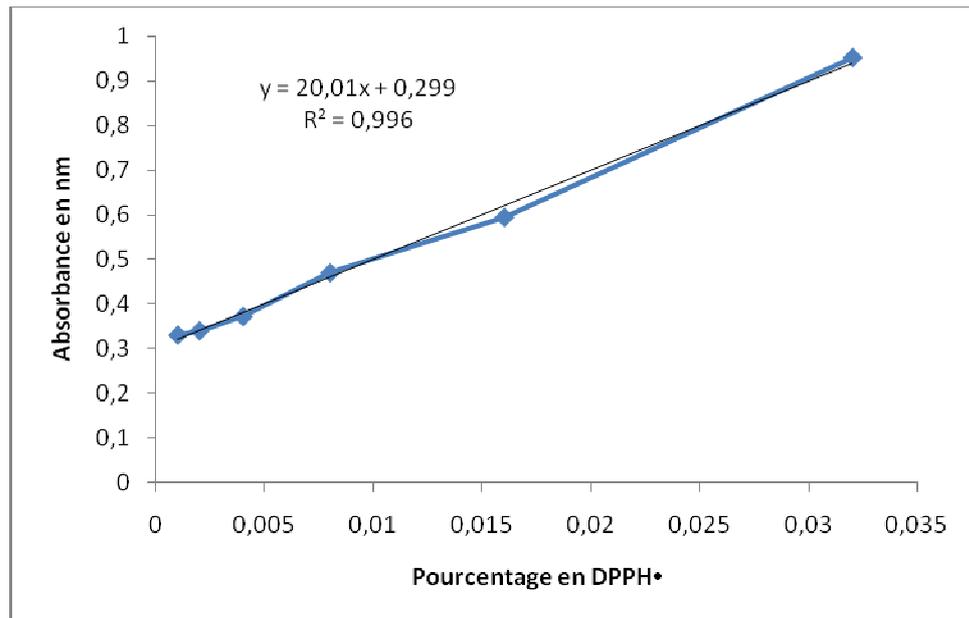


#### II.4. Activité anti-radicalaire

L'activité anti-oxydante des différentes HE (**EC juv**, **EC adt**, **EG juv**, **EG adt**) est comparée avec celle de l'acide gallique, un composé de référence largement utilisé comme anti-oxydante dans de nombreux produits agro-alimentaires. L'acide gallique est testé en utilisant des concentrations allant de 3 $\mu$ g/ml à 100 $\mu$ g/ml.



**Figure 11** : Courbe de calibration du DPPH•

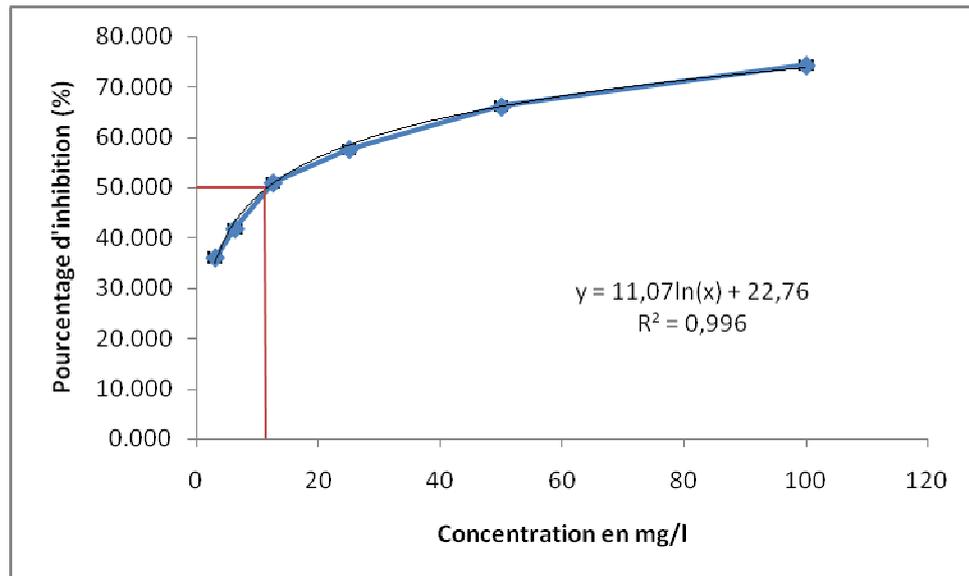
**Tableau XIV :** Comparaison des différentes absorbances de la gamme de concentrations de solution de DPPH• à T<sub>0</sub> et à T<sub>30</sub> par le test « t » de Student après le test de stabilité

<b>DPPH</b>	<b>moyenne Abs T<sub>0</sub></b>	<b>moyenne Abs T<sub>30</sub></b>	<b>P</b>
0,032	0,938	0,940	0,652
0,016	0,582	0,586	0,897
0,008	0,467	0,475	0,084
0,004	0,373	0,389	0,058
0,002	0,345	0,361	0,083
0,001	0,337	0,347	0,057

**p ≥ 0,05** : il n'y a pas de différence significative entre l'absorbance à T<sub>0</sub> et à T<sub>30</sub>

T<sub>0</sub> : temps 0 min

T<sub>30</sub> : temps 30 min



**Figure 12 :** Courbe de détermination de la concentration efficace  $CI_{50}$  de l'acide gallique

La  $CI_{50}$  est inversement liée à la capacité anti-radicalaire d'un composé car elle exprime la quantité d'antioxydant requise pour diminuer de 50% la concentration du radical libre ; plus la valeur de  $CI_{50}$  est basse plus l'activité antioxydante d'un composé est grande. La  $CI_{50}$  de l'acide gallique est de  $11,67 \pm 0,47$  mg/l.

**Tableau XV :** Activité anti-oxydante de chaque HE exprimée par leur CI<sub>50</sub> vis-à-vis du DPPH•

HE étudiées	CI <sub>50</sub> en mg/ml
EC juv	55,61 ± 0,82
EC adt	73,52 ± 5,65
EG juv	78,09 ± 5,77
EG adt	36,34 ± 2,64

**EC juv :** HE des feuilles de *E. cinerea* au stade juvénile

**EC adt :** HE des feuilles de *E. cinerea* au stade adulte

**EG juv :** HE des feuilles de *E. globulus* au stade juvénile

**EG adt :** HE des feuilles de *E. globulus* au stade adulte

Les HE des feuilles de *E. cinerea* et de *E. globulus* au stade juvénile et adulte exercent une activité anti-radicalaire vis-à-vis du radical stable DPPH, mais cette activité est plus faible par rapport à celle de l'acide gallique. Les différentes valeurs de la concentration efficace qui réduisent de 50% de DPPH• pour chaque huile essentielle permettent de les classer par ordre de puissance croissante. Plus faible est la CI<sub>50</sub>, plus le pouvoir anti-radicalaire du produit testé est grand : EG adt > EC juv > EC adt > EG juv.

## **TROISIEME PARTIE : DISCUSSION**

## TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

### I. Partie chimique

#### I-1. Rendement en huile essentielle

Les résultats d'extraction des HE par hydrodistillation présentés dans le tableau VII montrent qu'au stade juvénile, les feuilles de *Eucalyptus*, *E. cinerea* et *E. globulus* fournissent une HE avec un rendement plus élevé qu'au stade adulte. Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature concernant les HE de feuilles de *E. globulus*, Diksha et al ont rapporté en 2012 que les jeunes feuilles de *E. globulus* ont un rendement en HE plus élevé par rapport aux feuilles adultes [48] ; D'une manière générale, le rendement en HE décroît avec l'âge de la plante [49]. Mais à part l'âge de la plante, le cycle végétatif de la plante, le mode d'extraction, les facteurs climatiques et la nature du sol peuvent modifier la composition et le rendement en HE [50].

#### I-2. Profils chimiques

L'analyse de la composition chimique des HE EC juv, EC adt, EG juv, EG adt par chromatographie en phase gazeuse montrée dans les tableaux VIII, IX, X et XI a permis d'identifier 23 pics correspondant à 23 composants pour EC juv et qui représentent 97,9% des composants totaux de HE, 22 pics correspondant à 22 composants pour EC adt soit 96,9% des composants totaux de HE, 20 pics correspondant à 20 composants pour EG juv et qui représentent 97,7% des composants totaux de HE, et 21 pics correspondant à 21 composants pour EG adt soit 98% des composants totaux de la HE. Ait-Ouazzou A et al ont identifié en 2011, 18 composés pour le *E. globulus* [38], Sayonara MS et al ont identifié en 2011, 10 composés pour le *E. cinerea* [4] Elaissi A et al ont démontré en 2012 que HE de *E. cinerea* comporte 22 composés [51].

Le 1,8-cinéole est le composant majoritaire dans les quatre différentes HE étudiées, son pourcentage est de 68,5% pour EC juv, de 60,7% pour EC adt, de 63,2% pour EG juv, et de 62,2% pour EG adt ; la littérature rapporte que HE de *E. globulus* est composée de 94,48% de  $\gamma$ -terpinène et que le composé 1,8-cinéole y est présent à seulement 3,20% [52] ; une étude effectuée sur HE de *E. globulus* en central nord de Nigeria a montré qu'elle ne contient pas de 1,8-cinéole et le composé majoritaire est représenté par le terpinèn-4-ol (23,46%), les conditions géographiques et climatiques sont impliquées comme facteurs responsables dans cette variation [53], nous déduisons donc

que dans notre étude ce sont des huiles essentielles d'eucalyptus chemotypées à 1,8-cinéole.

D'autres composants majoritaires et communs aux quatre huiles essentielles étudiées sont identifiés comme l' $\alpha$ -pinène et le limonène. Le  $\gamma$ -terpinène et le *p*-cymène sont en quantité plus élevée dans *E.globulus* que dans *E.cinerea*. Des constituants comme l'acétate d' $\alpha$ -terpényle, l' $\alpha$ -terpinéol et le spathuléol ne sont présents que dans les HE de *E. cinerea*, alors que le trans-pinocarvéol et le néral ne sont identifiés que dans les HE de *E. globulus*. Globalement, la présence de tous ces composés pré-cités dans les HE de *E. cinerea* et de *E. globulus* est déjà rapportée dans la littérature, avec des différences au niveau des pourcentages dans les HE [4, 38, 54-57]. Selon AFNOR NF T75-225 le pourcentage de *trans*-pinocaveol pour les HE de *E.globulus* est de l'ordre de 1 - 5% ce qui correspond à nos résultats 2,7 – 3,2% [58], alors que cette molécule est absente dans nos HE de *E. cinerea*. Pour le cas de l'acétate d' $\alpha$ -terpényle, la comparaison des résultats de notre analyse avec les données de la banque de HE constituée par le laboratoire LCQSP lui-même confirme la présence de ce composé seulement dans les HE de *E. cinerea* [4], ce composé pourrait être pris comme marqueur pour l'identification de la HE de *E. cinerea*. Par ailleurs, nous avons observé une constance de la composition chimique des huiles essentielles à l'intérieur de la même espèce d'Eucalyptus aux stades juvénile et adulte.

## **II. Partie biologique**

### **II.1. Activités vasorelaxantes**

L'étude de l'activité vasorelaxante des HE des feuilles de *E. cinerea* et de *E. globulus* aux stades juvénile et adulte a montré une activité vasorelaxante sur l'aorte isolée de rat précontractée par la phényéphrine à  $10^{-6}$ M. En moyenne, la  $CE_{50}$  calculée pour les quatre HE testées est de 0,40 mg/ml, et les études statistiques réalisées ont conclu que les différences entre les valeurs des  $CE_{50}$  calculées sont non significatives. A notre connaissance, la littérature n'a pas encore rapporté l'effet vasorelaxant des HE des feuilles de *E. cinerea* et de *E. globulus*. Cependant des études antérieures ont montré que certaines HE possèdent une activité vasorelaxante responsable de l'effet antihypertenseur [59].

## II.2. Activité anti-radicalaire

Considérant les résultats des travaux antérieurs qui rapportent des diminutions de l'ordre de 20% de la valeur de l'absorbance du DPPH• seul en solution méthanolique incubées pendant 120 min à 25°C [60], nous avons réalisé l'expérience suivante : des solutions méthanoliques témoins de DPPH• à différentes concentrations (0,001% ; 0,002%, 0,004%, 0,008%, 0,016%, 0,032%) sont préparées et incubées durant l'expérience. L'absorbance de chaque solution est lue à 517 nm toutes les 5 min pour voir la stabilité des solutions. L'expérience est réalisée en triplicat. Les valeurs de l'absorbance enregistrées n'ont montré aucune variation significative, une bonne linéarité entre la concentration et la valeur de l'absorbance obtenue ( $R^2=0,996$ ), ( $p \geq 0,05$ ). Ceci signifie que tout changement de la valeur de l'absorbance enregistrée lorsqu'on met la solution de DPPH• en contact avec la HE ou l'acide gallique est dû au seul effet de la HE ou de l'acide gallique.

Selon les résultats du test anti-radicalaire utilisant le DPPH•, les HE de *E. globulus* et de *E. cinerea* aux stades juvénile et adulte exercent un effet anti-radicalaire dose-dépendant. Toutefois, les  $CI_{50}$  calculées pour les quatre HE sont largement supérieures à 100mg/l, ce qui laisse conclure une très faible activité anti radicalaire de nos HE vis-à-vis de DPPH• [61]. La  $CI_{50}$  calculée pour l'acide gallique est de  $11,67 \pm 0,47$  mg/l ( $11,67 \times 10^{-3} \pm 0,47 \times 10^{-3}$  mg/ml). Les faibles activités antioxydantes des HE sont liées au comportement des composants chimiques contenus dans chaque HE vis-à-vis du DPPH•.

## III. Corrélation entre composition chimique et activité biologique

### III.1. Corrélation entre composition chimique et activité vasorelaxante

Nous avons essayé d'établir une corrélation entre la composition chimique des HE et l'effet vasorelaxant observé. Les résultats de l'analyse de la composition chimique ont montré que les HE des feuilles de *E. globulus* et de *E. cinerea* aux stades juvénile et adulte étudiées dans ce travail sont chémotypées à 1,8-cinéole, et ce composé se trouve très majoritaire dans les HE étudiées. Parallèlement aux tests vasorelaxants réalisés avec les quatre HE, nous avons effectué le même test pour le 1,8-cinéole, et nous avons trouvé une  $CE_{50} = 0,67 \pm 0,03$  mg/ml pour ce composé. Des études antérieures ont montré que le 1,8-cinéole a une activité vasorelaxante et que des injections

intraveineuses d'1,8-cinéole sur des rats normaux et anesthésiés ont diminué leur pression artérielle [62], et cette activité vasorelaxante du 1,8-cinéole serait endothélium-dépendante [63]. Les résultats de notre étude sont donc en accord avec la littérature et que 1,8-cinéole contribue sans doute à l'activité vasorelaxante de nos HE. Par ailleurs, des études cliniques de l'activité anti-inflammatoire des HE d'*Eucalyptus* chémotypée à 1,8-cinéole administrées par inhalation ont montré que chez les patients ayant inhalé la HE d'*Eucalyptus* Chémotypée à 1,8-cinéole, on a observé une baisse de leur tension artérielle par rapport aux autres groupes dont leurs tensions artérielles ont augmenté [64].

Cependant, en comparant les valeurs des  $CE_{50}$  de nos HE ( $CE_{50} = 0,40$  mg/ml) avec celle de 1,8-cinéole ( $CE_{50} = 0,67 \pm 0,03$  mg/ml), on peut dire que les HE sont plus actives, l'étude statistique utilisant le test « *t* » de student a d'ailleurs montré que les différences sont significatives ( $p < 0,05$ ). Compte tenu de la composition chimique des HE étudiées, si on considère que dans 1mg des HE il y aurait en moyenne 0,64mg de 1,8-cinéole, les valeurs des  $CE_{50}$  calculées pour les HE se situeraient aux alentours de 1mg/ml. Ces résultats supposent donc que le 1,8-cinéole n'est pas le seul composé présent dans les HE responsable de l'activité vasorelaxante.

Faute de produits de référence pour des analyses supplémentaires, nous avons considéré chaque constituant des HE et la recherche bibliographique a permis de sortir des activités vasorelaxantes déjà décrites pour certains d'entre eux, à savoir l' $\alpha$ -terpinéol, le terpinène-4-ol, le *p*-cymène, et le  $\beta$ -myrcène. Des études antérieures ont montré que l' $\alpha$ -terpinéol induit une vasorelaxation et cet effet vasorelaxant est bloqué en présence de L-NAME [65], de plus, des injections intraveineuses d' $\alpha$ -terpinéol sur des rats à une dose de 5mg/kg diminuent leurs pressions artérielles [66]. Le terpinène-4-ol induit une vasorelaxation sur des aortes isolées de rat précontractées avec une solution de  $K^+$  dépolarisant [67], et l'injection intraveineuse du terpinène-4-ol induit une diminution de la pression artérielle sur des rats normotensifs et hypertendus [62]. Concernant le *p*-cymène, une étude sur des aortes isolées de rat a montré que ce composé exerce une activité vasorelaxante concentration-dépendante et non endothélium dépendante [68]. Une autre étude a mis une corrélation entre l'activité vasorelaxante d'une HE et la présence de *p*-cymène et de  $\beta$ -myrcène [59]. D'autres études comme celles réalisées par Omar AM et al ont démontré en 2013 que la HE d'*Eucalyptus calmadulensis*

chémotypée à 1,8-cinéole possède une activité vasorelaxante. Le 1,8-cinéole est le composant majoritaire et est partiellement responsable de cette activité mais c'est la synergie d'action entre 1,8-cinéole,  $\alpha$ -terpinol, *p*-cymène qui serait responsable de l'activité vasorelaxante [69]. Dans le cas de nos HE étudiées, l'effet vasorelaxant ne serait pas dû à la seule action de 1,8-cinéole, plusieurs molécules contenues dans chaque huile essentielle peuvent y contribuer de façon synergique. Il faut noter que les molécules citées ci-dessus impliquées dans le mécanisme de vasorelaxation sont toutes des monoterpènes et ceci est en accord avec la littérature [70].

### **III.2. Corrélation entre composition chimique et activité anti-radicalaire**

D'après la littérature les composants majoritaires de nos HE à savoir le 1,8-cinéole (60,7 – 68,5%), *p*-cymène (1,1 - 9,3%),  $\alpha$ -pinène (6 - 16%), limonène (4,6 - 7,2%) ont une activité anti-oxydante non appréciable vis-à-vis du DPPH• [71-73]; d'autres auteurs affirment que HE des feuilles d'*Eucalyptus globulus* est presque inefficace dans la recherche de l'activité anti-oxydante sur le test utilisant le DPPH• [74]; nos résultats sont ainsi en accord avec la littérature. Cependant, la présence des composés comme le terpinène et ses dérivés comme l' $\alpha$ -terpinène,  $\gamma$ -terpinène, terpinolène, terpinène-4-ol, et  $\alpha$ -terpinéol dans nos huiles devrait donner lieu à une activité antiradicalaire même modérée [53, 75], il est donc possible que la faible concentration de ces composés dans notre huile ne suffirait pas pour obtenir une activité antiradicalaire appréciable.