.5/0.9/1.1/2 v/v/v/v) [62].

La CCM comprend essentiellement trois phases :

Dépôt : 10 μ L de l'extrait sont déposés à 1cm du bord inférieur de la plaque [62].

Migration : Placer la plaque dans une cuve à chromatographie dans laquelle se trouve la phase mobile préalablement préparée. Après migration, le front du solvant est marqué avec le crayon et la plaque est séchée quelques minutes à l'étuve puis elle est prête pour la révélation.

Révélation : La révélation a été faite à 254nm, 365nm et avec le $AlCl_3$.

Chaque spot est caractérisé par sa couleur, sa fluorescence, et par son rapport frontal R_f qui doit être compris entre 0 et 1[62].

R_f = distance parcourue par la substance / distance parcourue par le front du solvant.

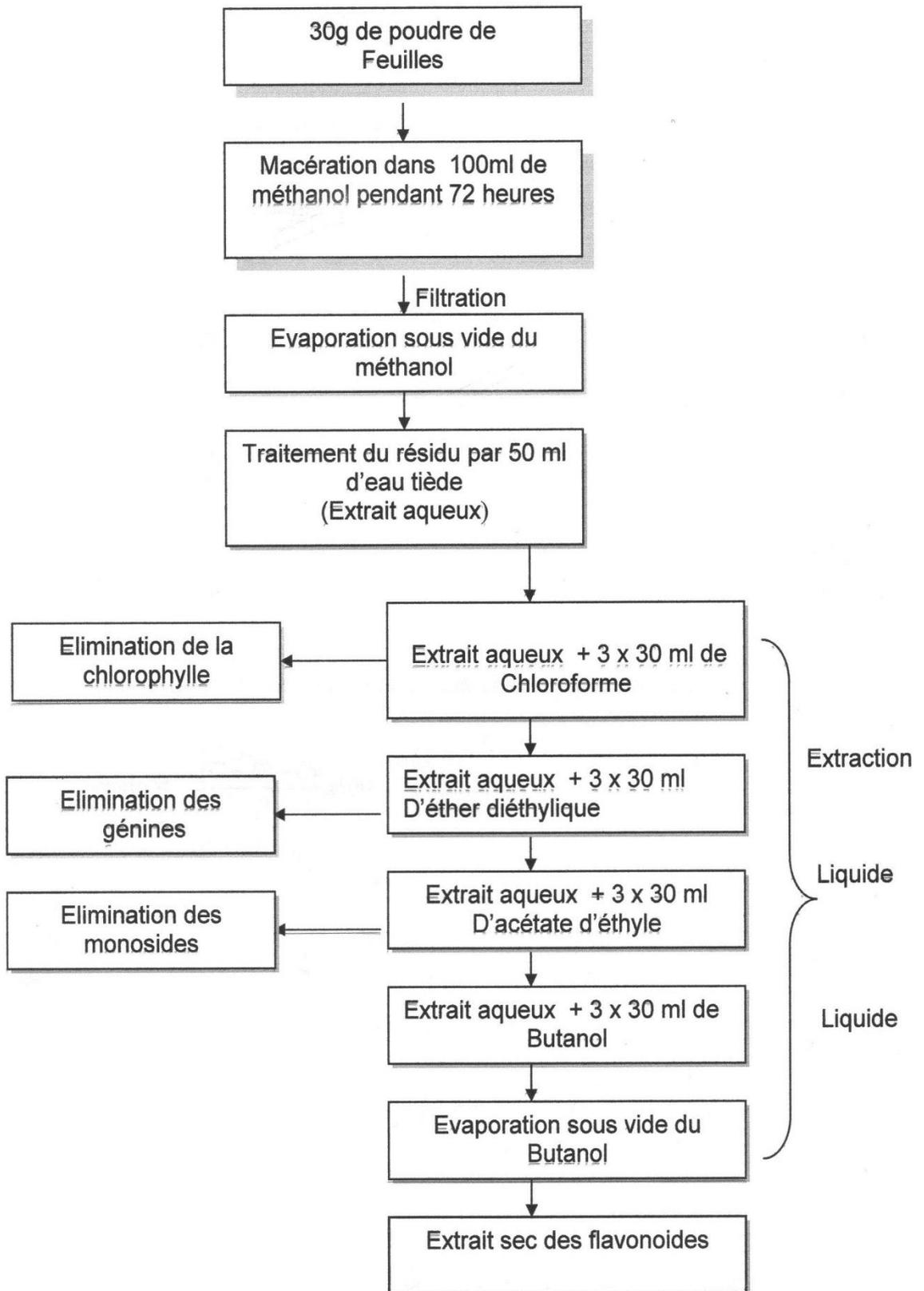


Figure 2.2 : protocole d'extraction des flavonoïdes

2.3.2.5.4. Les tanins :

2.3.2.5.4.1. Protocole d'extraction :

30g de poudre végétale ont été mis à macérer dans 100ml d'éther de pétrole pendant 24h, pour éliminer la chlorophylle et les lipides.

Après filtration, le résidu restant sur le papier filtre est épuisé par 50ml d'éther diéthylique pour la séparation de quelques composés phénoliques tels que les phénols, les catéchines, et l'acide oxybutyrique, ensuite il est filtré.

Epuiser à nouveau le résidu par 50ml d'acétate d'éthyle et filtrer pour éliminer les leuco anthocyanes, les pro anthocyanes et les éthers de l'acide oxybutyrique ; le résidu est repris par 100ml de méthanol et cela en laissant macérer pendant 45mn.

Le filtrat méthanolique est soumis à une évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à une basse température 40 à 50°C, le résidu sec contient un extrait pur de tanins (Figure 2.3) .

2.3.2.5.4.2. Etude quantitative des tanins :

Après extraction, la détermination du taux des tanins de l'échantillon récolté se fait par le calcul du rendement (RD). Il est calculé en pourcentage et correspond au rapport entre (ΔP) et la (M) de poudre x par 100 [52].

$$RD = \Delta P / M \times 100.$$

M : la masse de la poudre (30g)

ΔP : poids du résidu

2.3.2.5.4.3. Mise en évidence des tanins :

La présence ou l'absence des tanins peut être mise en évidence par des réactions de caractérisation décrites par Makan [59].

- Préparation de l'infusé :

Dans un erlenmeyer, on met 3g de poudre végétale à laquelle on ajoute 50ml d'eau bouillante. On laisse infuser pendant 30mn, puis on filtre.

- Réactions générales de caractérisation des tanins :

- Caractérisation par le chlorure ferrique :

A 5ml de filtrat, on ajoute quelques gouttes d'une solution de chlorure ferrique à 2 %, on agite ensuite et on laisse reposer.

- Caractérisation des substances tannantes hydrolysables :

Rajouter à 2ml d'infusé, quelques cristaux de NaNO_3 et 2 gouttes d'une solution d'acide chlorhydrique à 0.1N et on laisse reposer.

2.3.2.5.4.4. Analyse des tanins par CCM :

Le résidu sec obtenu est solubilisé dans quelques millilitres de méthanol afin d'effectuer une CCM.

2.3.2.5.4.4.1. Conditions opératoires :

- Phase stationnaire : Une plaque d'aluminium de 20x 20cm, chargée de gel de silice.
- Phase mobile : Eau distillée/ acide acétique/ butanol (28ml ; 12ml ; 40ml)

10 μL de l'extrait sont déposés à 1cm du bord inférieur de la plaque.

Après migration et séchage, la plaque a été observée sous lampe UV à 254nm et 366nm. La révélation est faite par vaporisation d'une solution de chlorure ferrique. Les couleurs des spots ont été enregistrées ainsi de même pour les R_f [63].

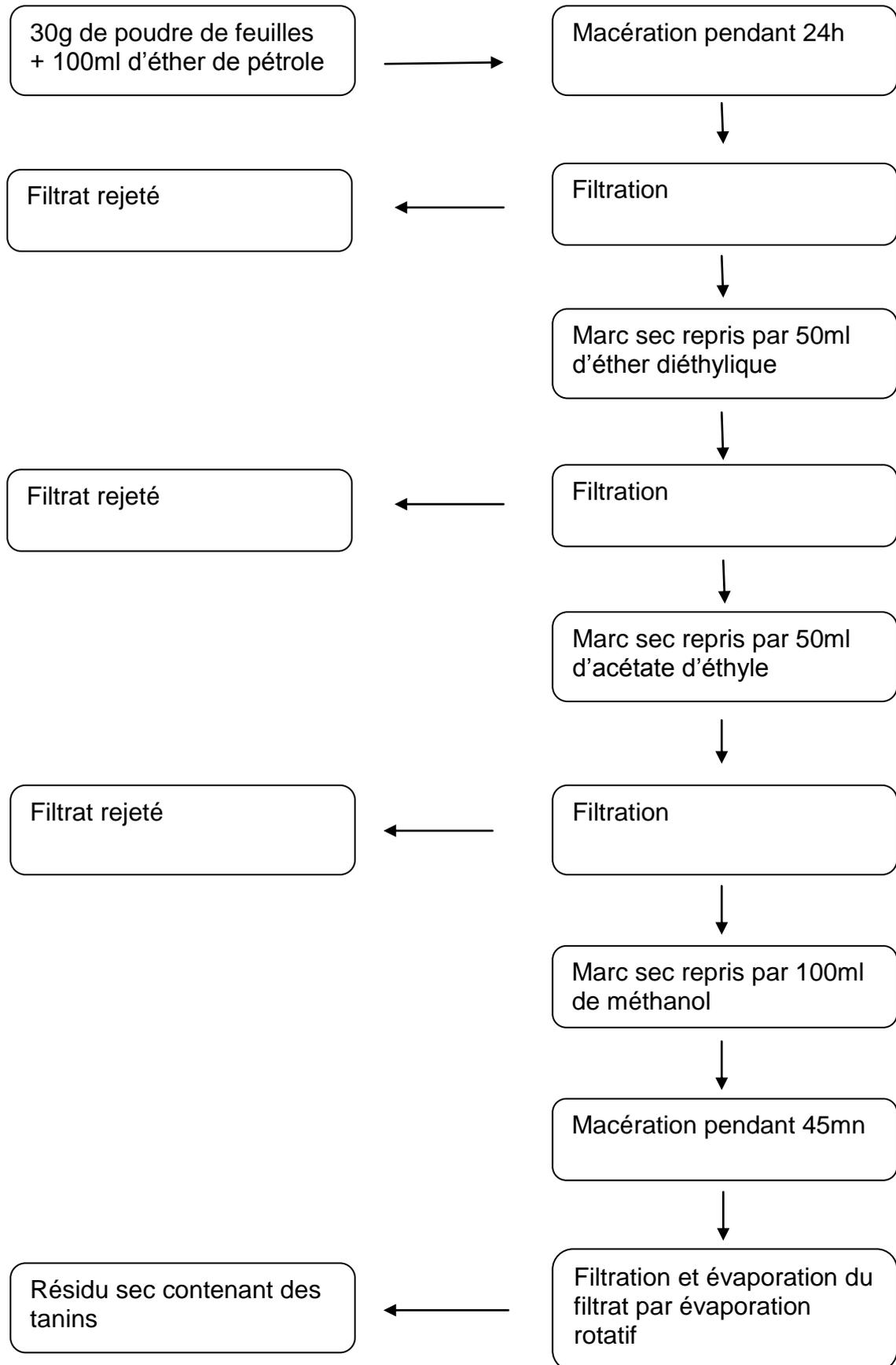


Figure 2.3 : Protocole expérimental de l'extraction des tanins

2.3.3. Tests biologiques :

On a déterminé l'activité antioxydante (test au DPPH) de l'extrait méthanolique et l'activité antimicrobienne (par la méthode de diffusion sur gélose) de la plante et son extrait méthanolique.

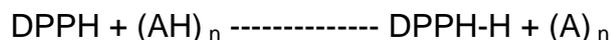
2.3.3.1. Evaluation de l'activité antioxydante :

2.3.3.1.1. Test au DPPH :

● Principe :

Le diphényle 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 diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété anti radicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants dans le milieu à donner des protons) (64).

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).

● Mode opératoire :

Le pouvoir antioxydant de l'extrait méthanolique a été testé par la méthode de Braca et al [65], méthode au DPPH.

- Préparation de la solution DPPH :

Le DPPH 2,2 Diphényle 1picryl hydrazyle est solubilisé dans l'éthanol absolu à raison de 0.004%.

- Solution d'extrait :

Pour le test, l'extrait méthanolique a été préparé par dissolution dans l'éthanol absolu, pour cela des dilutions (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1 et 2mg /ml) ont été préparées dans l'éthanol.

- Essai au DPPH :

Dans des tubes secs et stériles, on introduit 1ml de la solution à tester, on ajoute 1ml de solution au DPPH. Après agitation au vortex, les tubes sont placés à

l'obscurité et à la température ambiante pendant 30mn. Pour chaque concentration le test est répété 3fois.

La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 517nm par un spectrophotomètre.

Pour ces différentes dilutions, on prépare un blanc, constitué de 1ml de la solution DPPH additionné de 1ml d'éthanol.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, le tocophérol avec des concentrations comprises entre 0.001et 0.5mg/ml dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'échantillon test.

- Expression des résultats :

L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans l'éthanol. Elle est donnée par la formule suivante :

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(\text{Abs}_{\text{blanc}} - \text{Abs}_{\text{test}})}{\text{Abs}_{\text{blanc}}} \times 100.$$

Abs : absorbance.

2.3.3.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait methanolique et de l'infusé :

Pour évaluer l'activité antimicrobienne de nos extraits la méthode de diffusion sur gélose a été utilisée.

2.3.3.2.1. Les souches testées :

Les souches utilisées dans les tests font parties de deux groupes de microorganismes qui sont des pathogènes et des contaminants.

Pour cela nous avons utilisé six souches bactériennes et une levure récupérées du laboratoire de contrôle de stérilité du complexe Antibiotical, Sidal de Médéa (tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

	Souches	Références
bactéries	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
	<i>Salmonella typhimurium</i>	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
- levures	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

- : Souche non référencée

2.3.3.2.2. Préparation des produits à tester :

- L'infusé :

0.3009 g de feuilles séchées sont infusés dans 15ml d'eau bouillante durant 10mn et filtrés.

- L'extrait methanolique :

Dissoudre 0.3009 g de l'extrait methanolique dans 15ml de méthanol.

2.3.3.2.3. Principe de l'activité antimicrobienne :

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes soumis au contact de l'infusé et de l'extrait methanolique d'eucalyptus.

Des disques absorbants stériles de 9 mm imprégnés d'infusé, sont déposés sur une gélose inoculée de souches. La diffusion de l'infusé dans la gélose permet d'inhiber la croissance des germes tout au tour du disque « zone d'inhibition » représentée par une zone claire, obtenue après incubation. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de chacune des souches [66].

2.3.3.2.4. Mode opératoire :

- Préparation des boîtes de Pétri :

Les 2 milieux de culture utilisés Muller-Hinton (pour les bactéries) et Sabouraud (pour la levure) sont fondus dans un autoclave à 120°C pendant 20mn.

On verse aseptiquement dans les boîtes de Pétri de 90mm de diamètre une couche à raison de 15ml par boîte.

Laisser refroidir et solidifier les milieux de culture sur la paillasse à température ambiante.

- Préparation des suspensions microbiennes

Nous utilisons des cultures jeunes de 18 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures fraîchement réactivées. La réactivation se fait comme suit :

Prélèvement à l'aide d'une anse de platine stérile de la souche du tube de milieu de conservation « gélose nutritive ».

Culture de cette souche sur le milieu d'utilisation « gélose nutritive inclinée ».

La durée de l'incubation est de 24h à 37°C pour les bactéries et 48 heures à 25°C pour les levures.

Des suspensions troubles sont réalisées en prélevant à l'aide de l'anse de platine stérile, 3 à 5 colonies bien distinctes, que l'on dépose dans un tube de solution physiologique stérile ; nous agitons énergiquement pour bien mélanger.

La densité optique de chaque suspension doit être comprise entre 0.08 et 0.1 à la longueur d'onde de 625 nm qui correspond environ à une centaine de millions de germes par ml.

- Ensemencement

A l'aide d'un écouvillon, on prélève une quantité de la suspension de bactéries ou de levures et on ensemence le milieu de culture.

- Dépôt des disques

A l'aide d'une pince stérile, imbiber un disque stérile d'extrait méthanolique ou d'infusé jusqu'à imprégnation totale.

Le disque est déposé sur la surface de la gélose.

Pour notre manipulation, nous avons déposé 3 disques imprégnés d'extrait méthanolique ou d'infusé sur la gélose de chaque souche.

Laisser diffuser sur la paillasse pendant 30mn.

Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les levures.

CHAPITRE 3 RESULTATS ET DISCUSSIONS.

3.1. Etude botanique de la plante :

3.1.1. Examen macroscopique de la fleur :

L'étude macroscopique de la fleur révèle qu'*Eucalyptus globulus* L. contient un gros calice à dents concrescentes correspondant aux quatre sépales qui s'ouvre spontanément en cercle formé par les quatre pétales en libérant les nombreuses étamines à long filet blanchâtre réunies en un bouquet touffu. (Figure 3.1).

Les fleurs couleur crème sont solitaires à l'aisselle des feuilles et produisent un abondant nectar que les abeilles transforment en un miel à saveur prononcée.

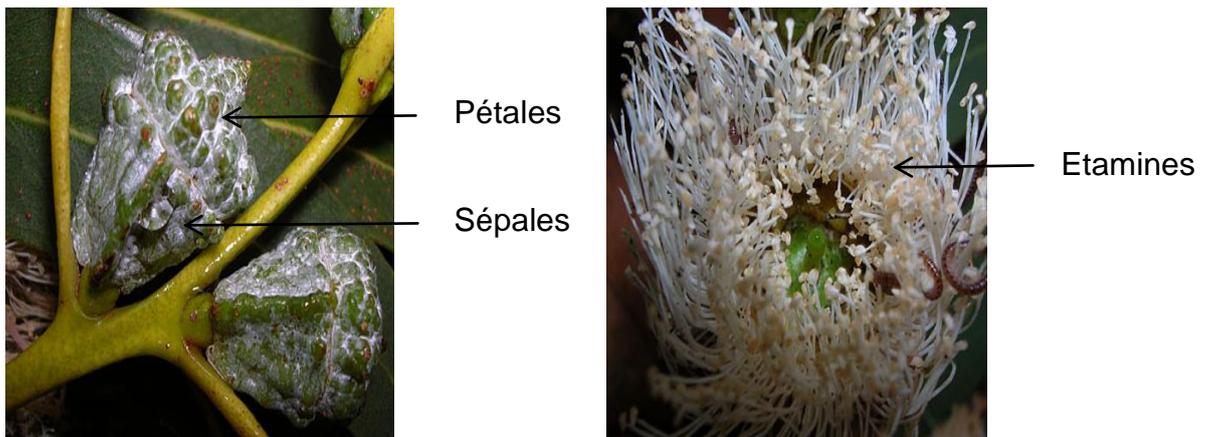


Figure 3.1 : La fleur d'*Eucalyptus globulus* observée à l'œil nu (original).

3.1.2. Examen macroscopique du fruit :

Les fruits ligneux mesurant de 1 à 1.5 cm de long et de 1.5 à 3 cm de large, globuleux, aplatis au sommet et parcourus de quatre sillons comme le montre la figure 3.2. De nombreuses petites graines s'échappent par des valves qui s'ouvrent sur le dessus du fruit.

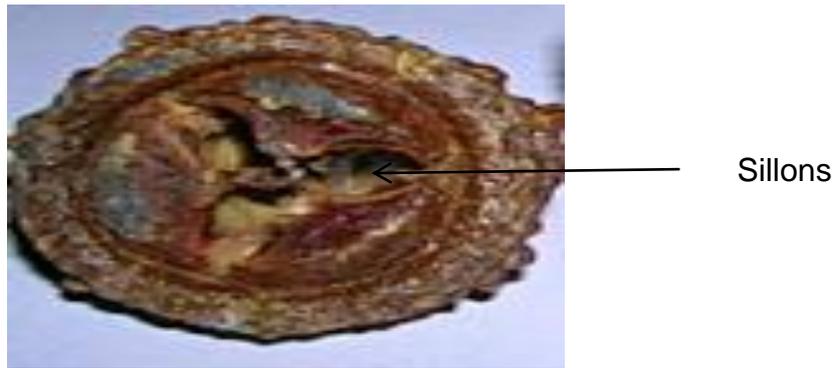


Figure 3.2 : Fruit d'*Eucalyptus globulus* observé à l'œil nu (original).

Après ces observations obtenues, nous avons constaté que notre échantillon est identique à celui répertorié au niveau de l'herbier de département d'agronomie de l'université Saad Dahleb.

3.2. Eétude phytochimique de l'*Eucalyptus globulus* L.

3.2.1. Détermination de la teneur en eau :

Le matériel végétal a été pesé et séché à l'étuve réglée à 75°C. Le tableau 3.1 comporte les valeurs des pesées effectuées toutes les 24h.

Tableau 3.1 : Résultats des pesées en g d'*Eucalyptus globulus*.L après dessiccation.

Prise d'essai/g	24h	48h	72h	96h
10,00	4,94	4,91	4,91	4,91

Les analyses de notre échantillon ont révélé une teneur en eau de 50.9%. Cela signifie qu'approximativement la moitié ou plus du poids de la plante fraîche est constituée d'eau (Figure 3 .3).

Selon Paris et Moyse [9] l'eau représente 60 à 80% de la matière fraîche des feuilles. Nous pouvons constater donc que la teneur en eau des feuilles d'*Eucalyptus globulus* est dans les normes.

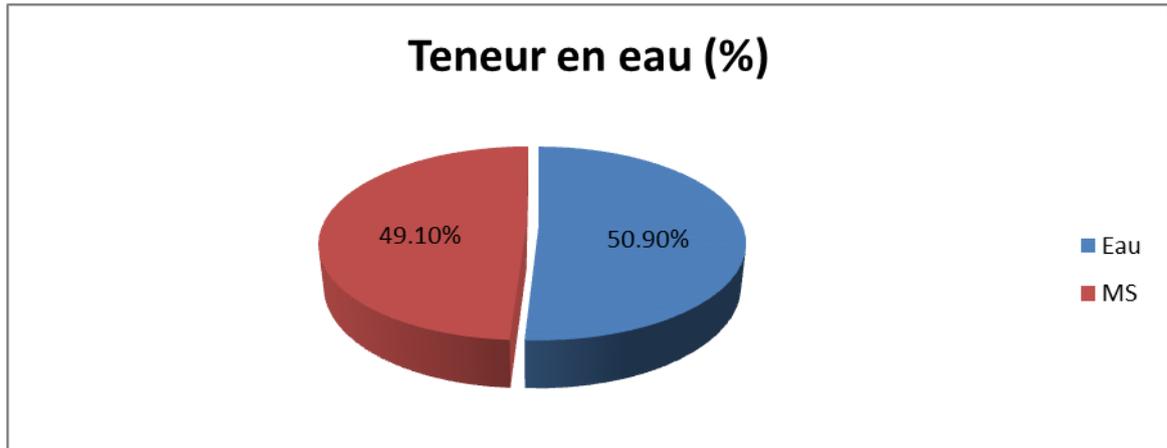


Figure 3.3 : Teneur en eau de l'*Eucalyptus globulus*

3.2.2. Le taux d'humidité :

Le matériel végétal a été pesé et séché à l'étuve à une température réglée à 105°C. Le tableau 3.2 comporte les valeurs des pesées effectuées tous les deux heures.

Tableau 3.2 : Représentation du taux d'humidité dans la matière végétale

Prise d'essai (g)	2h	4h	6h	8h	10h
1,0000	0,9141	0,9026	0,8547	0,8504	0,8504

Une fois le poids constant est obtenu, nous avons pu calculer le taux d'humidité en appliquant la formule citée en matériel et méthodes et nous avons obtenu une valeur de 14.96%. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par la pharmacopée URSS [52] qui prévoit des valeurs comprises entre 12 et 15%.

3.2.3. Les matières minérales :

Les résultats du pourcentage des minéraux obtenus pour l'*Eucalyptus globulus* sont présentés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Pourcentage en minéraux d'*Eucalyptus globulus*

Prise d'essai (g)	Pesée après calcination totale	Minéraux (%)
1,0000	0,0963	9,63

Les cendres obtenues sont de couleur claire et représentent chez cette espèce une teneur de 9,63%.

Cette valeur est proche des résultats obtenus par la pharmacopée européenne de 2005 qui sont de 10 à 12% [71].

3.2.4. Les matières azotées totales :

Le dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl nous a permis d'obtenir les résultats consignés dans le tableau 3.4

Tableau 3.4 Résultats de la détermination des matières azotées totales

Prise d'essai (g)	N g	MAT %
1. 00 g	6.8 g	42.5

Notre échantillon possédait une teneur en MAT de l'ordre de 42.5%, cette valeur est élevée que chez le bananier, l'oranger, le riz et le maïs étudiés par Didier [54].

3.2.5. Etude des principaux principes actifs

3.2.5.1. Les huiles essentielles

3.2.5.1.1. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau :

Le procédé de l'entraînement à la vapeur d'eau, nous a permis d'obtenir une huile essentielle dont les caractères organoleptiques (odeur, couleur, aspect) sont consignés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Caractères organoleptique de l'huile essentielle des feuilles de l'*Eucalyptus globulus*.

Caractères	Résultats	Normes AFNOR
Aspect	Liquide mobile	Liquide
Couleur	Jaune claire	Jaune
Odeur	Camphrée puissante	Camphrée voire balsamique

L'huile essentielle d'*E globulus* présente une propriété d'être liquide, jaune claire, avec une odeur camphrée puissante fraîche caractéristique de l'eucalyptol (1-8 cinéole).

Elle est largement utilisée dans de nombreuses préparations cosmétiques dont des crèmes et gel, des baumes à appliquer sur le torse et des huiles de massage. Les résultats du tableau 3.5 montrent que les caractéristiques organoleptiques obtenues de l'huile essentielle de cette espèce sont comparables aux normes AFNOR [72].

3.2.5.1.2. La teneur en huile essentielle :

L'huile essentielle a été extraite du matériel végétal frais, le rendement et la composition chimique des huiles essentielles varient beaucoup avec la plante utilisée, le matériel employé pour l'extraction et la méthode d'extraction, aussi bien l'origine de la plante [31].

L'*Eucalyptus globulus* a comme teneur en huile essentielle de 0,11%, cependant elle est assez faible par rapport à celle rapportée par la pharmacopée européenne (2005) qui est de 2%. Cette variation est probablement due à plusieurs facteurs, à savoir, la composition du sol, facteurs climatiques et même origine géographique.

3.2.5.1.3. Analyse de l'huile essentielle par CGMS :

L'analyse de l'huile essentielle par CGMS nous a permis d'obtenir le chromatogramme représenté dans la figure (3.4).

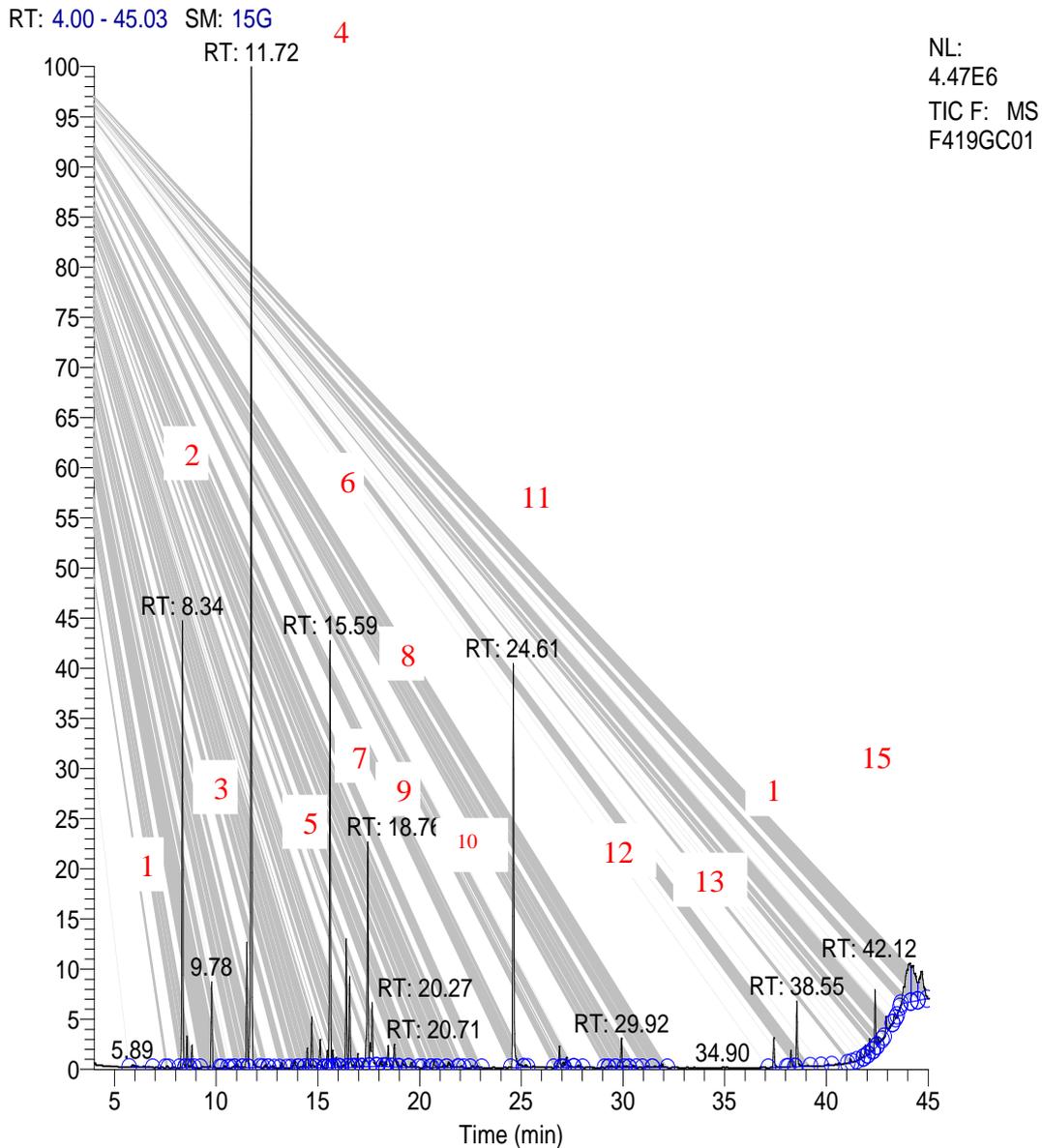


Figure 3.4 : chromatogramme de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*

- Interprétation du chromatogramme :

Le chromatogramme de l'*Eucalyptus globulus* comporte 15 pics dont 6 sont majoritaires (figure 3.4), ces pics sont les N° : 2, 3, 4, 6, 8, 11. Chaque pic a été soumis à une analyse par spectrophotométrie de masse permettant ainsi d'identifier chaque molécule.

Le pic n°2 correspond au spectre de masse de α pinène avec une teneur de 9.17% (figure 3.5). Le second composé majoritaire est retrouvé à une teneur de 2,03%, le α phellandrène (figure 3.6). Cependant le pic n° 4 est le composé qui représente une teneur très importante de 70%, l'eucalyptol (figure 3.7), les autres

pics sont présentés à des teneurs de 9,89% ; 0,81% ; 10,18% ; correspondent respectivement aux spectres de masse de bicyclo(3.1.0) hexan-3-ol,4-methylene-1-(1-methylethyl)(figure 3.8);cyclohexanol,2methylene-5-(1-methylethenyl)(figure 3.9) et benzene,1,2-dimethoxy-4-(2 propenyl)(figure 3.10). Cette huile essentielle est caractérisée par un taux élevé d'un éther oxyde l'eucalyptol. Les résultats obtenus pour les différents travaux montrent que cette huile est formée principalement d'eucalyptol.

F419GC01 #631 RT: 8.34 AV: 1 NL: 7.19E5
T: + c Full ms [50.00-300.00]

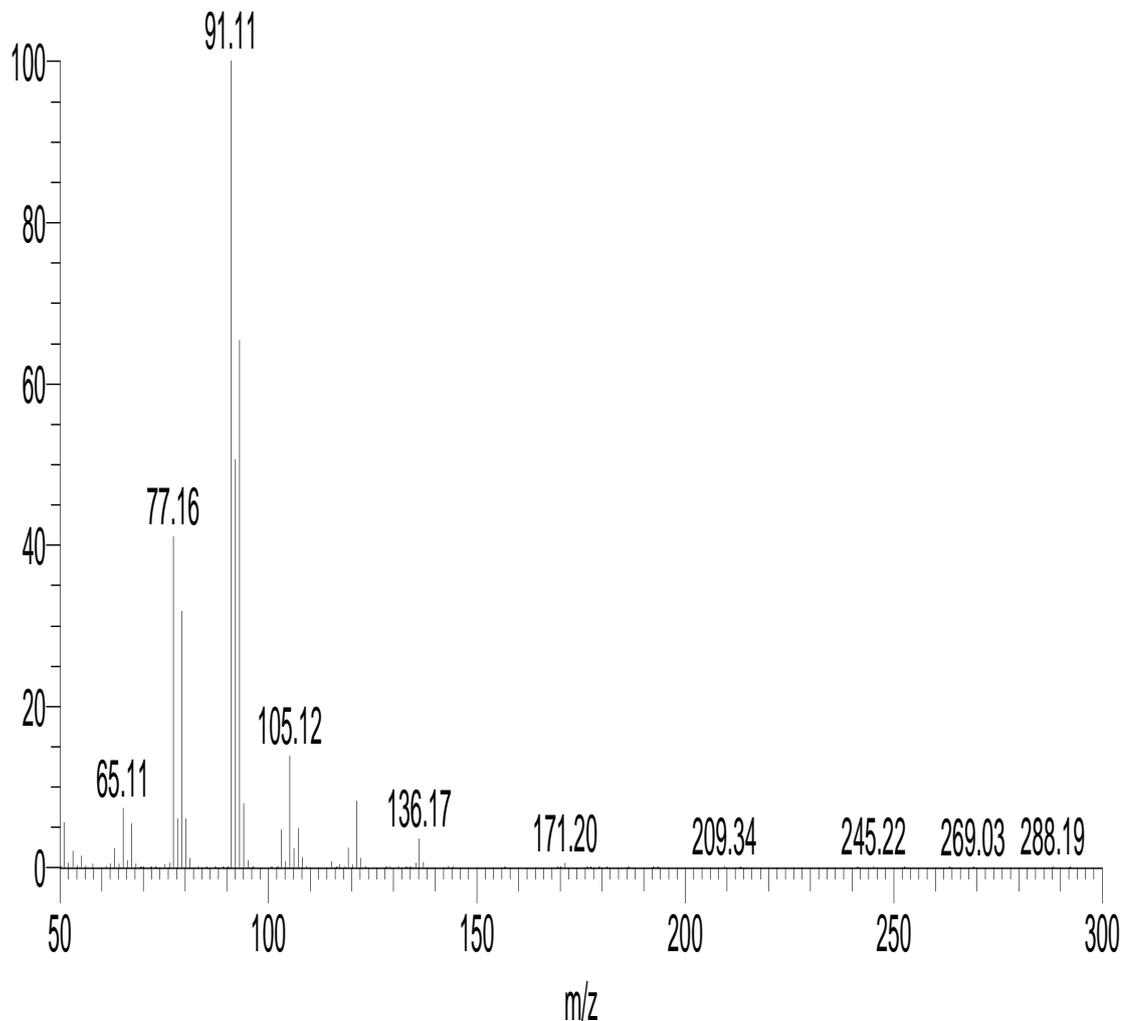


Figure 3.5 : Spectre de masse de α pinène

F419GC01 #847 RT: 9.78 AV: 1 NL: 1.18E5

T: + c Full ms [50.00-300.00]

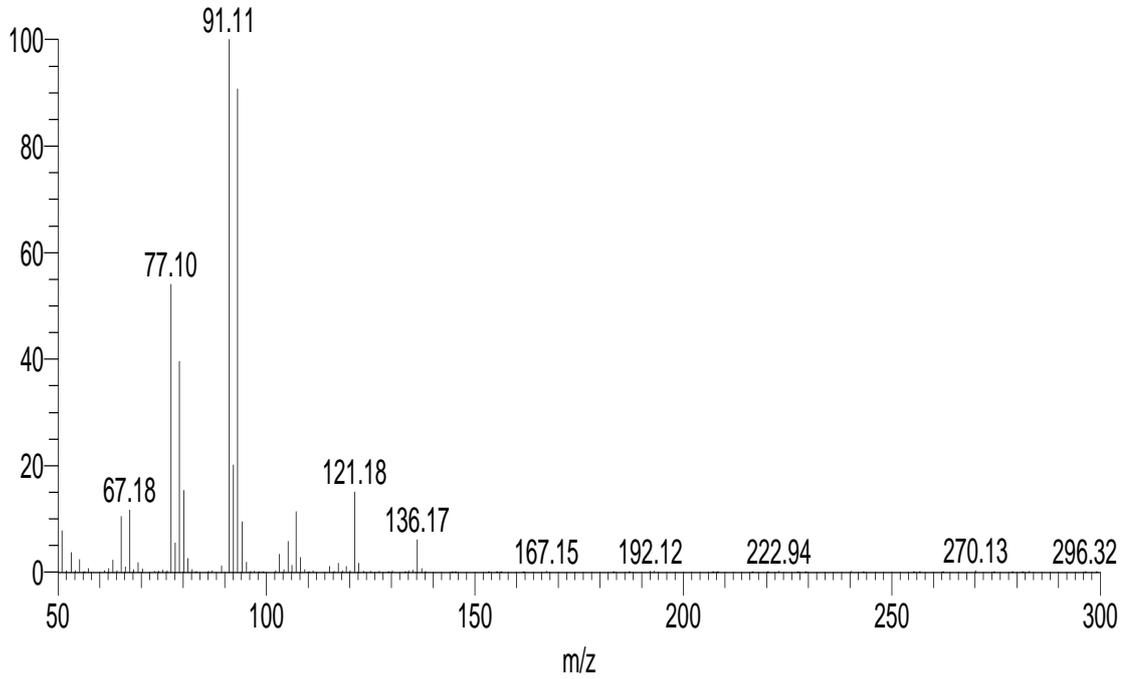


Figure 3.6 : Spectre de masse de α phellandrène

F419GC01 #1138 RT: 11.72 AV: 1 NL: 8.19E5

T: + c Full ms [50.00-300.00]

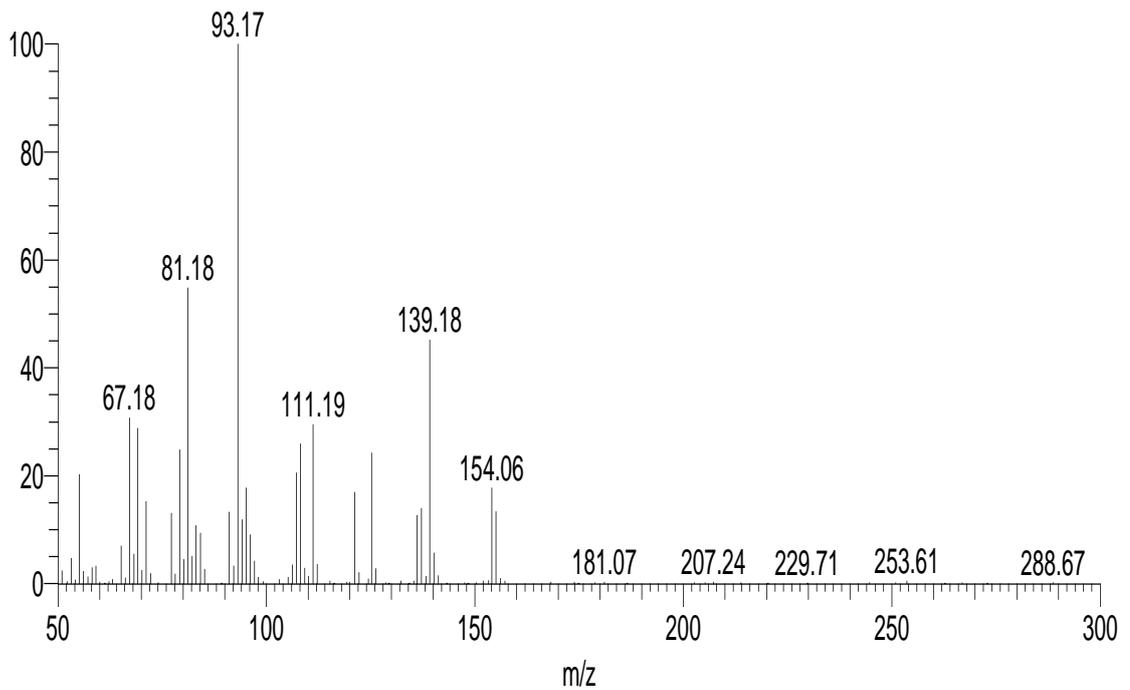


Figure 3.7 : Spectre de masse d'eucalyptol

F419GC01 #1715 RT: 15.59 AV: 1 NL: 4.32E5
T: + c Full ms [50.00-300.00]

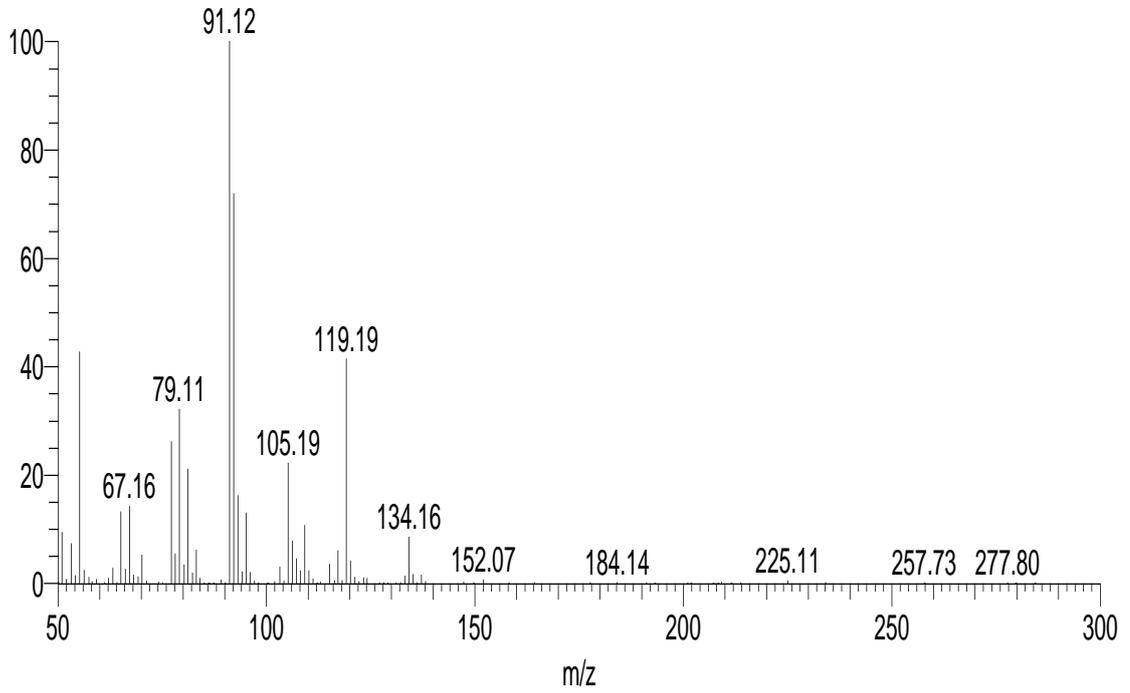


Figure 3.8 : Spectre de masse du sabinol

F419GC01 #2202 RT: 18.76 AV: 1 NL: 1.67E4
T: + c Full ms [50.00-300.00]

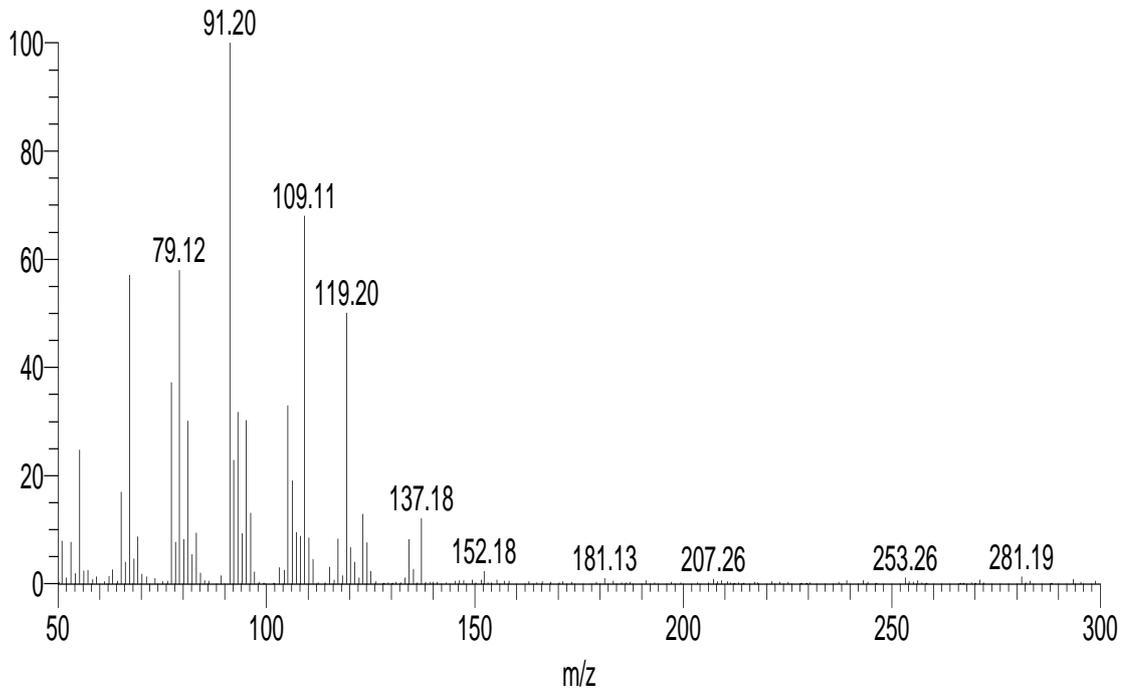


Figure 3.9 : Spectre de masse d'isocarvéol

F419GC01 #3057 RT: 24.61 AV: 1 NL: 4.73E5

T: + c Full ms [50.00-300.00]

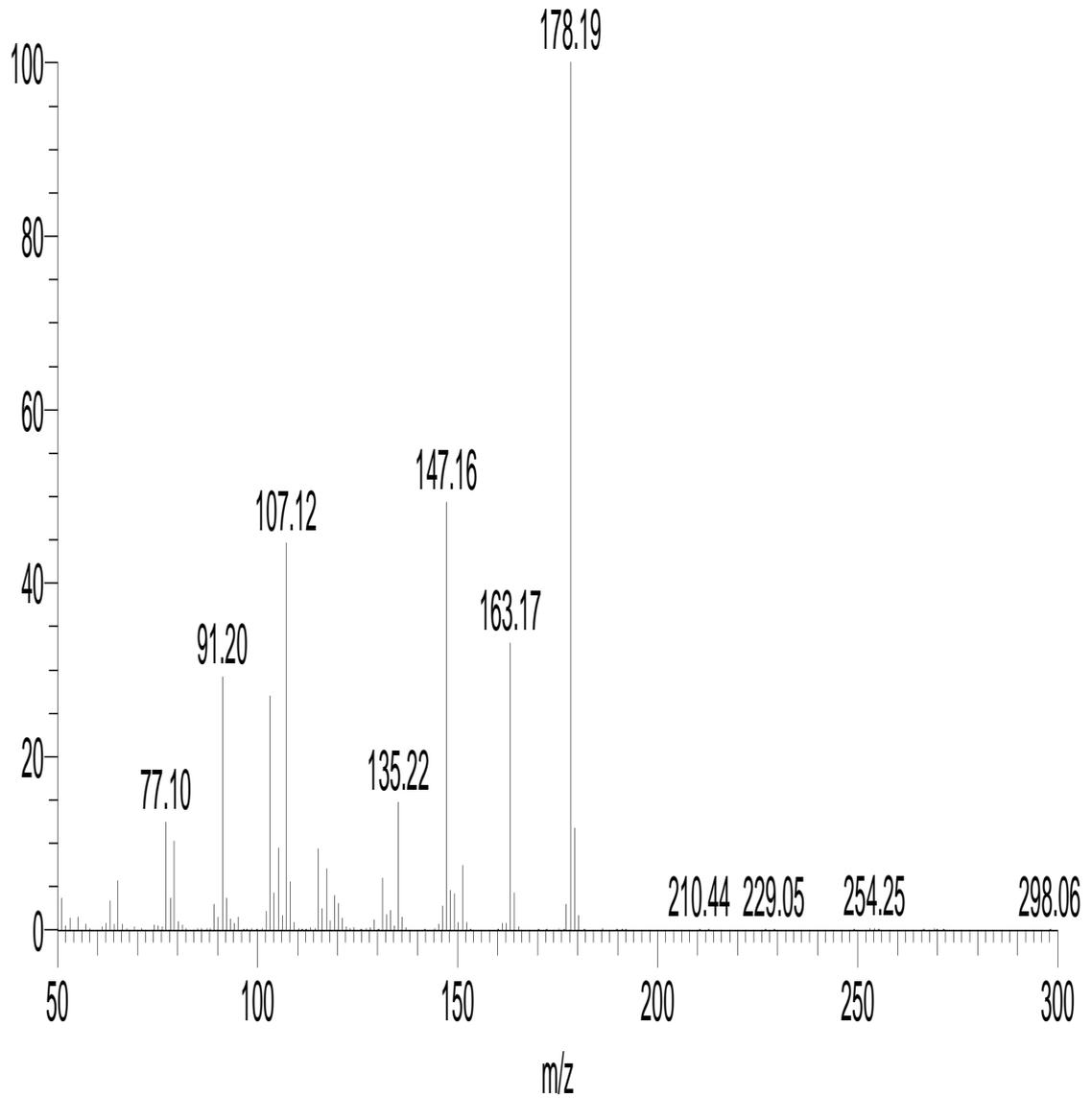
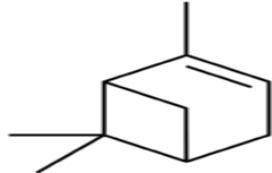
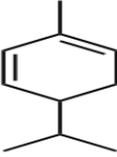
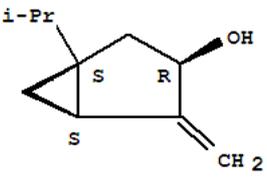
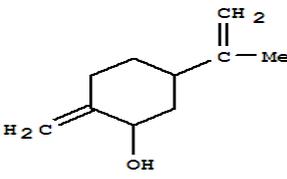
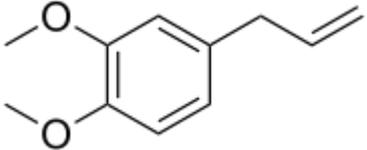


Figure 3.10 : Spectre de masse de methyleugenol

La composition chimique des différentes molécules est détaillée dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : composition chimique de l'huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*.

Composés majoritaires	Pic sur le chromatogramme	Temps de rétention (min)	Formule brute	Structure
α pinène	2	8.34	$C_{10}H_{16}$	
α phellandrène	3	9.78	$C_{10}H_{16}$	
eucalyptol	4	11.72	$C_{10}H_{18}O$	
Sabinol	6	15.59	$C_{10}H_{16}O$	
Isocarveol	8	18.76	$C_{10}H_{16}O$	
methyleugenol	11	24.61	$C_{11}H_{14}O_2$	

L'étude de la composition chimique de l'huile essentielle de cette même plante, mais d'autres provenances, a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche.

L'analyse de cette composition chimique de l'huile essentielle de l'*Eucalyptus globulus* révèle qu'elle est composée essentiellement des mono terpènes.

3.2.5.1.4. Etude histologique :

Les coupes histologiques qui sont réalisées sur des feuilles selon le plan transversal afin de localiser les tissus sécréteurs des essences de l'*Eucalyptus globulus*.

L'examen des coupes permet de distinguer de la périphérie vers l'intérieur les tissus suivants :(figure3.11)

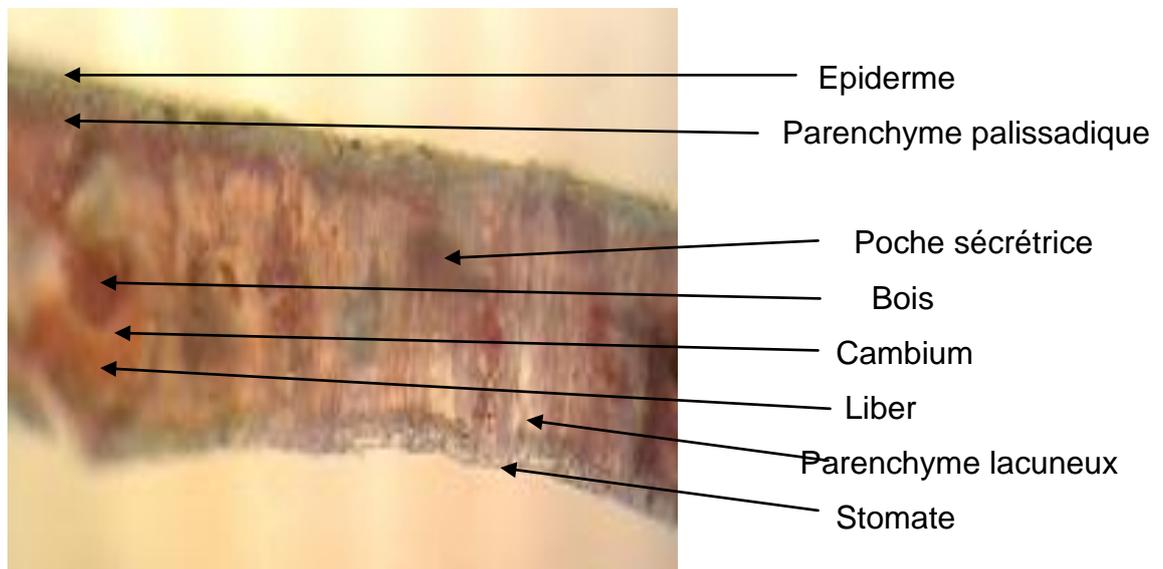


Figure 3.11 : coupe transversale dans la feuille d'*Eucalyptus globulus* (original).

L'épiderme : c'est une assise protectrice formée de cellules cutinisées sur la face externe, cette assise épidermique est interrompue par des stomates qui permettent les échanges avec le milieu extérieur mésophile.

Le mésophile est formé de deux tissus parenchymateux, caractérisés par une grande richesse en chloroplastes qui interviennent dans la photosynthèse, et donc synthèse des glucides.

Le parenchyme chlorophyllien palissadique dont les cellules sont allongées, rectangulaires, jointives et paroi peu épaisse pectocellulosique qui intervient dans la photosynthèse.

Le parenchyme chlorophyllien lacuneux dont les cellules sont plus ou moins arrondies présentant entre elles des méats, qui intervient dans les échanges gazeux.

L'examen des coupes histologiques a révélé l'existence de poches sécrétrices, situées à l'intérieur de la feuille, plusieurs références bibliographiques indiquent l'existence de poches sécrétrices, et selon Paris et Hurabielle [11], les structures sécrétrices de l'*Eucalyptus globulus* L. sont endogènes. La cellule sécrétrice initiale subit des transformations donnant lieu à un cloisonnement autour duquel se forme un massif de cellules, celles-ci en s'écartant laissent entre elles un méat de poche sécrétrice où elles déversent l'huile essentielle.

La coupe transversale de la feuille d'*Eucalyptus globulus* L. montre que ces poches sécrétrices sont insérées entre le parenchyme palissadique et le mésophile de la feuille.

3.2.5.2. Etude des composés non volatiles apolaires et polaires :

3.2.5.2.1 Extraction par soxhlet :

La teneur de l'*Eucalyptus globulus* en composés non volatiles apolaires est de 2.48%. Concernant les composés non volatiles miscibles dans les solvants polaires, elle est de 4.71%. Les concrètes des feuilles ont une couleur verte et une odeur caractéristique de la plante.

3.2.5.2.2 Analyse de la concrète apolaire et polaire par spectrophotomètre UV-visible :

L'analyse des concrètes apolaires et polaires par UV-vis a été effectuée sur des solutions homogènes obtenues respectivement par dilution de nos concrètes dans l'éther et le méthanol.

Les spectres d'absorption des composés apolaires et polaires sont représentés dans les figures 3.12 et 3.13.

Les longueurs d'ondes d'absorption de ces composés ainsi que leur absorbance sont illustrés dans les tableaux 3.7 et 3.8.

Tableau 3.7 : Longueurs d'ondes et absorbance des composés apolaires

N° Pic	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
1	669.0	0.058
2	611.0	0.026
3	530.0	0.031
4	502.0	0.036
5	407.0	0.125
6	285.0	0.431

D'après ces résultats, nous pouvons remarquer, la présence de 06 pics à 06 longueurs d'ondes différentes. Cette analyse indique la présence de molécules actives au niveau de l'extrait d'éther de pétrole.

Tableau 3.8 : longueurs d'ondes d'absorption des composés polaires

N° Pic	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
1	663.0	0.047
2	605.0	0.032
3	295.0	2.212

Nous pouvons remarquer, d'après le tableau ci-dessus, la présence de 03 pics à 03 longueurs d'ondes différentes. Ces pics correspondent aux différentes molécules actives de l'extrait methanolique.

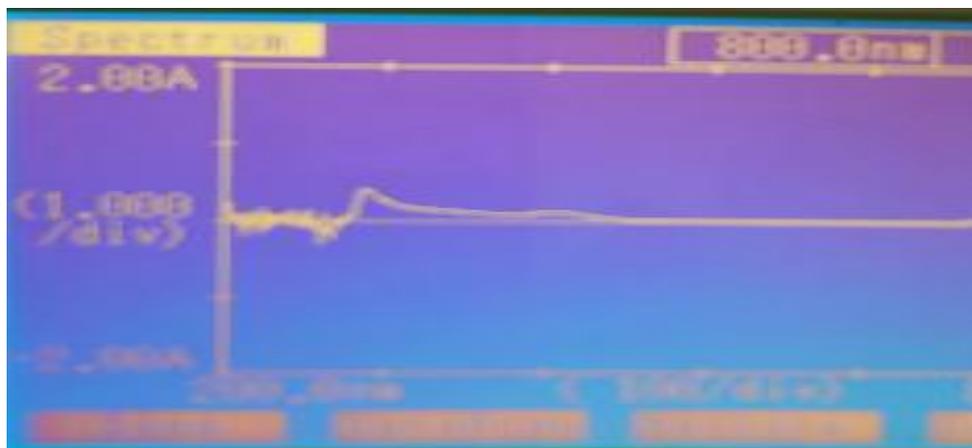


Figure 3.12 : Spectre d'absorption des composés apolaires

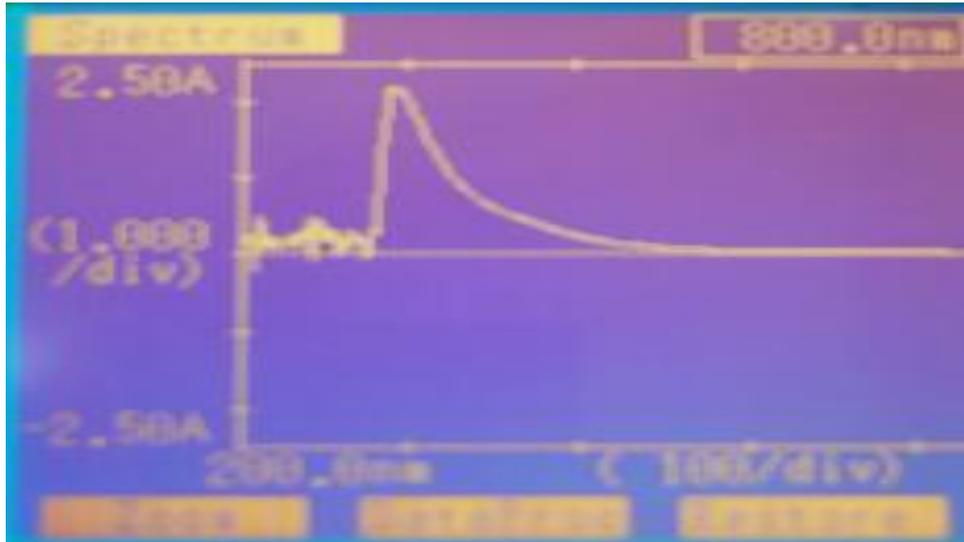


Figure 3.13 : Spectre d'absorption des composés polaires

3.2.5.3. Analyse des flavonoïdes :

3.2.5.3. Détermination du rendement des flavonoïdes

L'extraction des flavonoïdes nous a permis de déterminer leur teneur qui est de 4,4% soit :

Mmv = 30g

Mf = 1,33g

Donc Rf = 4,4% avec

Rf : rendement des flavonoïdes

Mf : masse de flavonoïdes en gramme

Mmv : masse de la matière végétale utilisée en gramme.

Le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. La méthode d'extraction affecte également tout le contenu total en phénols et flavonoïdes [73].

3.2.5.3.2. Mise en évidence des flavonoïdes :

La mise en évidence des flavonoïdes a été réalisée par des réactions de caractérisation qui sont représentées dans le tableau (3.9).

Tableau 3.9 : résumé des réactions tests qui mettent en évidence les flavonoïdes

Test	Résultat
Coloration en milieu alcalin	Orange
Coloration par le FeCl ₃	Vert
Réaction de la cyanidine	Rouge-orange

Ces réactions nous ont permis de caractériser dans notre échantillon des flavonoïdes.

D'après le tableau 3.9, on peut dire que tous les tests effectués ont montré une réaction positive mettant ainsi en évidence la présence des flavonoïdes. Ces résultats sont en accord avec ceux qui sont décrits par Makan [59].

3.2.5.3.3. Analyse des flavonoïdes par CCM :

Le développement de la méthode pour la chromatographie sur couche mince commence non seulement par le choix de la phase mobile de séparation mais aussi le choix de la phase stationnaire, la technique de développement choisie, dimension de la chambre de développement et de l'espace vapeur ont un effet prononcé sur la séparation [67].

Le chromatogramme résultant de l'extrait flavonoidique de l'*Eucalyptus globulus* comporte deux spots séparés (figure 3.14). L'identification des composés était basée sur la comparaison des R_f des taches obtenues sur CCM avec ceux obtenus par Markham [68], Leurs résultats ont été pris comme référence dans la suite de notre travail.



Figure 3.14 : Chromatogramme des flavonoïdes d'*Eucalyptus globulus*.

D'après les résultats reportés dans le tableau (3.10), le système solvant acetate d'éthyle /acide acétique glacial /acide formique/eau distillée a séparé essentiellement les composés appartenant à la classe des anthocyanidines-3-glycoside.

Tableau 3.10 : Représentation des Rf obtenus par CCM.

Spots	Di (CM)	Rf obtenu	Nom de la molécule
1	13	0.13	Anthocyanidine-3-glycosides
2	8.5	0.85	Anthocyanidine 3,5 diglycoside

3.2.5.4. Etude des tanins :

3.2.5.4.1. Résultat de l'extraction

L'extraction des tanins, nous a permis d'obtenir une teneur de 16.97%. Cette valeur montre que l'*Eucalyptus globulus* renferme une quantité appréciable en tanins.

Toutefois, il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction réduit la fiabilité d'une comparaison entre les études.

Plusieurs facteurs peuvent influencer sur la teneur en composés phénoliques. Des études récentes ont montré que les facteurs extrinsèques (tels que des facteurs géographiques et climatiques), les facteurs génétiques, mais également le degré de maturation de la plante et la durée de stockage ont une forte influence sur le contenu en polyphénols [74].

3.2.5.4.2. Mise en évidence des tanins :

Elle met en œuvre des réactions en tube par coloration.

Le tableau (3.11) montre les différentes réactions effectuées qui mettent en évidence des tanins.

Tableau 3.11 : résumé des réactions de caractérisation des tanins.

Réactions de caractérisation des tanins	Résultat obtenu
Coloration par le FeCl ₃	Bleu noir
Coloration par le NaNO ₃ + HCl	Marron

D'après le tableau 3.11, on constate que tous les tests sont positifs et conformes à ceux effectués par Makan [59]. En effet, ils mettent en évidence la présence des tanins.

3.2.5.4.3. Analyse des tanins par CCM :

Dans le souci de séparer les différents composés de l'extrait de tanins, nous avons effectué une CCM, cependant nous remarquons que nous n'avons pas pu obtenir une bonne séparation des composés qui se sont tous accumulés au niveau de la ligne de fin de migration. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les composés contenus dans l'extrait de tanins analysés ont des poids moléculaires très proches ou des affinités similaires envers des solvants.



Figure 3.15 : Chromatogramme des tanins d'*Eucalyptus globulus*.

3.2.5.5. Tests biologiques :

On a dépisté l'activité anti-oxydante (test au DPPH) et l'activité antimicrobienne (la méthode de diffusion) de l'extrait méthanolique de l'*Eucalyptus globulus*.

3.2.5.5.1. Test au DPPH :

L'activité anti radicalaire de l'extrait méthanolique 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.

Les figures 3.16 et 3.17 représentent les profils de l'activité anti radicalaire obtenus pour le tocophérol et l'extrait méthanolique d'*Eucalyptus globulus* respectivement.

A des fins comparatives, on a utilisé le tocophérol comme antioxydant standard, il a montré une activité antiradicalaire intéressante avec une concentration inhibitrice 50 de l'ordre de 0,14 mg/ml.

L'extrait méthanolique a présenté un très bon pouvoir antioxydant avec une concentration inhibitrice 50 de l'ordre de 0,08 mg/ml.

Nous avons pu déduire que le tocophérol a un pouvoir antioxydant élevé et important à celui des métabolites secondaires analysés au niveau de la feuille d'*Eucalyptus globulus*.

L'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique est probablement liée à son contenu en polyphénols, en flavonoïdes, et en tanins.

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leurs capacités antioxydantes, l'activité de ces molécules à piéger les radicaux libres dépend essentiellement de leurs structures. Les flavonoïdes les plus actifs sont ceux qui renferment des groupements 3'-4' dihydroxy sur le cycle B et/ ou un groupement 3OH sur le cycle C [47].

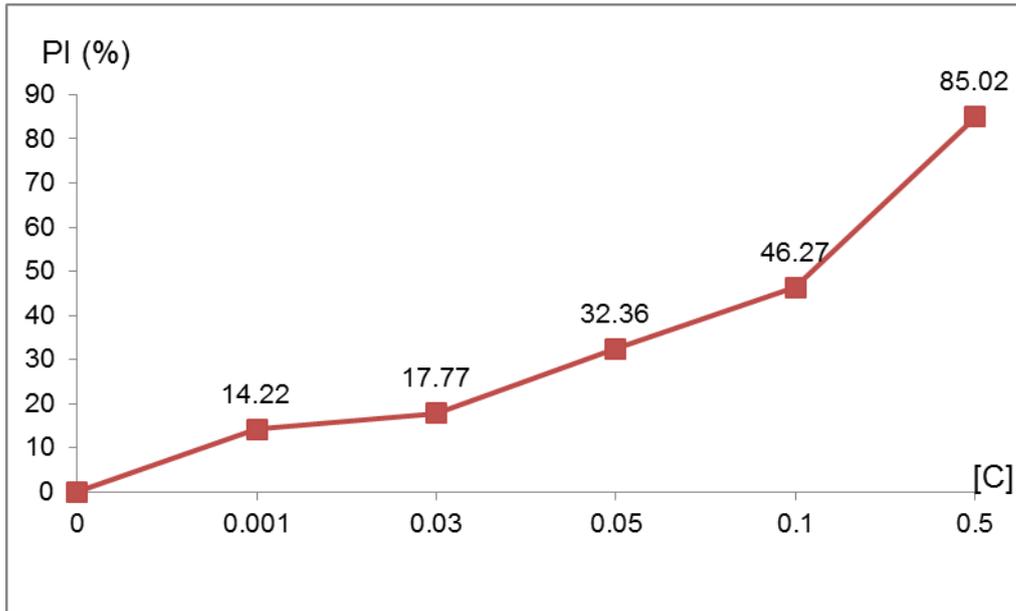


Figure 3.16 : l'activité antioxydante du tocophérol de l'*Eucalyptus globulus*

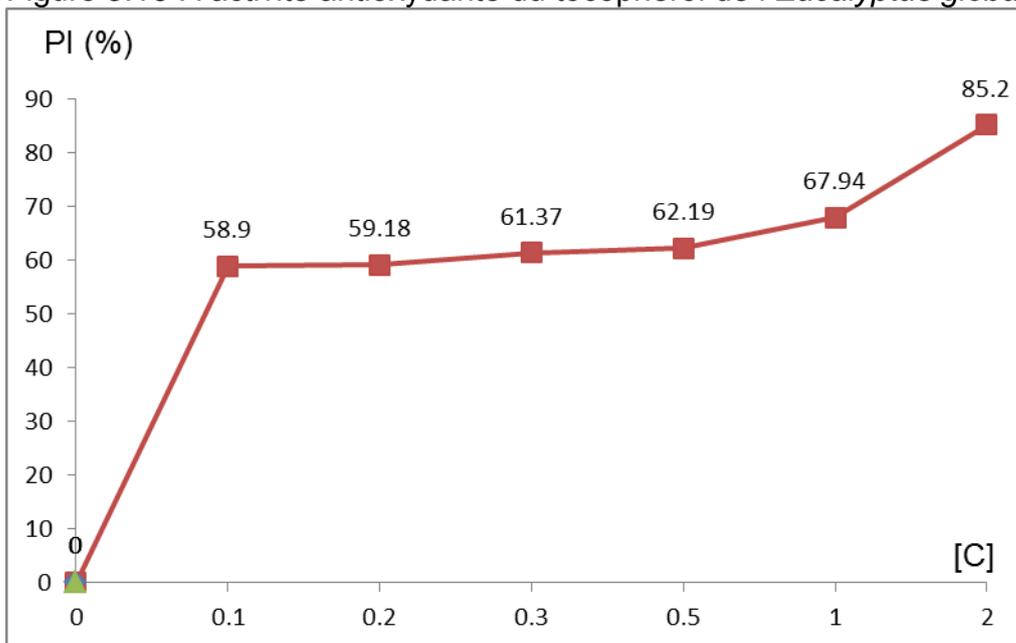


Figure 3.17 : l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de l'*Eucalyptus globulus*

3.2.5.5.2. Activité antimicrobienne :

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et l'infusé d'*Eucalyptus globulus* a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose (Tableau 3.12).

Tableau 5.12 : activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et l'infusé d'*Eucalyptus globulus*.

Les souches	Extrait méthanolique	Infusé
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ø = 20	Ø = 14,6
<i>Bacillus subtilis</i>	Ø = 25	Ø = 17
<i>Escherichia coli</i>	Ø = 15	Ø = 13,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ø = 23	Ø = 20,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-

Ø : diamètre de la zone d'inhibition en mm

- : absence de la zone d'inhibition

Au regard de ces résultats, nous constatons que l'extrait méthanolique et l'infusé d'*Eucalyptus globulus* présentent une activité antimicrobienne.

Le test antimicrobien a révélé que l'extrait méthanolique a une action inhibitrice plus importante que l'infusé.

Ils ont une action inhibitrice sur quatre souches parmi les sept souches sélectionnées pour cette étude.

L'extrait méthanolique présente une activité plus grande sur *Bacillus subtilis* avec une zone d'inhibition de 25mm ainsi que sur *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* dont la zone d'inhibition varie de 15 à 23mm. Donc ces souches sont plus sensibles à l'extrait méthanolique d'*Eucalyptus globulus*.

Cependant l'infusé a une activité importante sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* avec une zone d'inhibition de 20.3mm et 17mm respectivement. Donc ces deux souches sont plus sensibles à l'infusé d'*Eucalyptus globulus*.

Son action sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* est faible avec une zone d'inhibition de 14.6mm et 13.6mm respectivement.

Le résultat obtenu sur *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium* et *Candida albicans*, a révélé que l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique et de l'infusé d'*Eucalyptus globulus* est nulle vu que la zone d'inhibition est inexistante.

Elles sont donc considérées comme résistantes.

L'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique et de l'infusé pourrait s'expliquer par la présence de différents constituants notamment les flavonoïdes, les tanins, les acides phénoliques et les terpènes [13].

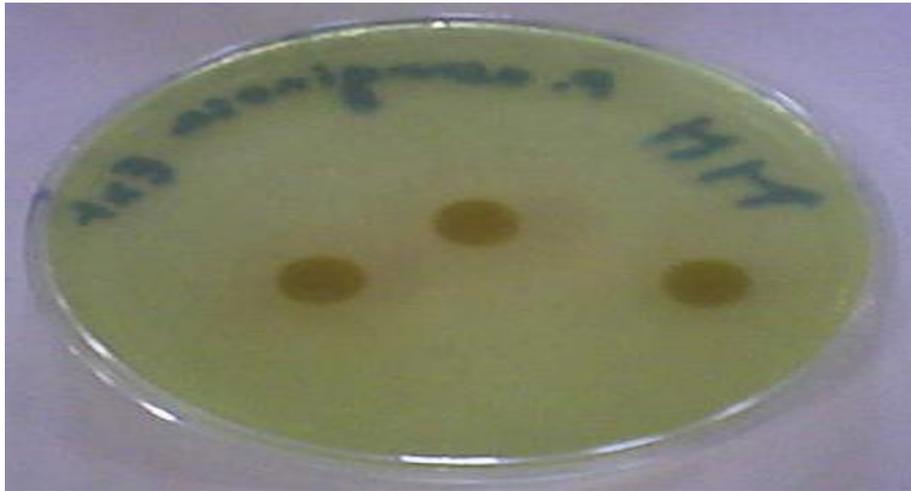


Figure 3.18: Effet de l'extrait méthanolique d'*Eucalyptus globulus* sur *Pseudomonas aeruginosa*



Figure 3.19: Effet de l'infusé d'*E.globulus* sur *Bacillus subtilis*

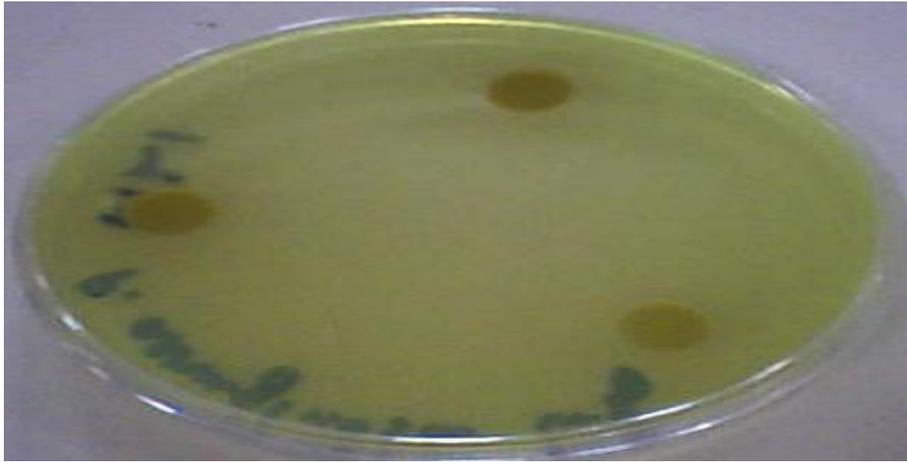


Figure 3.20: Effet de l'infusé d'*E.globulus* sur *Pseudomonas aeruginosa*

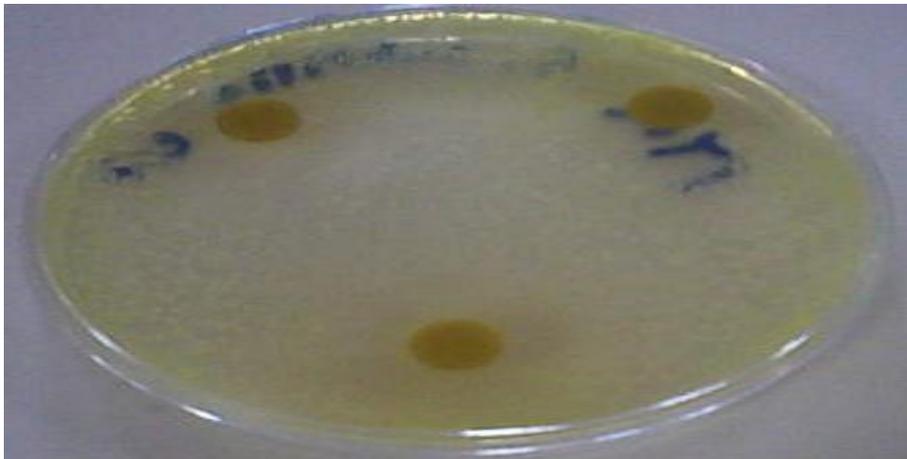


Figure 3.21: Effet de l'extrait methanolique d'*E.globulus* sur *B subtilis*



Figure 3.22: Effet de l'infusé d'*E.globulus* sur *S.aureus*



Figure 3.23: Effet de l'extrait methanolique d'*E. globulus* sur *S. aureus*

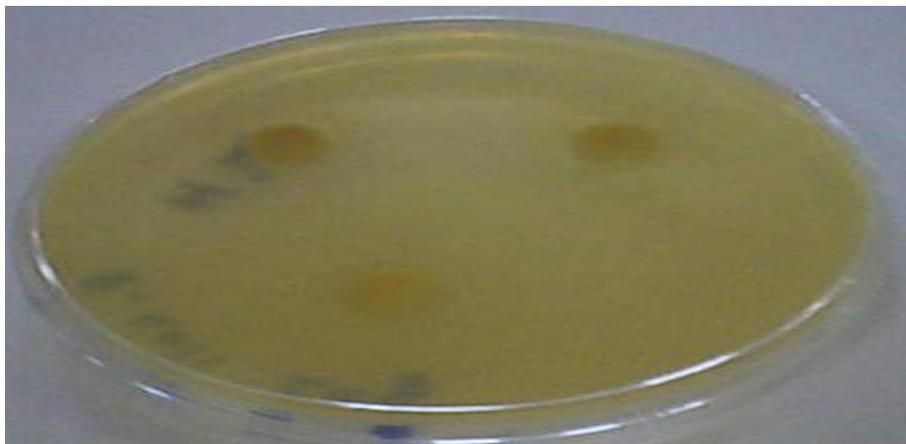


Figure 3.24: Effet del'infusé d'*E. globulus* sur *E. coli*



Figure 3.25: Effet de l'extrait methanolique d'*E. globulus* sur *E. coli*



Figure 3.26: Effet de l'extrait méthanolique d'*E.globulus* sur *Candida albicans*

CONCLUSION

Les substances naturelles occupent de plus en plus une place de choix en thérapeutique. En effet, les plantes médicinales constituent de véritables usines chimiques dont il faut tirer le maximum de profit.

Le présent travail a porté sur l'étude de principaux principes actifs notamment l'huile essentielle, les flavonoïdes et les tanins d'*Eucalyptus globulus*L.

Les techniques utilisées nous ont permis d'identifier et de séparer les différents composés actifs d'*Eucalyptus globulus*.

L'extraction de l'huile essentielle par entraînement à la vapeur d'eau a donné un rendement de 0.11%. L'identification par CGMS nous a permis de connaître la composition chimique d' *E globulus*, en effet l'analyse de cette composition chimique révèle qu'elle est constituée essentiellement des monoterpènes..

L'analyse phytochimique de la plante nous a permis d'y identifier 4.4% de flavonoïdes et 16.96% de tanins.

Cependant la séparation de ces principes actifs par la chromatographie sur couche mince n'a pas été possible. Elle n'a permis qu'une caractérisation de ces derniers par l'utilisation de révélateurs chimiques.

L'étude de l'activité antioxydante par la méthode au DPPH, révèle que l'extrait méthanolique est actif comme piègeur de ce radical.

L'évaluation du pouvoir antibactérien des extraits méthanoliques et aqueux d'*E globulus* par la méthode de diffusion sur gélose a révélé que ces derniers possèdent une activité antimicrobienne contre *staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa* ,*bacillus subtilis* et *Escherichia coli*, avec une zone d'inhibition de 15 à 20mm. Elles sont considérées comme des souches sensibles à une concentration de 0.3009 g/ml.

Tous les extraits méthanoliques et aqueux n'ont exercés aucune activité sur *Enterococcus feacalis*, *Selmonella typhimurium*, et *Candida albicans*.Elles sont considérées comme des souches résistantes.

L'activité antimicrobienne trouvée dans ces extraits, confère à la plante des propriétés antiseptiques des voies respiratoires.

Ces résultats restent préliminaires, il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur cette plante, en se focalisant sur l'extrait méthanolique. De plus, des études plus approfondies concernant l'identification des composés par des méthodes plus performantes seront nécessaires.

REFERENCE

- [1]. Luc Sallé, J., « Le totum en phytothérapie », Ed, Frison-Roche, Paris, (1991), 239p.
- [2]. Fintelmann et Fweiss, R., « Manuel pratique de phytothérapie », Ed, Vigot, (2004), 438p.
- [3]. Delille, L., « Plantes médicinales d'Algérie », Ed, Bertie, Alger, (2007), 240p.
- [4]. Pelikan, W., « L'homme et les plantes médicinales », Tome III, 3^{ème} Ed, Triades, Paris, (2001), 284p.
- [5]. Monnier, C., « Les plantes médicinales, Vertus et traditions », Ed, Privat, Toulouse, (2002), 155p.
- [6]. Iserin, P., « Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins », Bordos, Larousse, (1996), 336p.
- [7]. Luc Sallé, J., « Les huiles essentielles, synthèse d'aromathérapie et introduction à la sympathicothérapie », Ed, Frison-Roche, Paris, (1991), 197p.
- [8]. Bartel, A., « Guide des plantes du bassin méditerranéen », Ed, Eugen wlmmer, Paris, (1997), 400p.
- [9]. Paris, P et Moyse, H., « Précis de matière médicale », 2^{ème} Ed, Masson, Paris, (1976), 420p.
- [10]. Schwenburg, P « Guide des plantes médicinales, analyse, description et utilisation de 400 plantes », Delachaux et Niestlé, Paris, (1977), 512p.
- [11]. Paris, M et Hurabielle, M « Abrégé de matière médicale », Tome I, Ed Masson, Paris, (1980), 339p.
- [12]. Lebrun, J-P., « Introduction à la flore d'Afrique », Cirad, Ibis press, (2001), 155p.
- [13]. Bruniton, J., « Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales », 3^{ème} Ed, Lavoisier, (1999), 442p.
- [14]. Valnet. J., « Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes », 5^{ème} Ed, Maloine, Paris, (1983), 929p.
- [15]. Thurzova, L., « Les plantes santé qui poussent autour de nous », Ed, Heilpflanzen, Prague, (1981), 268p.
- [16]. Paris, P et Moyse, H., « Abrégé de matière médicale », Vigot frères, (1958), 196p.

- [17]. Chamouveau, D., « Les usages externes de la phytothérapie », Ed, Maloine, Paris, (1979), 270p.
- [18]. Ait youcef, M., « Les plante médicinales de Kabylie », Bis press, Paris, (1983), 141p.
- [19]. Orme, R., « Provenance d'Eucalyptus globulus », Ed, Hobart, Tasmanie, (2000), pp 10-12.
- [20]. Burnie, G., « Encyclopédie de botanique et d'horticulture, plus de 10000 plantes du monde entier », Ed, Place des victoires, Paris, (2006),
- [21]. Rushforth, K., « Reconnaître les arbres sans peine », Ed, Nathan, Paris, (2006), 287p.
- [22]. Boudy, P., « Guide du forestier en Afrique du nord », Ed, Maison rustique, Paris, (1970), 505P.
- [23]. Ghedira, K., « Eucalyptus globulus Labill », Ed, Springer, Paris, volume 6, N°3, (2008).
- [24]. « information eucalyptus, présentation générale de l'Eucalyptus », Paris, Afocel : lettre d'information semestrielle eucalyptus, N°1, pp 1-4.
- [25]. Marburg, M., « Les plantes thérapeutiques », Tradition pratique officinale, Science et thérapeutique, 3^{ème} Ed, Tech et doc, (1999), 636p.
- [26]. Becker, M., Timbal, J., « Les arbres » Ed, Masson, Paris, (1983), 141p.
- [27]. Girre, L., « Les plantes et les médicaments », Ed Delachaux et Nieslé SA, Paris, (2001), 253p.
- [28]. Marie, J., « Arbre et arbuste de méditerranée », compagnes des éditions de la lesse, Provence, (2007), 135p.
- [29]. Belaouad, A., « Les plantes médicinales d'Algérie », OPU, Alger, (1998), 277p.
- [30]. Boullard, B., « Dictionnaire : plantes médicinales du monde, réalités et croyances », Ed, ESTEM, Paris, (2001), 636p.
- [31]. Marie Claude, M., M onique, S., « Actifs et additifs en cosmétologie, Ed tec et doc, Paris, (2006), 1051p.
- [32]. More, D., White, J., « Encyclopédie des arbres », Ed Flammarion, (2005), 831p.

- [33]. Quezel, P., Santa, S., « Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale », Ed Centre national de la recherche scientifique, Paris, (1963), 1165p.
- [34]. Cusset, G., « Botanique : Les embryophytes », Ed Masson, Paris, (1997), 512p.
- [35]. Sijelmassi, A., « les plantes médicinales du Maroc », Maroc, Ed le feunec, 125p.
- [36]. Perroti, C., Caraffa, N., « Se soigner par les plantes médicinales », Paris, Ed Berti, (1994), 118p.
- [37]. Bianchini, F., Corbetta, F., « Atlas des plantes médicinales », Ed Fernand Nathan Editeur, Paris, (1975), 400p.
- [38]. Verdrager, J., « Ces médicaments qui nous viennent des plantes », Ed Maloine s. a, Paris, (1987), 459p.
- [39]. Bruneton, J., « Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux », Ed tech et doc, (1996), 529p.
- [40]. Guignard, J., « Biochimie végétale », Ed Dunod, Paris, (2000), 261p.
- [41]. Dubey, S., Bhalla, R., Luthra, R., « An overview of the non mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants », Ed BIOSCI. J, Paris, (2003), 646p.
- [42]. Bachelot, C., « Les huiles essentielles », Ed U.C.U, Bretagne Nord (2006), 240p.
- [43]. Sarni, P., Manchado, V., « Les polyphénols en agroalimentaires », Ed Newwork, Paris, (2006), 398p.
- [44]. Middleton, E., « Pharmacological review », Vol 52, N°4, (2000), pp 673-751.
- [45]. Medié, M., Jasprica, I., Mornar, A., « Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavinoids and phenolic acids », Croatica chemical acta 77 (1-2), (2004), pp 361-366.
- [46]. Richter, G., « Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie », Ed Presses polytechniques et universitaires, romandes, Paris, (1993), 526p.
- [47]. Marfak, A., « Radiolyse gamma des flavonoïdes, étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools », Thèse Doctorat, Labo des produits, Fac des sciences, Univ Limoges , (2003), 187p.

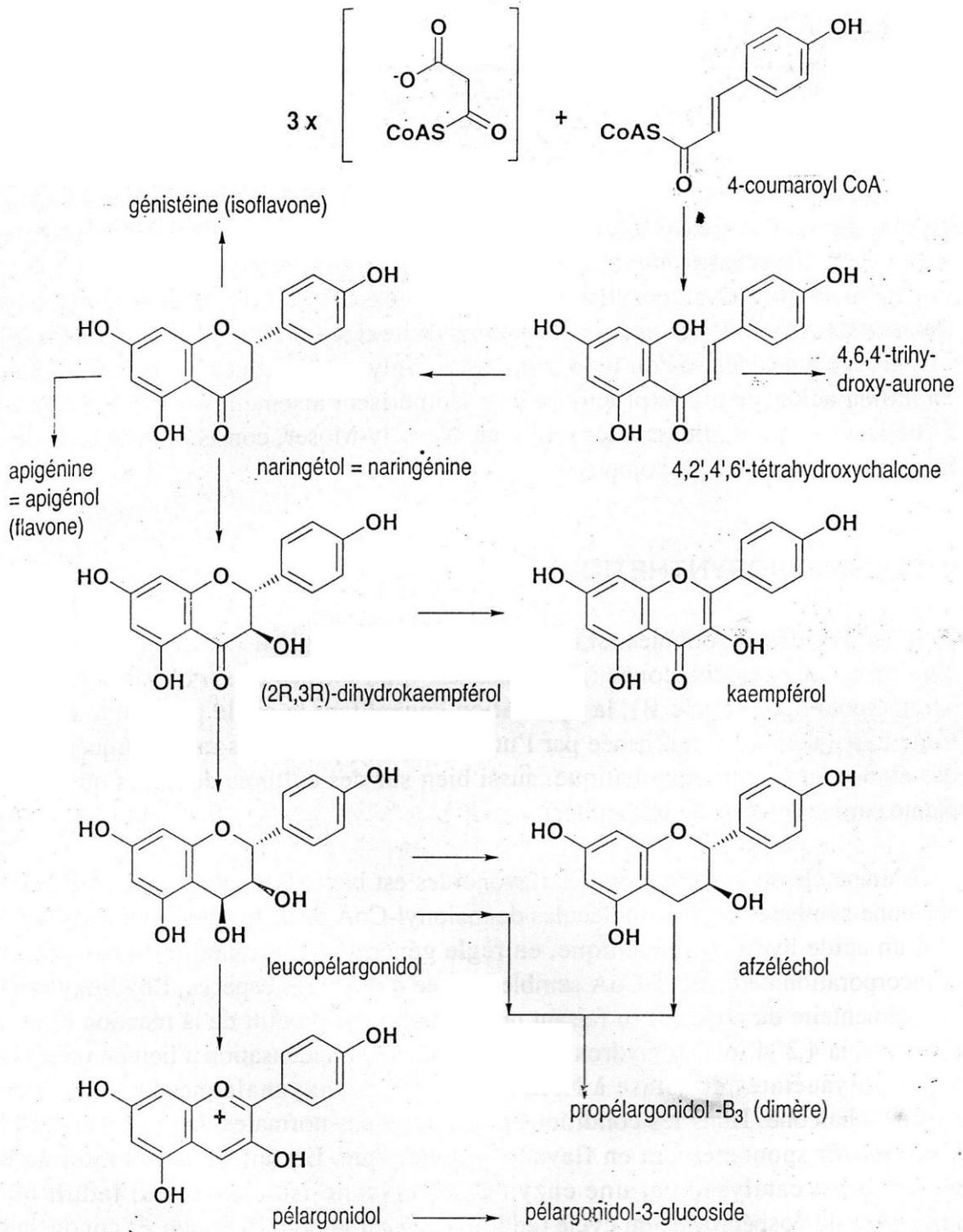
- [48]. Grotewold, E., « The science of flavonoids », Ed Springer Science and Business Media, Paris, (2008), 273p.
- [49]. Narayana, K.R., Reddy, M.S., Chaluvadi, M.R., et Krishna, D.R., « Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential », Indian journal of pharmacology. 33, (2001), pp 2-16.
- [50]. Fluck, H., « Petit guide panoramique des herbes médicinales », Ed Delachaux et Nislé, Paris, (1977), 186p.
- [51]. Prost, P., « La botanique et ses applications agricoles », Tome 2, 3eme Ed, Bailliére, Paris, (1976), 381p.
- [52]. Pharmacopée URSS, Tome 2, 11ème Ed, Moscou médicinal, 250p.
- [53]. kouhila, M., « Etude expérimentale et théorique de cinétique de séchage convectif partiellement solaire des plantes médicinales et aromatique de la région de marrakeche », Univ marrakeche, thèse doctorat, Marrakeche, (2001), 170p.
- [54]. Didier, J., « Dosage des éléments minéraux majeurs chez les végétaux », ORSTOM, BONDY, Paris, (1967).
- [55]. Lucie, D et Virginie, P « Analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse CGMS d'huile essentielle », Master 2 pro, Toulouse, (2006).
- [56]. Benayad, N., «Les huiles essentielles extraites des plantes médicinales marocaines», Thèse Mag, Labo des substances naturelles, Dep de chimie, Fac des sciences, Rabat, (2008), 202p.
- [57]. «Wikipedia, encyclopedie en ligne »
http://fr.wikipedia.org/wiki/image:Soxhlet_extractor.png
- [58]. Linden, G., «Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires », Ed Tech et Doc, Paris, (1981), 436p.
- [59]. Makan, D., «Etude phytochimique d'une plante antipaludique utilisée au Mali : Spilanthès Oleracea Jacq.», Thèse doctorat, Fac de médecine de pharmacie, Univ Bamako, Mali, (2003), 78p.
- [60]. Wink, M., « Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology », CRC, (1999).
- [61]. Hainque, B ; Baudin, B et Lefelnive, P., « Appareil et méthode en biochimie et biologie moléculaire », Ed,Médecines sciences, Paris, (2008), 449p.

- [62]. Kolain ; Berkani, A., et Lutmani, B., « Analyse chromatographique CCM des flavonoïdes des feuilles des citrus en relation avec le taux de contamination de *Phyllocnistis citrella* », univ, Mostaghanem, Algérie, 203p.
- [63]. Belarbi, M., Bouali, S., «Etude de l'activité antioxydante des polyphénols d'*Urtica dioica* », Labo des produits naturels, Fac des sciences, Univ Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie.
- [64]. Sanchez- Moreno, C., « Method used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems », Science alimentaire et technologie internationale, (2002), pp 121-137.
- [65]. Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., et Mendez, J., « J. Ethnopharmacol 79»,Article PDF, (2002), 379p.
- [66]. Leclarc, H., « microbiologie générale », Ed Masson, Paris, (1975), 195p
- [67]. « Pharmacopée européenne », 52ème édition. Strasbourg, conseil d'Europe, (2005), 2600p.
- [68]. AFNOR Association Française de Normalisation recueil de Normes Françaises, «Huiles essentielles», Paris, (1986).
- [69]. Lee, K. W et Kem. Y.J., « Cocoa has more phenolic phytochemicals and higher antioxydant activity than teas and red wine», Agric . Food Chem., (2003), pp 7292-7295.
- [70]. Aganga, A. A et Mosase.K. W., « Tanins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea* and *Rhus lancea* sands », Animal feed science and technology, (2001), pp 107-113.

APPENDICE A
Liste des abréviations

h	: heure
°C	: degré celsius
g	: gramme
min	: minute
ml	: millilitre
CGMS	: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse
m	: mètre
ev	: électron- volt
UV	: ultra- violet
nm	: nanomètre
CCM	: Chromatographie en couche mince
Cm	: centimètre
V/V/V/V	: volume/volume/volume/volume
RF	: Facteur de rétention
ATCC	: Américain Type Culture Collection

APPENDICE B



Origine biosynthétique des flavonoïdes [13]

APPENDICE C
Verrerie et réactif

C₁. Liste de la verrerie

- Creuset en platine
- Béchers : 100cc, 500cc
- Erlenmeyer : 100cc, 250cc, 500cc
- Ballon à fond plat à col rodé
- Ampoules à décanter
- Pipettes graduées de 5ml et 10ml
- Entonnoirs en verre
- Boite de pétri
- Ecouvillon stériles
- Disque en papier filtre
- Pincés
- Anse de platine
- Portoir
- Tubes à essai

C₂. Réactifs :

- Acide sulfurique
- Catalyseur du dosage de l'azote total est composé de : 80g d'acétate de potassium, 20g d'acétate de cuivre, et de 2g de sélénium pur.
- Eau distillée
- Indicateur coloré pour le dosage de l'azote total est formé de : mélange en volumes égaux de rouge de méthyle (0.66%) et de vert de bromocrésol (0.33%) dans de l'alcool éthylique.
- Diéthyl éther
- Sulfate de sodium anhydre
- Eau de javel à 12°
- Acide acétique

- Vert de méthyle
- Rouge congo
- Ether de pétrole
- Méthanol
- Ethanol
- Butanol
- Acétate d'éthyle
- Acide formique
- Chlorure d'aluminium
- Chlorure d'hydrogène à 0.1N
- Hydroxyde de sodium
- Chlorure ferrique à 2%
- Zinc
- Nitrate de sodium

APPENDICE D

Appareillage

- Balance de précision
- Etuve ventilée
- Four à moufle (Prolabo N° 57018)
- Dispositif de Kjeldahl
- Evaporateur rotatif (Stuart RE 300)
- Microscope photonique de type MOTIC BA 200
- C GMS
- Soxhlet
- Specto photomètre UV-Visible (SHIMADZU UV-1601)
- Autoclave
- Etuve bactériologique
- Bec benzène

APPENDICE E

Glossaire

Etamine organe reproducteur male d'une fleur, elle est composée d'une anthère habituellement à deux loges fixées à un filet.

Balsamique qui a les propriétés du baume.

Pruine poussière cireuse qui recouvre certains fruits, certains légumes et les chapeaux de plusieurs champignons.

Sessile se dit d'une partie quelconque qui n'a pas de support particulier, qui repose immédiatement sur une autre, fleurs sessiles : sans pédoncules.

Oblongue plus long que large

Proéminente qui est en saillie, en relief.

Coriace dur comme du cuir.

Lancéolée feuille rétrécie en pointe à l'extrémité et plus large à la base.

Falciforme qui a la forme d'une faucille.

Urne grand vase de forme oblongue, au corps renflé et à col étroit.

Anthèse Ensemble des phénomènes qui accompagnent l'épanouissement des fleurs.

Ovaire Organe destinée à la production des ovules. Partie renflée du pistil qui renferme les ovules d'une plante.

Infère Se dit de l'ovaire quand il est situé au- dessous du plan d'insertion des autres pièces florales.

Capsule Fruit sec déhiscent formé de carpelles soudés, à une ou plusieurs loges, s'ouvrant par deux ou plusieurs valves, ou par des pores.

Déhiscente qui s'ouvre de lui-même.

Astringente qui a la propriété de resserrer.

Fébrifuge qui fait baisser la fièvre.

Emollient qui a la propriété de ramollir les tissus

Cholagogue se dit des substances qui facilitent l'évacuation de la bile

Aphrodisiaque se dit de substances qui excitent le désir sexuel

Vasoconstructeur se dit des substances qui déterminent la diminution du calibre des vaisseaux sanguins.

Stomatite inflammation de la muqueuse buccale.