



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Et Ecologie Végétale

قسم :بيولوجيا وايكولوجيا النبات

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biologie et physiologie végétale

Spécialité : Biologie et physiologie de la reproduction

Intitulé :

**Contribution à l'étude de l'activité antioxydante, antimicrobienne
et anti-enzymatique des extraits foliaires de l'espèce :
Eucalyptus globulus Labill.**

Présenté et soutenu par : Bendjamaa Ismahane

Krabsi Mohamed El Amine

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme BAAZIZ BOUCHIBI Nacira

M.C.B Université constantine1

Rapporteur : Mme. BOUCHOUKH Imane

M.A.A Université constantine1

Examineur : Mme. AOUAIDJIA Naouel

M.C.B Université constantine1

*Année universitaire
2018 - 2019*

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions, du plus profond de notre cœur, **Dieu** le tout puissant denous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce travail.

Nous remercions, très chaleureusement Mme **Bouchoukh Imane**(Maître assistante « A » à l'Université Frères Mentouri, Constantine 1) notre encadreur,on tient vivement à lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre gratitude pour sa disponibilité, sa patience et sa compréhension. Merci pour vos précieux conseils et votre soutien à tous les instants, et surtout merci pour vos qualités scientifiques et humaines qui resteront à jamais un bon exemple pour nous.

Nous remercions la présidente du jury, Mme **Bouchibi Baaziz Nacira** (Maître de conférences « B » à l'Université Frères Mentouri, Constantine 1) d'avoir accepté de présider le jury. Nous remercions également Mme **Aouaidjia Naouel**. (Maître de conférences « B » à l'Université Frères Mentouri, Constantine 1)de nous avoir honorés en examinant notre travail.

Nous remercions très sincèrement Mr **Bensouici Chaouki**., Chef de laboratoire de biochimie auCentre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt). On tient à lui exprimer notre sincère reconnaissance et notre plus profond respect.

Nos remerciements vont également Mr **Debbi Ali**, Mme **Ikhlef Assia** et Mr **Abdessamad Ala**, les chefs des trois laboratoires respectivement : Laboratoire de Mycologie, laboratoire de Bactériologie et laboratoire de Qualité-Analyse, au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt). Merci de nous avoir accueilliset aidés.

De même, nos remerciements vont vers Mme **Maghboune Ibtisseme**, Ingénieure au laboratoire Qualité-Analyse pour tous ses conseils, ses encouragements et son enthousiasme. C'était un véritable plaisir de travailler ensemble.Nous adressons nos remerciements à l'ensemble des ingénieurs et techniciens des laboratoires du CRBt pour leur aide.

Nos remerciements vont à tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à l'attribution de ce travail.

Un grand merci à tous

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes chers parents pour les encouragements, tendresse, l'affection et le soutien durant mes études.

Je souhaite que vous trouverais ici le fruit de vos sacrifices.

A mes soeurs

A toute ma famille

A tous mes amis (es)

A tous ceux dont l'amitié sincère mes agréable

A tous mes professeurs

A toute la promotion de Biologie et physiologie végétale

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à

l'élaboration de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à : A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

Ma mère **DALILA** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutiens tous ces sacrifice consentis ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Mon père **CHAABANE**. Qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.

A mes très chers frères **KHALIL** et **ABD ERAHMANE** ; les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A ma deuxième famille « Mes ami(e)s » qui m'ont apporté la force, la joie, le bonheur, ils m'ont toujours comblé avec leurs présences, et Amour.

«**Abdeldjebar, Souheil, Ahmed, Hichem, Aouab, Khaled, Allaa eddine, ma chère MAROUA, Narjes, Amira** », je vous aime énormément.

Amine.

الملخص:

يتميز نبات الأوكالبتوس (*Eucalyptus globulus* Labill.) بعدة خصائص طبية مهمة لكونه نبات عطري غني بالمركبات الايضية الثانوية، حيث يهدف هذا البحث لتقييم تأثيرات النشاط المضاد للأوكسدة للإنزيمات، البكتيريا والفطريات لمستخلصات الأوراق.

تم تحديد المحتوى الكمي للمركبات الفينولية في مستخلصات الكحول المختلفة للأوراق، بالإضافة الى الانشطة المضادة للأوكسدة من خلال الطرق التالية: DPPH ، ABTS ، Reducing power، CUPRAC ، GOR. حيث أظهرت النتائج تثبيطاً مهماً للجذور الحرة و القريبة جداً للمعايير.

تم اختبار النشاط المضاد للزهايمر من خلال تقييم القوة المضادة للإنزيم أستيلكولين ستراتاز (AChE). تبين ان مستخلص L'acétate الأكثر نشاطاً، حيث يكون IC50 (ميكروغرام / مل 6.48 ± 0.02) مكافئاً تقريباً لمعيار (ميكروغرام/مل 6.27 ± 1.15) Galantamine. هذه النتيجة تؤكد دور البوليفينول في نشاط مضادات الكولين.

فيما يتعلق بالنشاط البيولوجي، تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصاتنا ضد سلالتين، *Staphylococcus aureus* و *E. coli*، حيث كشفت النتائج عن تثبيط قوي للغاية.

في حين أظهرت نتائج المستخلصات ضد الفطر *Fusarium oxysporum* حساسية منخفضة لمختلف التراكيز.

الكلمات المفتاحية:

Eucalyptus globulus Labill. - البوليفينول – النشاط المضاد للأوكسدة- أسيتيل كولين ستراتاز – النشاط المضاد للبكتيريا – النشاط المضاد للفطريات.

Résumé :

L'espèce *Eucalyptus globulus* Labill. possède d'importantes propriétés médicinales. C'est une plante aromatique riche en métabolites secondaires, de ce fait notre étude s'intéresse à l'évaluation des effets antioxydants, anti-enzymatiques et antimicrobiens de ses extraits foliaires.

Les polyphénols totaux et les flavonoïdes ont été dosés et estimés à des taux considérables dans les différents extraits alcooliques des feuilles.

L'activité antioxydante des extraits a été estimée par l'utilisation des méthodes DPPH, ABTS, Reducing power, CUPRAC et GOR. Les résultats ont montré une très importante inhibition des radicaux libres avec des valeurs significatives très proches à celles des standards.

L'activité anti Alzheimer a été testée par l'évaluation du pouvoir anti enzymatique contre l'acétylcholinestrase (AChE). L'extrait acétate exerce une activité anti- AChE très importante avec une IC_{50} de $(6,48 \pm 0,02 \mu\text{g/ml})$ presque équivalente à celle du standard Galantamine $(6.27 \pm 1.15 \mu\text{g/ml})$. Ce résultat confirme encore le rôle des polyphénols dans l'activité anticholinestérase.

On ce qui concerne l'activité biologique, on a testé le pouvoir antibactérien de nos extraits vis-à-vis deux souches, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*. Les résultats ont révélé une inhibition très forte par les trois extraits. L'activité antifongique a été également testé vis-à-vis l'espèce *Fusarium oxysporum*. Les résultats ont révélé que ce champignon a montré une faible sensibilité à différentes concentrations de nos extraits.

Mots clés : *Eucalyptus globulus* Labill.- Polyphénols- Activité antioxydante- Acétylcholinestérase- Activité antibactérienne- Activité antifongique.

Summary

The species *Eucalyptus globulus* Labill. has important medical properties and it is an aromatic plant rich in secondary metabolites; in this context, our studies interested in evaluating the antioxidant, anti-enzymatic and antimicrobial effects of its leaf extracts.

Total polyphenols and flavonoids were measured and estimated at considerable levels in alcohol extracts of the leaves.

The antioxidant activity of the extracts was estimated by the use of DPPH, ABTS, Reducing power, CUPRAC and GOR methods. The results showed a very important inhibition of free radicals with significant values very close to those of the standards.

The anti-Alzheimer activity was tested by evaluating the anti-enzymatic power against acetylcholinesterase (AChE). The acetate extract has a very high anti-AChE activity with an IC₅₀ of (6.48 ± 0.02 µg / ml) almost equivalent to that of the Galantamine standard (6.27 ± 1.15 µg / ml). This result confirms also the role of polyphenols in anticholinesterase activity.

Regarding the biological activity, the antibacterial power of our extracts was tested against two strains, *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. The results revealed a very strong inhibition by the three extracts. Antifungal activity was also tested against the species *Fusarium oxysporum* where it showed a low sensitivity to different concentrations of the extracts.

Key words:

Eucalyptus globulus Labill.- Polyphenols- Antioxidant activity- Acetylcholinesterase- Antibacterial activity- Antifungal activity.

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
ملخص	
Summary	
Table des matières	
Liste des Tableaux	
Liste des Figures	
Liste des abréviations	
Introduction générale	01
PARTIE 1 : REVUES BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Présentation générale de la plante	
I-1- La famille des Myrtacées.....	03
I-1-1- Description botanique	03
I-1-2- Répartition géographique.....	03
I-1-3- Principaux genres.....	03
I-2-Le genre <i>Eucalyptus</i>	03
I-2-1-Présentation et origines.....	03
I-2-2- Description botanique.....	03
I-2-3- Répartition géographique.....	04
I-3- Présentation de l'espèce <i>Eucalyptus Globulus</i> Labill.....	04
I-3-1- Origine et historique.....	04
I-3-2- Noms vernaculaires.....	04
I-3-3- Position systématique.....	04
I-3-4-Description morphologique.....	04
I-3-5- Usage traditionnel.....	08
Chapitre II: Métabolisme secondaire	
II-1-Définition.....	10
II-2- Biosynthèse.....	10

II-3-Classification.....	11
III-3-1- Polyphénols.....	11
II-3-1-1- Structure chimique.....	12
II-3-1-2-Biosynthèse des polyphénols.....	12
II-3-1-3- Classification.....	13
a- Polyphénols monomériques.....	13
-Acides phénoliques.....	13
-Les flavonoïdes	14
b-Polyphénols sous forme de polymères.....	15
-Tanins.....	15
-Lignines.....	16
-Coumarines.....	17
-Stilbènes.....	18
III-3-2- Les alcaloïdes.....	18
III-3-2-1- Définition.....	18
III-3-2-2- Structure des alcaloïdes	19
III-3-2-3- Biosynthèse.....	19
III-3-2-4- Classification des alcaloïdes.....	20
III-3-2-4- Fonctions et propriétés.....	21
III-3-3- Terpénoïdes.....	21
III-3-3-1- Définition.....	21
III-3-3-2- Structure.....	21
III-3-3-3-Biosynthèse.....	22
III-3-3-4- Classification.....	22
III-3-3-5- Fonctions et propriétés.....	24
PARTIE 2 : MATERIELS ET METHODES	
I- Matériel végétal.....	25
II-Etude phytochimique.....	25
II-1- Extraction des polyphénols.....	25
II-1-1- Extraction assistée par macération (EAM).....	26
II-1-2- Fractionnement de l'extrait brut par Extraction Liquide-Liquide (ELL).....	28

II-2- Dosage des composés phénoliques.....	30
II-2-1- Dosage des polyphénols.....	31
II-2-2- Dosage des Flavonoïdes.....	31
II-3- Activités antioxydantes.....	32
II-3-1- Le test DPPH.....	32
II-3-2- ABTS scavengingactivity.....	32
II-3-3- Reducing power test (Pouvoir réducteur).....	33
II-3-4- Galvinoxyl radical (GOR) scavenging assay.....	34
II-3-5- Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC).....	34
II-4- Activités anti enzymatiques.....	35
II-4-1- Activité Anti- cholinestérase.....	35
II-4-2- Activité anti-tyrosinase.....	36
III- Etude biologique.....	36
III-1- Activité antibactérienne.....	36
III-2- Activité antifongique.....	38
PARTIE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	
I-Etude phytochimique.....	43
I-1- Dosage des composés phénoliques.....	43
I-1-1- Dosage des polyphénols totaux.....	43
I-1-2- Dosage des Flavonoïdes.....	44
I 2-Activités anti oxydantes.....	45
I-2-1-Le test DPPH.....	45
I-2-2-Le test ABTS.....	46
I-2-3- Le test Reducing power (Pouvoir réducteur).....	47
I-2-4- Le test Galvinoxyl radical (GOR).....	48
I-2-5-Le test CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity).....	49
I-3-Activitéanti-enzymatique.....	51
I-3-1-Activité Anti-acétylcholinestérase	51
I-3-2- Activité anti-tyrosinase.....	54
II- Etude biologique.....	55
II- 1. Activité antibactérienne.....	55
II.2. Activité antifongique.....	58

Conclusion et perspectives.....61

Références bibliographiques

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
Tableau 01	Classification de l' <i>Eucalyptus Globulus</i>	05
Tableau 02	Quelques usages traditionnels d' <i>E. Globulus</i>	09
Tableau 03	Quelques exemples des différents types de terpenoïdes	23
Tableau 04	Préparation de la solution tampon	35
Tableau 05	Résultats du dosage des polyphénols	44
Tableau 06	Résultats du dosage des Flavonoïdes	44
Tableau 07	Résultats du test DPPH des extraits foliaires d' <i>E. globulus</i>	46
Tableau 08	Résultats du test ABTS des extraits foliaires d' <i>E. globulus</i>	47
Tableau 09	Résultats du test du Pouvoir réducteur des extraits foliaires d' <i>E.globulus</i>	48
Tableau 10	Résultats du test GOR des extraits foliaires d' <i>E. globulus</i>	49
Tableau 11	Résultats du test CUPRAC des extraits foliaires d' <i>E.globulus</i>	50
Tableau 12	Résultats de l'Anti-Acétylcholinestérase des extraits foliaires d' <i>E. globulus</i>	52
Tableau 13	Résultats de l'activité anti-tyrosinase des extraits foliaires d' <i>E. globulus</i>	55
Tableau 14	Diamètre des zones d'inhibitions d' <i>E. Coli</i> .par les extraits foliaires d' <i>E.globulus</i>	56
Tableau 15	Diamètre des zones d'inhibitions de <i>Staphylococcus aureus</i> par les extraits foliaires d' <i>E.globulus</i>	56
Tableau 16	Diamètre des zones d'inhibition d' <i>E. Coli</i> .par les extraits foliaires d' <i>E.globulus</i>	57
Tableau 17	Diamètre des zones d'inhibition de <i>Staphylococcus aureus</i> par les extraits foliaires d' <i>E.globulus</i>	57
Tableau 18	Diamètres des zones de développement du champignon de la première série de concentrations (en mm)	58
Tableau 19	Diamètres des zones de développement du champignon de la deuxième série de concentrations (en mm)	59
Tableau 20	Résultats de l'activité inhibitrice de la première série de concentrations	59
Tableau 21	Résultats de l'activité inhibitrice de la deuxième série de concentrations	59

Liste des Figures

N°	Titre	Page
Figure 01	<i>Eucalyptus Globulus</i>	06
Figure 02	Les racines de l' <i>Eucalyptus Globulus</i>	07
Figure 03	Voies du métabolisme secondaire des plantes	11
Figure 04	Le noyau phénols	12
Figure 05	Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols	13
Figure 06	Acide benzoïque	14
Figure 07	Acide cinnamique	14
Figure 08	Structure de base des flavonoïdes	15
Figure 09	Structure des tanins hydrolysables	16
Figure 10	Structure de base des tanins condensés	16
Figure 11	Structures chimiques de lignine	17
Figure 12	Structure d'une molécule de coumarine	17
Figure 13	Structure chimique de stilbène	18
Figure 14	Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes	20
Figure 15	Structure de base de l'isoprène	22
Figure 16	Séchage des feuilles	25
Figure 17	Broyage des feuilles	25
Figure 18	Agitation de la poudre émergée dans le méthanol	26
Figure 19	Macération	27
Figure 20	Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par macération	27
Figure 21	L'évaporateur rotatif	28
Figure 22	Affrontement avec le chloroforme	28
Figure 23	Affrontement avec l'acétate d'éthyle	29
Figure 24	Affrontement avec le butanol	30
Figure 25	Illustration de la méthode d'aromatogramme	38
Figure 26	Préparation du milieu PDA	39
Figure 27	L'addition de l'agar	40
Figure 28	L'addition de l'extrait au PDA et coulage dans les boîtes de pétri	40
Figure 29	Dépôt des disques de champignon	41
Figure 30	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique	43
Figure 31	Résultats du dosage des polyphénols sur microplaque	43
Figure 32	Courbe d'étalonnage de la quercétine	44
Figure 33	Résultats du DPPH sur microplaque	45
Figure 34	Résultats de l'ABTS sur microplaque	47
Figure 35	Résultats du pouvoir réducteur sur microplaque	48
Figure 36	Résultats du test GOR sur microplaque	49
Figure 37	Résultats du CUPRAC sur microplaque	50
Figure 38	Résultats Anti-Acétylcholinestérase sur microplaque	51
Figure 39	Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique	53
Figure 40	Résultats de l'activité anti-tyrosinase sur microplaque	54
Figure 41	L'effet des extraits sur <i>E. coli</i>	56
Figure 42	L'effet des extraits sur <i>Staphylococcus aureus</i>	56
Figure 43	L'évolution de <i>Fusarium oxysporium</i> à la faible concentration (1mg)	58

Figure 44	L'évolution de <i>Fusarium oxysporium</i> à la forte concentration (256 mg, 128mg)	58
-----------	---	----

Liste des abréviations

ADN: Acid désoxyribonucléique

BHT: Butyl-hydroxy-toluène

BHA: Butyl-hydroxy-anisole

APG: Angiospères Phylogeny Group

mg: Milligramme

g: Gramme

mm: Millimètre

MeOH: Méthanol

DPPH: 2,2-diphényle-1-picrylhydrazyl

DMSO: Diméthylsulfoxy

%: Pourcentage

Cm: Centimètre

m: Mètre

HHDP: hexahydroxy diphénique

MVA: Mévalonique

IPP: Isopentenyl pyrophosphate

DMAPP: Isomérisé en diméthylallyl pyrophosphate

FPP: Farnésyldiphosphate

GPP: Géranyl pyrophosphate

FPP: Farnésyl pyrophosphate

C: Carbone

CRBT: Centre de recherche de biotechnologie

EAM: Extraction assistée par macération

C°: Degré Celsius

ml: Millilitre

H: Heure

ELL: Extraction Liquide-Liquide

V: Volume

UV: Ultra-violet

H₃PW₁₂O₄₀: Phosphotungsténe

H₃PMo₁₂O₄₀: Phosphomolybdéne

Nm: Nanomètre

D.O: Densité Optique

min: Minute

µl: microlitre

Na₂CO₃: Carbonate de sodium

CH₃COOK: Potassium acétate

Al(NO₃)₂: nitrate d'aluminium

H₂O: L'Eau

Ac: Absorbance du contrôle.

At: Absorbance d'extrait ou standard

E: Eucalyptus

ABTS: Acid 2,2'- azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

±: Plus ou moins

µg: Microgramme

K₂S₂O₈: Solution potassium

TROLO: Acid6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthyl-chroman-2- carboxylique

pH: Potentiel hydrogène

CCl₃COOH: Acide trichloracétique

FeCl₃: Chlorure de fer

CE: Concentration efficace

1V/ 1V: deux solutions avec un même volume

GOR: Galvinoxyl radical

CUPRAC: Cupric reducing antioxidant capacity

TAC: La capacité antioxydante totale

DCM: Dichlorométhane

ACNH₄: Acétate d'ammonium

S: Solution

DTNB: 5,5'- dithiobis-[2 nitrobenzoate]

AChE: Acétylthiocholine

ACI: Acétylthiocholineiodide

Na Cl: Chlorure de sodium

PCA: Plate Count Agar

PDA: Potato Dextrose Agar

EAG: Equivalent d'acide gallique

EQ: Equivalent de la quercetine

IC₅₀: Concentration d'inhibition à 50 %

NA: Non Absorbance

Sat: Saturation

MA: Maladie l'Alzheimer

DZI: Diamètres des zones d'inhibition

UFC: Unité Formant Colonie

Introduction

Introduction générale

Les propriétés médicinales des plantes ont été recherchées par de nombreuses études à travers le monde, grâce à leur faible toxicité et leur caractère économique (Auddy et al., 2003). Ces études sont concentrées sur les bienfaits des composés phytochimiques des fruits, des légumes, et des plantes en général et sur leur impact sur la santé humaine.

Les substances végétales sont riches en antioxydants qui sont utilisés pour lutter contre les radicaux libres responsables de plusieurs pathologies, telles que le cancer et les maladies neurodégénératives.

Ces derniers sont aussi impliqués dans la détérioration de la qualité organoleptique et hygiénique des aliments (Hale et al. ; 2008). Quel que soit le cas, le risque est aggravé avec l'accumulation de ces radicaux libres dans l'organisme en aboutissant à une chaîne réactionnelle radicalaire qui dégrade les molécules biologiques (ADN, protéines, lipides, et glucides...).

Un autre problème qui touche la santé publique est l'émergence de la résistance aux antibiotiques, à la suite de l'utilisation massive et parfois abusive de ces derniers (De Billerbeck, 2007). Ceci a conduit à une forte demande du consommateur pour de nouveaux antibiotiques contre les germes pathogènes (Fisher, 2008), et a incité les scientifiques à recourir à la phytothérapie, dans le but d'avoir des molécules aux propriétés antioxydantes et antimicrobiennes.

Des études épidémiologiques révèlent que la consommation des fruits et légumes est associée à la réduction des maladies chroniques (Dastmalchi et al., 2008), de plus, plusieurs études ont été investies dans la recherche de nouvelles molécules antioxydantes à partir des extraits de plantes pour renforcer la défense antioxydante de l'organisme (Gutiérrez et al., 2003). Ainsi, ces dernières années, diverses études sont focalisées sur l'extraction des antioxydants naturels à faible coût à partir des plantes médicinales qui peuvent remplacer les additifs de synthèses tels que le BHA (Butyl-hydroxy-anisole) et le BHT (Butyl-hydroxy-toluène) qui pourraient être cancérigènes et même toxiques pour le consommateur (Daker et al., 2008). Outre l'activité antioxydante, les extraits des plantes ont montré également des effets antibactériens vers diverses bactéries pathogènes (karou et al., 2005).

L'Eucalyptus est l'un des principaux genres de la famille des Myrtacées. Il est originaire d'Australie et de Tasmanie, et il est acclimaté dans d'autres pays comme l'Inde, le Brésil (Ghedira et al., 2008) et dans le bassin Méditerranéen (Aït yousef, 2006). En Algérie, l'Eucalyptus occupe une surface de 39.000 ha en 1995 (Jacovelli, 2002) et l'espèce

E. Globulus est l'une des espèces les plus répondues (Aït youssef, 2006). Ses feuilles sont employées traditionnellement comme remède tonique sous forme d'infusion pour traiter la grippe saisonnière, les infections des voies respiratoires, les diarrhées, les fièvres, les douleurs dentaires, les engelures et autres complications (Aït youssef, 2006; Kim et al., 2001).

Les propriétés pharmacologiques de l'Eucalyptus sont liées essentiellement à sa composition en diverses classes de métabolites secondaires à savoir les huiles essentielles, les tannins et les flavonoïdes (Vankar et al., 2006). Outre les effets thérapeutiques traditionnels, les extraits de feuilles de cette plante sont inclus, au Japon, dans la liste des additifs alimentaires (Avis n°120,16 avril 1996 ministère de la santé) (Amakura et al., 2002). Ces extraits ainsi que les huiles essentielles d'*E. Globulus* sont introduits également dans la formulation de multiples produits pharmaceutiques de diverses maladies, cas des affections respiratoires, et dans certains produits cosmétiques (Ghedira et al., 2008 ; Takahashi et al., 2004).

Ces dernières années, les recherches scientifiques concernant les extraits des feuilles de *E. Globulus* sont basées sur l'extraction, l'identification de polyphénols (Atoui et al., 2005 ; Conde et al., 1997) et l'évaluation de propriétés biologiques de ces extraits telles que l'activité antidiabétique (Ghedira et al., 2008 ; Goetz, 2007), antibactérienne (Takahashi et al., 2004) et antioxydante (Atoui et al., 2005).

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'une étude phytochimique en évaluant les propriétés antioxydantes, antifongiques et antibactériennes des différents extraits phénoliques d'une plante médicinale largement distribuée en Algérie : *E. Globulus*.

Ce manuscrit est divisé en quatre parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique qui comprend deux chapitres, le premier chapitre est consacré à la présentation générale de la plante *E. Globulus* qui a fait l'objet de la présente étude. Le deuxième chapitre consiste une présentation générale des métabolismes secondaires.
- La deuxième partie est celle des matériels et des méthodes, partagée en deux parties, une biologique et l'autre phytochimique.
- La troisième partie est constituée des résultats obtenus et de leur discussion.
- Enfin, une conclusion générale.

Partie 1
Revue
bibliographiques

Chapitre I : Présentation générale de la plante

I-1- La famille des Myrtacées :

I-1-1- Description botanique :

Les Eucalyptus appartiennent à la famille des Myrtacées une grande famille. Ils comptent environ 600 à 700 espèces et variétés (Warot, 2006). Les plantes de cette famille sont des arbres ou des arbustes à feuilles généralement opposées, entières, de grandes translucides avec stipules réduits ou totalement absents (Judd et al., 2002 ; Ozenda, 1982). Ces plantes se caractérisent par des fleurs odorantes cycliques, actinomorphes et bisexuées (Deysson, 1979 ; Spichiger et al., 2002). Leurs fruits sont sous forme de baie ou de capsule et parfois de drupe (Ozenda, 1982 ; Spichiger et al., 2002).

I-1-2- Répartition géographique :

Ces plantes se localisent principalement dans les régions tropicales et se rencontrent particulièrement en Amérique et en Australie (Spichiger et al., 2002). Néanmoins, certaines espèces ont été acclimatées dans d'autres pays tels que les pays du bassin Méditerranéen, l'Europe et l'Amérique du nord (Aït Youssef, 2006).

I-1-3- Principaux genres :

La famille des Myrtacées possède environ 3500 espèces réparties en 150 genres dont les principaux sont : *Eucalyptus*, *Eugenia* (giroflie), *Psidium* (goyavier), *Myrtus* (myrte) et *Syzygium* (jambosier) (Judd et al., 2002 ; Ozenda, 1982).

I-2- Le genre *Eucalyptus* :

I-2-1- Présentation et origines :

Le genre *Eucalyptus* fût décrit et baptisé en 1788 par le botaniste Français Heritier, après qu'il eut examiné des échantillons d'*Eucalyptus obliqua* parmi les différentes plantes récoltées en Australie (Bingendako, 2004).

Le terme *Eucalyptus* dérive du mot grec « Eu » : vrai et « Kalyptus » : couvercle ou opercule (Boullard, 1997), allusion au couvercle du bouton floral qui couvre les étamines (Aït Youssef, 2006). Le genre *Eucalyptus* fait partie des genres les plus importants de la famille des Myrtacées avec environ 600 espèces (Spichiger et al., 2002) dont seulement 16 sont utilisées en médecine (Ghedira et al., 2008).

I-2-2- Description botanique :

Les plantes du genre *Eucalyptus* sont des arbres à feuillage persistant souvent à écorce s'exfoliant. Elles présentent deux types de feuilles, souvent très larges et dressées chez les plantes au stade juvénile puis étroites et pendantes chez les sujets matures (Balmey et Wilson,

2000). Les fleurs sont généralement en bouquets ombelliformes, rarement solitaires et elles possèdent des sépales soudés en opercule conique qui tombe d'une seule pièce lorsque la fleur s'ouvre ; les étamines sont nombreuses et proéminentes. Le fruit de ce genre est sous forme de capsule (Balmey et Wilson, 2000).

I-2-3- Répartition géographique :

L'*Eucalyptus* est originaire d'Australie et de Tasmanie, pays où il constitue la majeure partie de la flore forestière (Aït Youssef, 2006 ; Schauenberg et Paris, 1977). De nombreuses espèces sont acclimatées dans d'autres pays comme l'Inde, le Brésil, l'Europe et le bassin Méditerranéen (Forrest and Moore, 2008 ; Ghedira et al., 2008) certaines pour leur bois, d'autres pour stabiliser le sol, comme brise vent ou comme arbres d'ornement (Balmey et Wilson, 2000). Les feuilles éloignent les insectes, d'où des plantations en Afrique pour diminuer la propagation de la malaria. Il a été introduit en 1857 en Algérie pour drainer les terrains de régions touchées par la malaria (Treiner, 2000).

I-3- Présentation de l'espèce *Eucalyptus Globulus* Labill :

I-3-1- Origine et historique :

L'*Eucalyptus Globulus* Labill. (Du nom de Labillardière le voyageur français qui le découvrit en 1800 lors d'un voyage en Australie) est une espèce très cultivée, prit rapidement une grande extension en Algérie entre 1860 et 1870 (Boudy, 1952).

I-3-2- Noms vernaculaires :

Français : Arbre à la fièvre, gommier bleu et *Eucalyptus officinal*. (Aït Youssef, 2006 ; Ghedira et al., 2008).

Anglais : Bleu gum tree. (Ghedira et al., 2008).

Arabe : Kalitûs, kalatus, calibtous et kafoura. (Aït Youssef, 2006; Baba Aïssa, 1999).

Kabyle: Timezrit. (Aït Youssef, 2006).

I-3-3- Position systématique :

D'après la classification scientifique APG (Angiospères Phylogeny Group) (Guignard, 2001)

Chapitre I : Présentation générale de la plante

Tableau 01 : Classification de l'*Eucalyptus Globulus*

Règne	Plantes
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicots
Sous –classe	Rosidés
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtacées
Genre	<i>Eucalyptus</i>
Espèce	<i>Eucalyptus Globulus</i>

I-3-4-Description morphologique :

L'*E. Globulus* est un bel arbre de croissance rapide qui peut atteindre à l'âge adulte 30 à 35 m de hauteur dans les régions Méditerranéennes (Aït Youssef, 2006) et jusqu'à 100 m dans le milieu naturel (Australie et Tasmanie) (Ghedira et al., 2008).

Le tronc est lisse et cendré, recouvert d'une écorce qui s'exfolie en long lambeaux (Ghedira et al., 2008). Il possède également des anfractuosités contenant une gomme dite « Kito » dont la couleur varie du rouge sang au rouge sombre (Aït Youssef, 2006).

Les feuilles (figure 01 a, b) sont persistantes et polymorphes selon l'âge du rameau. Les rameaux jeunes possèdent des feuilles larges courtes, opposées, sessiles et disposées horizontalement sur les rameaux (Babba Aïssa, 1999 ; Ghedira et al., 2008). Elles mesurent 10 à 15 cm de long et 4 à 8 cm de large avec un limbe entier qui renferme des nodules sécréteurs visibles par transparence (Aït Youssef, 2006). Les feuilles adultes sont aromatiques falciformes de 12 à 30 cm de long et 2 à 5 cm de large, étroites, pointues, épaisses, vert-foncé courtement pétiolées, alternes et pendantes (Ghedira et al., 2008 ; Wichtl et Anton, 2003). Ces feuilles commencent à apparaître lorsque le jeune plant atteint 1,80 à 2,50 m de hauteur, mais elles peuvent encore persister à des hauteurs plus importantes (Ghedira et al., 2008). Leur limbe est entier à faces semblables, il présente également des lenticelles (poches sécrétrices des huiles essentielles) de couleur brune plus en moins foncée (Aït Youssef, 2006 ; Wichtl et Anton, 2003).

Chapitre I : Présentation générale de la plante

La fleur (Figure 01 d) est un gros bouton floral qui prend naissance à l'aisselle de la feuille, solitaire, de couleur bleu-blanc (Ghedira et al., 2008), elle ressemble schématiquement à une sorte de boîte s'ouvrant par un couvercle, ayant la forme d'une urne quadrangulaire dont les arêtes saillantes correspondent aux quatre sépales. Cette urne à quatre pans, de nature ligneuse, mesure 1 à 1,5 cm de long et a un sommet coiffé d'un couvercle déhiscent formé par les 4 pétales soudés (Aït Youssef, 2006). Ce couvercle se soulève à la floraison laissant apparaître de nombreuses étamines à long filets blanchâtres disposés en bouquets, et se détache à la maturité de la fleur (Baba Aïssa, 1999; Wichtl et Anton, 2003).

Le fruit (figure 01 e) est une capsule ligneuse dure et anguleuse, en forme de pyramide quadrangulaire renversée (Aït Youssef, 2006), prenant une teinte marronne à maturité et s'ouvrant légèrement par trois, quatre à cinq fentes (qui dessinent une étoile à son sommet) pour libérer de nombreuses graines sombres (Ghedira et al., 2008).



Figure 01 : *Eucalyptus Globulus* (Balmey et Wilson, 2000 ; Deysson, 1979).

- a. Rameau fleuri ; b. Feuilles au stade juvénile ; c. Fleur avant l'anthèse, en coupe verticale ;
d. Fleur où la coiffe tombée ; e. Fruit.

Chapitre I : Présentation générale de la plante

- Le système racinaire comprend deux parties :

- Un pivot central important s'enfonçant jusqu'à 2,20 m et mesurant, à 80 cm de profondeur, 35 cm de diamètre. A partir de ce niveau, il se divise en 6 grosses racines ayant de 6 à 12 cm de diamètre chacune, descendant parallèlement. (Giordano, 1968) signale, en sols sableux, et dans le cas d'*E. Globulus* des pivots atteignant 4 m de profondeur.

- Une grande concentration de racines à la base du tronc d'où partent 8 racines latérales.

Dans les 40 premiers centimètres du sol, se trouve un réseau latéral dense avec un maximum de racines en surface. Certaines atteignent plus de 3 m de longueur ; il y a de véritables enchevêtrements avec celles des arbres voisins, mais aucune greffe n'a été constatée. (Bisset et Shaw 1964) ou (Jacob 1955).



Figure 2 : Les racines de l'*Eucalyptus Globulus* (Mekelleche ; 2015).

I-3-5- Usage traditionnel :

L'espèce *E. Globulus* est connue, depuis longtemps dans la médecine populaire, par ses effets thérapeutiques multiples : le traitement des fièvres, du diabète, des affections des voies respiratoires, des diarrhées... etc. Outre, les effets thérapeutiques liés aux constituants chimiques, cette espèce est une source également de bois que l'Homme exploite pour des usages divers. Le tableau 02 résume les usages traditionnels des différentes parties d'*E. Globulus*.

Chapitre I : Présentation générale de la plante

Tableau 02: Quelques usages traditionnels d'*E. Globulus* (Slimani ; 2010).

Parties utilisées	Mode	Usage	Références
Feuilles	Tisanes des feuilles séchées ou fraîches	Usage interne: traitement des affections des voies respiratoires; balsamique; tonique; astringent; contre les parasites intestinaux; affections des voies urinaires.	Aït Youssef (2006) ; Baba Aïssa (1999) ; Djerroumi et Nacef (2004) ; Poletti (1982); Wichtl et Anton (2003).
	Aérosol (fumigation des feuilles séchées ou fraîches)	Désinfecter les maisons en période de grippe.	Aït Youssef (2006) ; Baba Aïssa (1999) .
	Feuilles et l'huile d'olive	Usage externe: appliquer en cataplasme sur la tête pour abaisser la fièvre, ou dans le cas d'insolation (en Tunisie).	Aït Youssef (2006) .
	Tisanes des feuilles	Usage interne : traitement du diabète (au Maroc).	Ghedira <i>et al.</i> (2008); Goetz (2007).
	Décoction	Bain de bouche pour soigner la carie dentaire (en Tunisie); traitement gingivite et autres affections liées à la bouche.	Aït Youssef (2006) ; Djerroumi et Nacef (2004).
	Décoction	Voie externe: les vapeurs produites et l'application du décocté servent à traiter les engelures.	Aït Youssef (2006) .
Usage externe: traitement des brûleurs. Usage interne: antirhumatismal.		Poletti (1982).	
Fruits	Aérosol (fumigation)	Par inhalation: traitement de l'asthme (au Maroc).	Aït Youssef (2006) .
Ecorce		Pour adulterer la poudre de cannelle ; Balsamique.	Aït Youssef (2006) .
Gomme		Usage interne: poudre administrée contre les diarrhées (au Maroc).	Aït Youssef (2006) .
Plante entière		Pour désinfecter l'atmosphère par l'essence volatile ; lutte contre les moustiques (vécteurs de certaines maladies) en Compagnie (Italie), en Sicile en Sardaigne et au lac Fezara en Algérie.	Ghedira <i>et al.</i> (2008).
Bois		Fabrication du papier, poteaux et source d'énergie.	Aït Youssef (2006) ; Batish <i>et al.</i> (2008).

Chapitre II: Métabolisme secondaire

II-1- Définition :

Le terme Métabolite secondaire, qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimiques dans les plantes (Guillaune, 2008).

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (Boudjouref, 2008). Ils sont caractérisés par de faible concentration dans les tissus végétaux (généralement quelque pourcent du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) (Newman et Gragg, 2012). Aussi n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités, fondamentales de la plante (Guignard, 1996).

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique (Buchanan, 2010).

Ces composés différents en fonction des espèces et, bien que leurs rôles soient encore mal connus, il est cependant clair qu'ils interviennent dans les relations qu'entretient la plante avec les organismes vivants qui l'entourent. Ils sont probablement des éléments essentiels de la coévolution des plantes avec les organismes vivants. Ces différentes relations ont donné lieu à une extrême diversification des composés secondaires (Krief, 2003).

II-2- Biosynthèse :

La production des métabolites secondaires est étroitement liée au métabolisme primaire, résultent généralement de trois voies de biosynthèse (Figure 03) : la voie de shikimate, la voie de mévalonate et du pyruvate (Verpoorte et Alfermann, 2000). La plupart des précurseurs sont issus de la glycolyse (pyruvate, phosphoénolpyruvate, acétyl-CoA), de la voie des pentoses phosphate (glycéraldéhyde-3-P, Erythrose-4-P) et du métabolisme des lipides (glycéraldéhyde-3-P et acétyl-CoA). Ces précurseurs sont à l'origine de la diversité structurale observée au niveau des métabolites secondaires (Mayer, 2004).

Du point de vue synthétique, ces métabolites secondaires peuvent aussi être subdivisés en deux catégories : ils peuvent être de type phyto anticipines ou de constitution, C'est-à-dire synthétisés par la plante de manière permanente même en absence d'un facteur de stress par opposition aux métabolites induits ou phytoalexines qui sont synthétisés uniquement en cas de stress et sont donc formés de novo (Litvak et Monson, 1998).

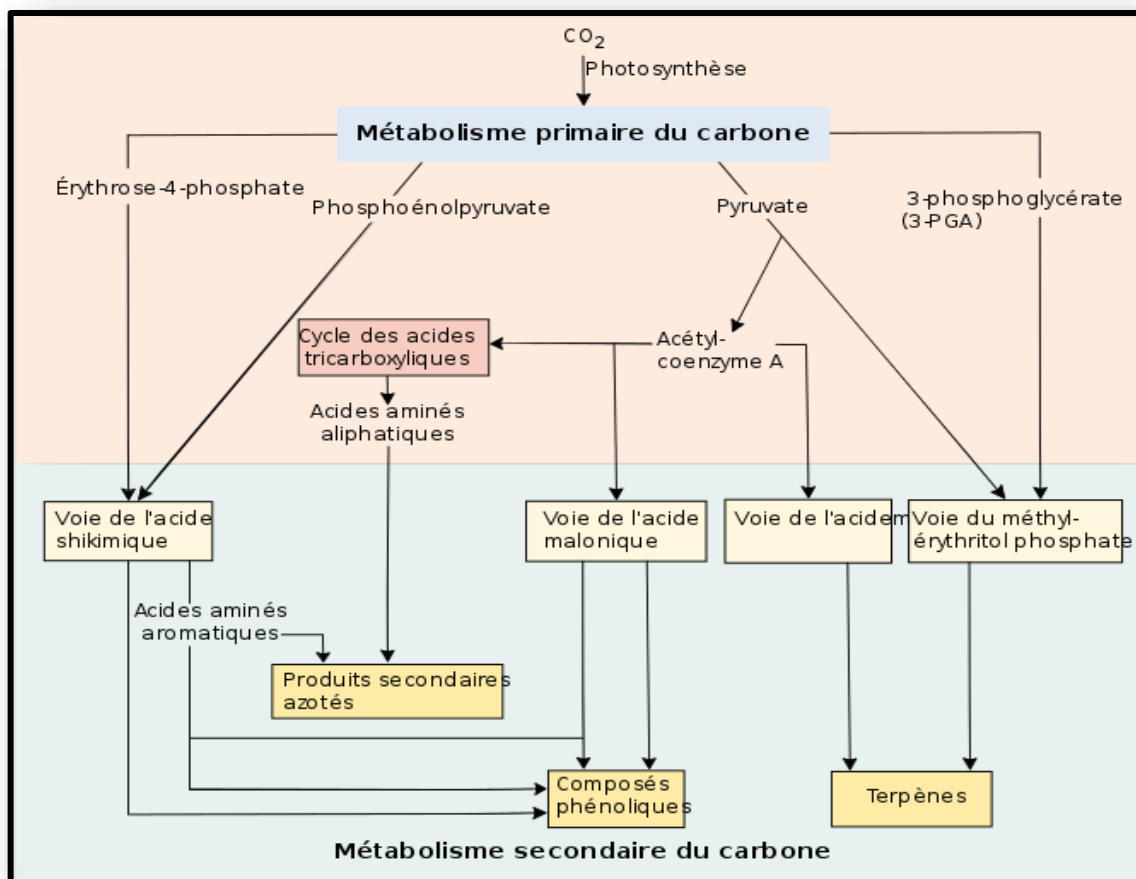


Figure 03 : Voies du métabolisme secondaire des plantes (Taiz et *al.*, 2006).

II-3- Classification :

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine (Krief, 2003, Haven et *al.*, 2000). Ils présentent une énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique) (Peeking et *al.*, 1987).

III-3-1- Polyphénols :

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance, ou la reproduction (Fleuriet, 1982 ; Yusuf, 2006).

Sous la désignation de composés phénoliques, on désigne un vaste ensemble de substances qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupement hydroxyles. (Waksmundzka-Hajnos et Sherma, 2001). Ils sont solubles dans la solution de carbonate de

sodium. Chimiquement, ils sont réactifs et donnent souvent lieu à des liaisons hydrogènes, ou chélater des métaux pour les O-dihydroxyphénols (catéchol); Enfin, ils sont sensibles à l'oxydation (Gorham, 1977).

II-3-1-1- Structure chimique :

La structure chimique des polyphénols est comparable à tous les polyphénols. Ils sont classés en différents groupes en fonction du nombre de noyaux aromatiques qui les composent et des substitutions qui les relient (Manallah, 2012).

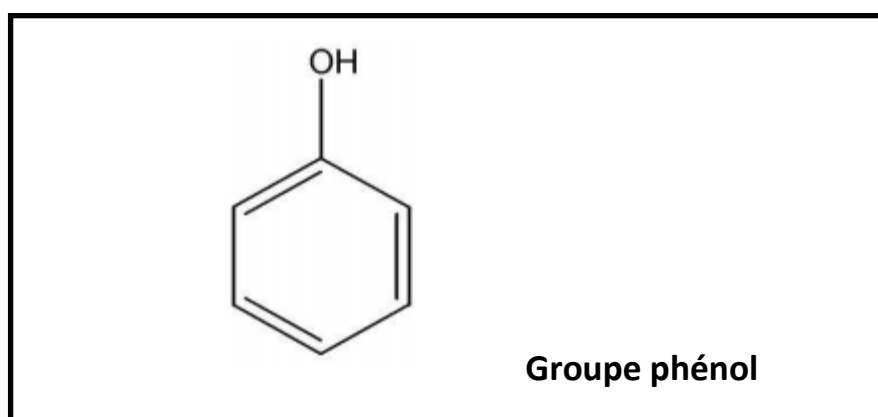


Figure 04 : Le noyau phénols (Herzi, 2013).

II-3-1-2-Biosynthèse des polyphénols :

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales.

a- La voie de l'acide shikimique :

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement. Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (Haslam, 1994 ; Dewick, 1995).

Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique (Yezza et Bouchama, 2014).

b- Voie de l'acétate :

La voie de l'acétate de ces polyphénols à des poly β -coesters (polyacétates) de longueur variable, menant par cyclisation à des composés polycycliques tels que les ihydroxy-1,8 anthraquinones ou les naphtoquinones (Bruneton, 1999 ; Naczk et Shahidi, 2004).

De plus, la diversité structurale des composés polyphénoliques due à cette double origine biosynthétique, est encore accrue par la possibilité d'une participation simultanée des

deux voies (du shikimate et de l'acétate) dans l'élaboration de composés d'origine mixte, comme les flavonoïdes (Martin et Andriantsitohaina, 2002).

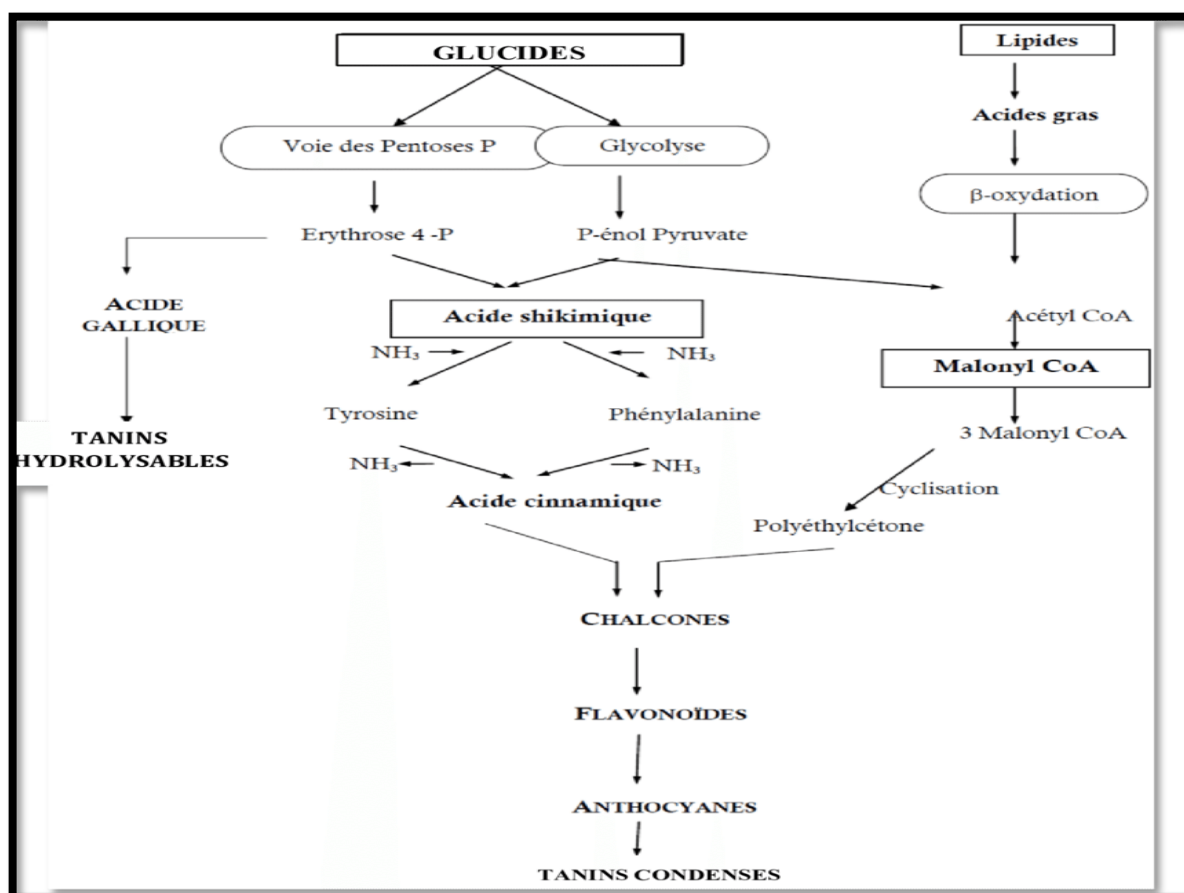


Figure 05 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols
(Chaouche, 2014).

II-3-1-3- Classification :

La classification de ces substances a été proposée par Harborne (1980). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, principales classes sont largement répandues (Macheix et *al.*, 2006).

a- Polyphénols monomériques :

- **Acides phénoliques :**

- Les acides phénoliques, ou acides phénols ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols, Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature (Haslam, 1994). Ils se divisent en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque (les acides hydroxycinnamiques) et les dérivés de l'acide cinnamique (les acides hydroxybenzoïques) (Pandey et Rizvi, 2009).

✓ Acide phénols dérivés d'acide benzoïque :

Sont des hydroxybenzoïques et ont une structure générale de base de type (C6-C1) (figure 06), ces molécules existent souvent sous forme d'esters ou de glycosides (Harrar., 2012). Les plus répandus sont : l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton, 1999).

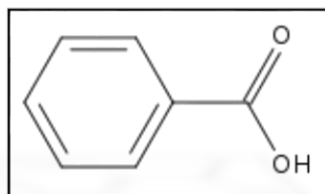


Figure 06 : Acide benzoïque. (Pawlowska et *al.*, 2006).

✓ Acide phénols dérivés d'acide cinnamique :

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique (figure 05) sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide synaptique. (HASLAM, 1994).

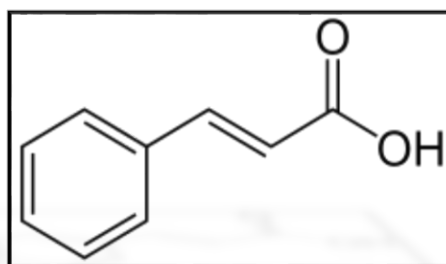


Figure 07 : Acide cinnamique (Gorham, 1977).

• Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde (de flavus, «jaune» en latin) désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Bouakaz, 2006). Ils constituent des pigments responsables des colorations jaune, orange et rouge de différents organes végétaux. (Havasteen, 2002).

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre (aglycone) ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière générale, dans toutes les plantes vasculaires (Erlund, 2004), où ils peuvent être localisés dans divers organe : racine, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits. Et jouent un rôle important dans la protection des plantes. (Bruneton, 1993).

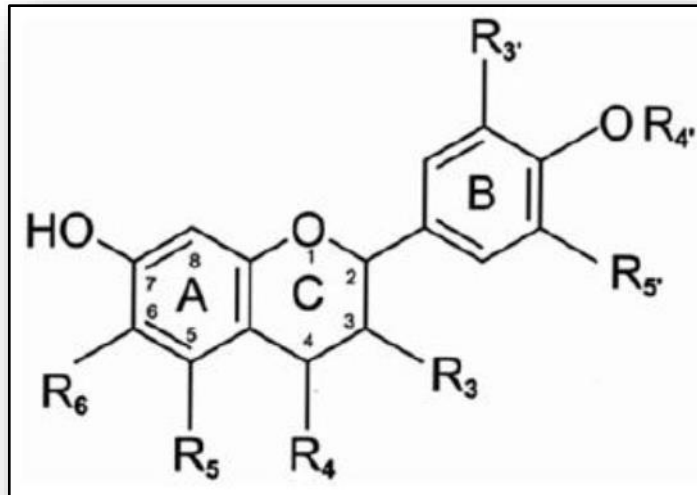


Figure 08 : Structure de base des flavonoïdes (Lovegrove et *al.*, 2017)

b- Polyphénols sous forme de polymères :

- **Tanins :**

Ils représentent un groupe hétérogène assez difficile à définir de façon rigoureuse car il n'y a pas de structure chimique de base. Ils sont des molécules de haut poids moléculaire, fortement hydroxylés et peuvent former des complexes insolubles lorsqu'ils sont associés aux glucides, aux protéines et aux enzymes digestives. Les tanins sont divisés en deux groupes principaux d'après leurs structures et leurs propriétés, les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Chaouche, 2014).

- ✓ **Tanins hydrolysables :**

Les tanins hydrolysés, essentiellement localisés dans les dicotylédones des angiospermes, sont des oligo- ou des polyesters d'un sucre qui est très généralement le glucose et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol qui est soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxy diphénique (HHDP) et ses dérivés d'oxydation dans le cas des tanins éllagiques (Harborne, 1998). Comme leur nom l'indique, ils sont facilement hydrolysables par voie chimique ou enzymatique.

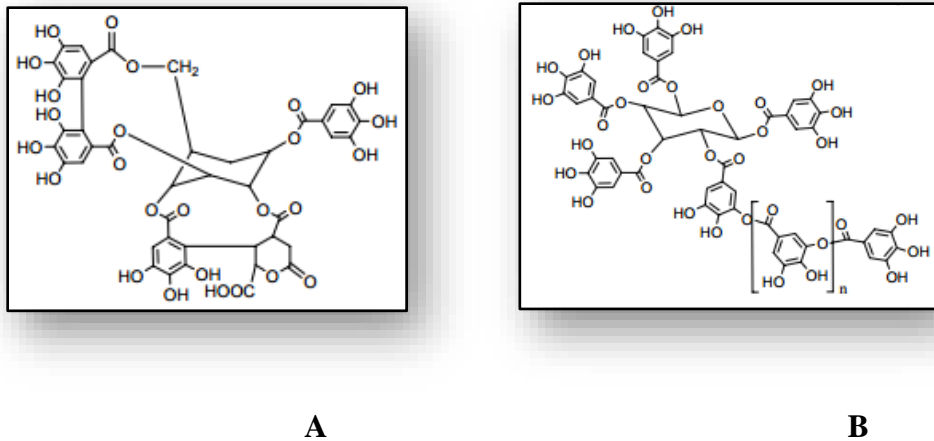


Figure 09 : Structure des tanins hydrolysables A: tanin gallique, B: tanin éllagique (Peronny, 2005).

✓ **Tanins condensés :**

Les tanins condensés ou proanthocyanidine, forment le groupe le plus important. Ils ne possèdent pas de sucre dans leurs molécules et leur structure est voisine de celle des flavonoïdes (Paris *et al.*, 1981).

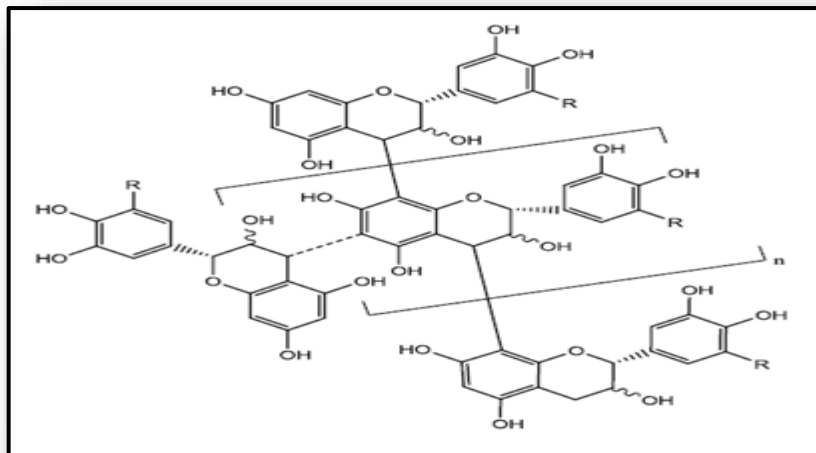


Figure 10 : Structure de base des tanins condensés (Muanda, 2010).

• **Lignines :**

C'est l'un des polymères biosources les plus abondants sur Terre, elle constitue de 15 à 40% de la matière sèche des arbres et de 5 à 20% des tiges des plantes annuelles. C'est également le polymère aromatique naturel le plus abondant (Privas, 2013).

Le rôle des lignines dans l'évolution des végétaux, ils forment une barrière mécanique, de goût désagréable, et réduisant la digestibilité des sucres de la paroi, les lignines participent

à la résistance des plantes aux microorganismes et herbivores, la lignification est une réponse courante à l'infection ou la blessure (Murry *et al.*, 1982).

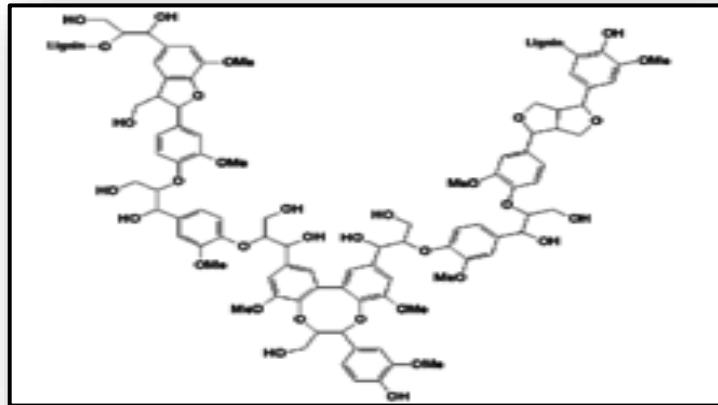


Figure 11 : Structures chimiques de lignine (Scalbert et Williamson, 2000).

c- Coumarines :

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2- hydroxy-7-cinnamiques (Benayache, 2005). Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) sont plus ou moins solubles dans l'eau (Bruneton, 1999). La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto biologiques (Hostettmann, 1992), bactériostatiques et anti fongiques (Rufini et Sampaolo, 1977). Ils ont un effet antioedémateux (Hoult et Paya, 1996).

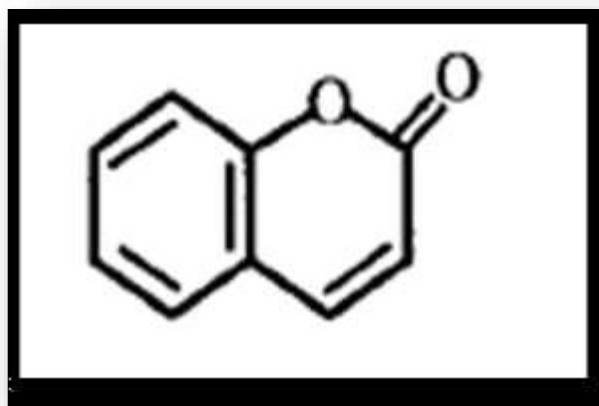


Figure 12 : Structure d'une molécule de coumarine (Cowan, 1999).

d- Stilbènes :

Ce sont les composés ayant comme structure de base le 1,2-diphényléthylène (C₆-C₂-C₆) avec des groupes hydroxyle substitué sur les cycles aromatique, et ils existent sous formes monomères ou d'oligomères. Le composé le plus connu le trans-resvératrol (Abd El Mohsen *et al.*, 2008).

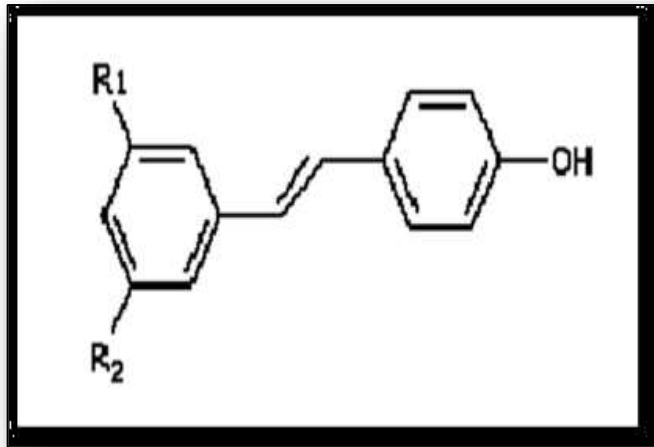


Figure 13 : Structure chimique de stilbène (Perret, 2001).

III-3-2- Les alcaloïdes :

III-3-2-1- Définition

Le terme «alcaloïde» a été introduit par W. Meisner au début du XIX^{ème}. La définition admise des alcaloïdes est celle donnée par Winterstein et Trier en 1910. Un alcaloïde est une substance organique azotée d'origine végétale à caractère alcalin et présentant une structure moléculaire hétérocyclique complexe (Badiaga, 2011).

Généralement, les alcaloïdes sont produits dans les tissus en croissance : jeunes feuilles, jeunes racines. Puis, ils gagnent ensuite des lieux différents et, lors de ces transferts, ils peuvent subir des modifications. Ainsi, la nicotine, produite dans les racines, migre vers les feuilles où elle est diméthylée. Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (Krief, 2003). Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques (Mauro, 2006).

Le plus souvent, la synthèse de ces alcaloïdes s'effectue au niveau de site précis (racine en croissance, cellules spécialisées de laticifères, chloroplastes) ; ils sont ensuite transportés dans leur site de stockage. (Rakotonanahary, 2012).

III-3-2-2- Structure des alcaloïdes :

La plupart des alcaloïdes sont dérivés d'acides aminés tels que le tryptophane, L'ornithine, la lysine, l'aspartate, l'antranilate, la phénylalanine et la tyrosine. Ces acides aminés sont décarboxylés en amines et couplés à d'autres squelettes carbonés (Cyril, 2001).

On divise les alcaloïdes en trois genres :

a- Les alcaloïdes vrais :

Les alcaloïdes vrais représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde. (Badiaga, 2011).

b- Les pseudo-alcaloïdes :

Les pseudo-alcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. (Badiaga, 2011). Dans la majorité des cas connus, ce sont des dérivés d'isoprénoïdes (alcaloïdes terpéniques) et du métabolisme de l'acétate. (Rakotonanahar, 2012).

c- Les proto-alcaloïdes :

Les proto-alcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un hétérocycle, ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acide aminé. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau. (Badiaga, 2011). En pratique, il est admis que ne sont pas des alcaloïdes : les amines simples, les bétalaïnes, les peptides, les acides aminés, les amino-sucres, les porphyrines, les alkylamines et les arylalkylamines. (Rakotonanahar, 2012).

III-3-2-3- Biosynthèse :

Contrairement à la plupart des autres types de métabolites secondaires, les nombreuses classes d'alcaloïdes ont des origines biosynthétiques unique (figure 14) (Ziegler et FacchinI, 2008). Les noyaux de base de ces différents alcaloïdes dérivent des acides aminés du métabolisme primaire (Nacoulma, 2012).

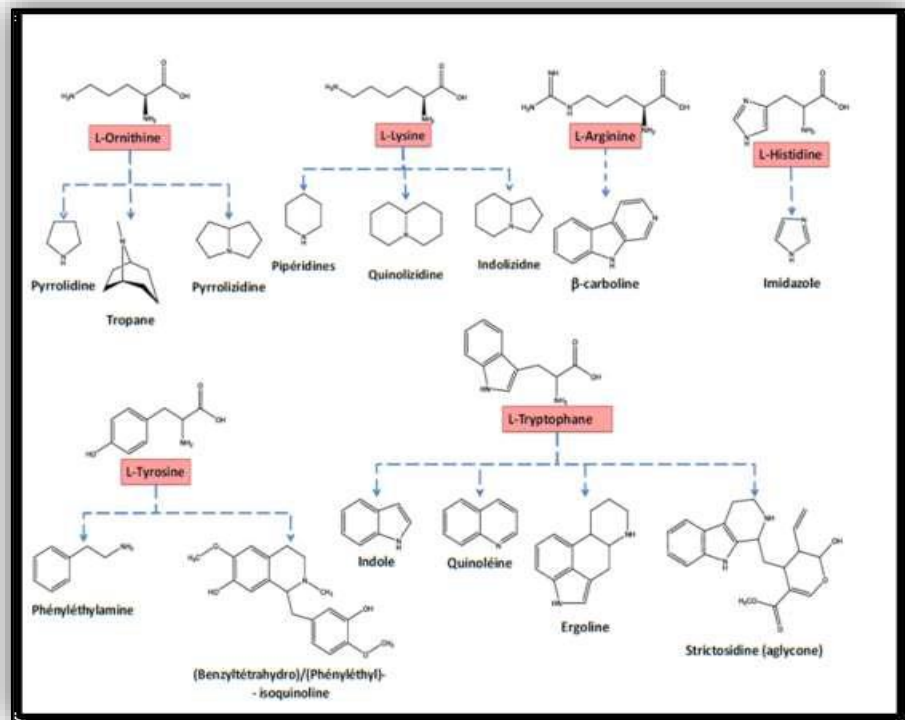


Figure 14 : Origine biosynthétique de différentes classes d'alcaloïdes (Nacoulma, 2012).

III-3-2-4- Classification des alcaloïdes :

a- Selon l'origine biosynthétique :

On distingue trois types d'alcaloïdes :

✓ **Alcaloïdes vrais :** d'après certains auteurs, ils sont issus seul règne végétal. Ils existent à l'état de sels et l'on peut ajouter qu'ils sont bio synthétiquement formés à partir d'un acide aminé (Bruneton, 1999).

✓ **Pseudo-alcaloïdes :** ils représentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés (Bruneton, 1999).

✓ **Proto-alcaloïdes :** ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique ; ils ont une réaction basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés (Bruneton, 1999).

b- Selon leur composition chimique et structure moléculaire :

Les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes.

✓ **Phénylalanines :** capsaïcine chez piment, colchicine chez colchique.

✓ **Alcaloïdes isoquinoléiques :** morphine, éthylmorphine, codéine et

Papavérine continues dans l'opium du pavot ; et des alcaloïdes indoliques : ergométrine, ergotamine et ergotoxine de l'ergot des céréales (Gonzalez et *al.*, 1984).

- ✓ **Alcaloïdes quinoléiques** : se trouvent dans les écorces de Cinchona (Donatien, 2008).
- ✓ **Alcaloïdes pyridiques et pipéridiques**: par exemple: ricinine chez ricin.
- ✓ **Alcaloïdes dérivés du tropane** : comme scopolamine et atropine chez la belladone.
- ✓ **Alcaloïdes stéroïdes** : racine de vératre, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple (Gonzalez et *al.*, 1984).

III-3-2-4- Fonctions et propriétés :

Les alcaloïdes sont des molécules très intéressantes au point de vue biologique car certaines sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments, comme poisons ou encore comme psychotropes (Hess, 2002). Insolubles ou fort peu solubles dans l'eau; ils sont solubles dans l'alcool plus à chaud qu'à froid, l'éther, les acides et dans l'ammoniaque (Cowan, 1999).

III-3-3- Terpénoïdes :

III-3-3-1- Définition

Le terme terpène inventé par Kekulé, vient de leur origine historique de l'arbre de terebinth : « Pistacia Terebinthus » (Ayad, 2008).

Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005). Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux (Benaïssa, 2011).

L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation (Malecky, 2005).

III-3-3-2- Structure :

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte : leur formule brute est $(C_5H_X)_n$ dont le x est variable en fonction du degré d'insaturation de la molécule et n peut prendre des valeurs (1-8) sauf dans les polyterpènes qui peut atteindre plus de 100 (le caoutchouc). La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 .

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (Malecky, 2005 ; Benaïssa, 2011).

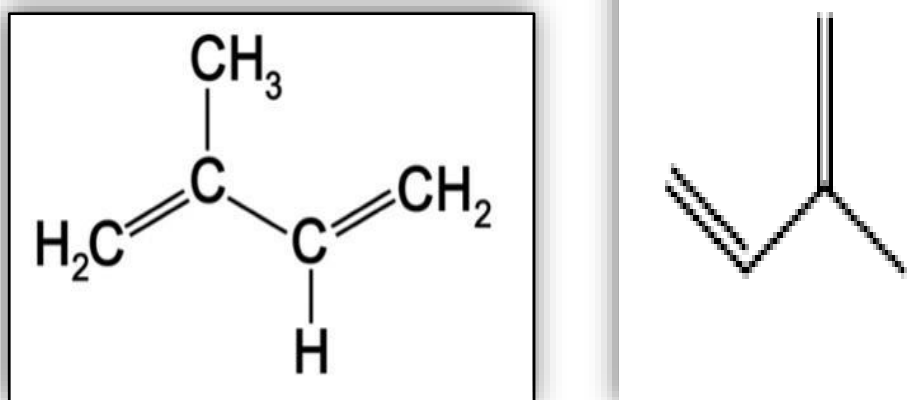


Figure 15 : Structure de base de l'isoprène (Khenaka, 2011).

III-3-3-3-Biosynthèse :

La biosynthèse des terpènes se déclenche par activation par l'hydrolyse de l'ATP de l'isoprène. L'acide mévalonique (MVA) est la clé de la biosynthèse des terpenoïdes. La condensation de 3 molécules d'acétyl-CoA forme le β -hydroxy β -méthylglutaryl-CoA, ensuite la réduction de ce dernier donne MVA qui est par la suite activé par un enzyme spécifique. Le MVA est converti en isopentenyl pyrophosphate (IPP) ou isoprène actif. C'est le IPP qui constitue l'unité isoprénique d'enchaînement, et il s'isomérisé en diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP). La condensation d'une molécule (DMAPP) avec une molécule (IPP), conduit au (GPP) précurseur des monoterpènes en C-10. Le couplage de ce dernier avec une nouvelle molécule (IPP), conduit au (FPP) précurseur des sesquiterpènes en C-15 qui peut agir avec une autre molécule de (IPP) pour former le (GGP) précurseur des diterpènes en C-20. D'autre part, le couplage réductif de deux unités (FPP) donne le squalène en C30, précurseur des triterpènes cycliques et stéroïdes (Ayad, 2008).

III-3-3-4- Classification :

Selon le nombre d'unités isopréniques qui les constituent, on distingue : les terpènes ou monoterpènes en C10, les sesquiterpènes en C15, les diterpènes en C20, les triterpènes C30, et les tétraterpènes C40 (Guignard, 1996).

Tableau 3 : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes (Belbache, 2003)

N	Squelette carboné	Type de terpenoïdes	Exemple de molécule
2	C10	Monoterpène	Nérol, citronnelle, huiles essentielles
3	C15	Sesquiterpène	β -Cadinène
4	C20	Diterpène	Sclaréol, phytol
6	C30	Triterpène	Lanostérol
8	C40	Tetraterpène	Caroténoïdes
> 8	>40	Polyterpène	Caoutchouc

a- Monoterpènes :

Sont volatils entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles, parfois plus de 90% ; ils peuvent être acycliques (Mycènes, ocymène), monocycliques (terpinène, p-cimène) ou bicycliques (pinène, sabinène) (Bruneton, 1999).

Ils existent sous la forme d'hydrocarbures simples (limonène, Mycènes ...), d'aldéhydes (linalal, géranial...), d'alcools (linalol, geraniol...) et d'acides (acide linalique géranique ...) voire d'esters (acétate de linalyle ...), ce sont des composés aromatiques qui constituent les essences florales, les huiles essentielles et les résines (Singh et *al.*, 1989).

b- Sesquiterpènes :

Les sesquiterpènes sont des molécules à 15 atomes de carbone constituées de trois unités isopréniques et dérivant du Farnésyl diphosphate (FPP) (Wink, 2003); il s'agit de la classe la plus diversifiée des terpènes, elle contient plus de 3000 molécules comme par exemple: β -caryophyllène, β -bisabolène, α -humulène, α -bisabolol, farnesol.

c- Diterpènes :

Les diterpènes sont formés de quatre unités isoprènes (C₂₀H₃₂) (Hernandezchoa, 2005), ils comprennent les gibbérellines (phytohormones du développement impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux tels que la germination (Graebe, 1987).

d- Triterpénoïdes et stéroïdes :

Les triterpènes sont des composés en C₃₀ issus de la cyclisation de l'époxysqualène ou du scalène (Krief., 2003). Les stéroïdes sont dérivés de triterpènes tétracycliques et possèdent un squelette cyclopentaperhydro phénanthrène. Beaucoup de stérols se produisent sous forme de glycosides caractérisés par les saponines stéroïdiens (Hanson, 2003).

e- Tétraterpènes :

Comme les caroténoïdes qui sont des pigments rouges ou jaunes (Hanson, 2003), possédant un chromophore caractéristique (au moins 10 doubles liaisons conjuguées) expliquant leur couleur jaune-orangée et leur sensibilité à l'oxydation. Pour cela, les caroténoïdes sont employés en industrie agro-alimentaire principalement pour leur pouvoir colorant (safran : *Crocus sativus* L.) mais on peut aussi noter qu'ils sont préconisés en cas de photo dermatose puisqu'ils interfèrent avec les processus de photo-oxydation (Krief, 2003).

f- Polyterpènes :

En général, les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène (plus de C₄₀). Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomériques cis- et trans, Le cis-polyisoprène se trouve dans le caoutchouc indien (Malecky, 2005)

Charles Marie a créé le mot français caoutchouc à partir de l'expression indienne «caotchu», qui signifie « bois qui pleure » qui est un produit naturel qui s'écoule de l'écorce d'un arbre. Il se présente sous la forme d'un liquide d'apparence laiteuse, appelé latex (PIRE, 2011). Le caoutchouc naturel extrait de *Hévéa Brasiliensis* est un haut polymère de l'isoprène de poids moléculaire de 140.000 à 210.000. Donc les polyterpènes sont des macromolécules de poids moléculaire très élevé, dont le motif de base est l'isoprène. Sur le plan thérapeutique, ces composés n'ont pas des activités biologiques discutées (Ayad, 2008).

III-3-3-5- Fonctions et propriétés :

Les terpènes ont une large utilisation dans le domaine thérapeutique comme antiviraux et antimicrobienne de plus, ils sont utilisés dans le domaine industriel des épices et des parfums (Beaulieu et Baldwin, 2002 ; Kabera, et *al.*, 2014).

Partie 2

Matériels et Méthodes

I- Matériel végétal :

On a récolté les feuilles d'*Eucalyptus globulus* de la région de Sidi Mabrouk dans la Wilaya de Constantine à l'Est Algérien, au mois de Décembre 2018. Le séchage de cette plante a été effectué dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires pendant 20 jours (figure 16).

On a broyé les feuilles à l'aide d'un broyeur électrique spécial (figure 17). La poudre des feuilles a été conservée à température ambiante jusqu'à leur utilisation.



Figure 16 : Séchage des feuilles.



Figure 17 : Broyage des feuilles.

II- Etude phytochimique :

II-1- Extraction des polyphénols :

Cette étape du travail a été réalisée au niveau du laboratoire Qualité-Analyse du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt).

L'extraction est la séparation des parties actives de tissus végétaux ou animaux des composants inactifs ou inertes à l'aide de solvants sélectifs, traditionnellement l'eau, les huiles végétales ou les graisses animales. Les produits ainsi obtenus sont relativement impurs sous forme de liquides, semi-solides ou poudres exclusivement destinées à un usage oral ou externe. Il s'agit de préparations connues comme les tisanes et les huiles médicinales (Handa, 2008).

Dans notre étude, l'extraction est effectuée par l'utilisation des solvants organiques à polarité différente : Méthanol, Butanol, chloroforme et acétate d'éthyle, deux méthodes

d'extraction ont été requises pour l'extraction des principes actifs à partir de la plante *Eucalyptus globulus*

II-1-1- Extraction assistée par macération (EAM) :

a- Principe :

La macération est la méthode d'extraction solide-liquide la plus simple. Elle consiste en la mise en contact du matériel végétal avec le solvant sans ou avec agitation, (Leybros et Fremeaux, 1990).

b- Mode opératoire :

- **Préparation de l'extrait méthanolique brut :**

La macération consiste à émerger 200g de poudre de feuilles d'*Eucalyptus globulus* dans 700ml de méthanol ajusté avec 300 ml d'eau (70 /30 dans 1000 ml) pendant 24 heure à température ambiante (on a fait deux macération successif). Ensuite la filtration est réalisée sur tulle.

Le solvant a été récupéré du filtrat par évaporation dans un Rotavapeur type Buchi R.200, à une température de 39°C. L'extrait obtenu a été conservé au 4°C jusqu'à l'utilisation.



Figure 18 : Agitation de la poudre émergée dans le méthanol.

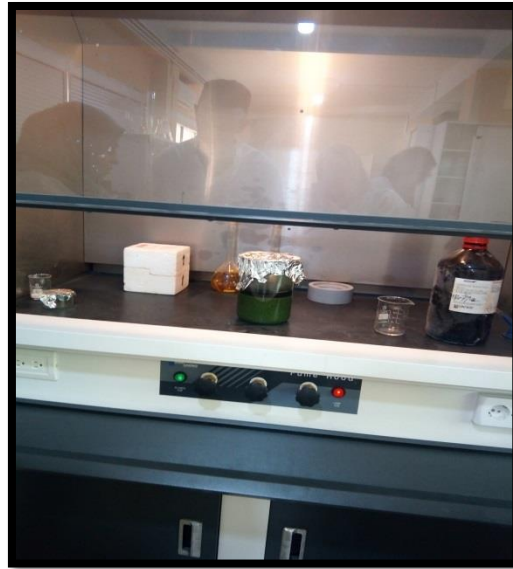


Figure 19 : Macération.

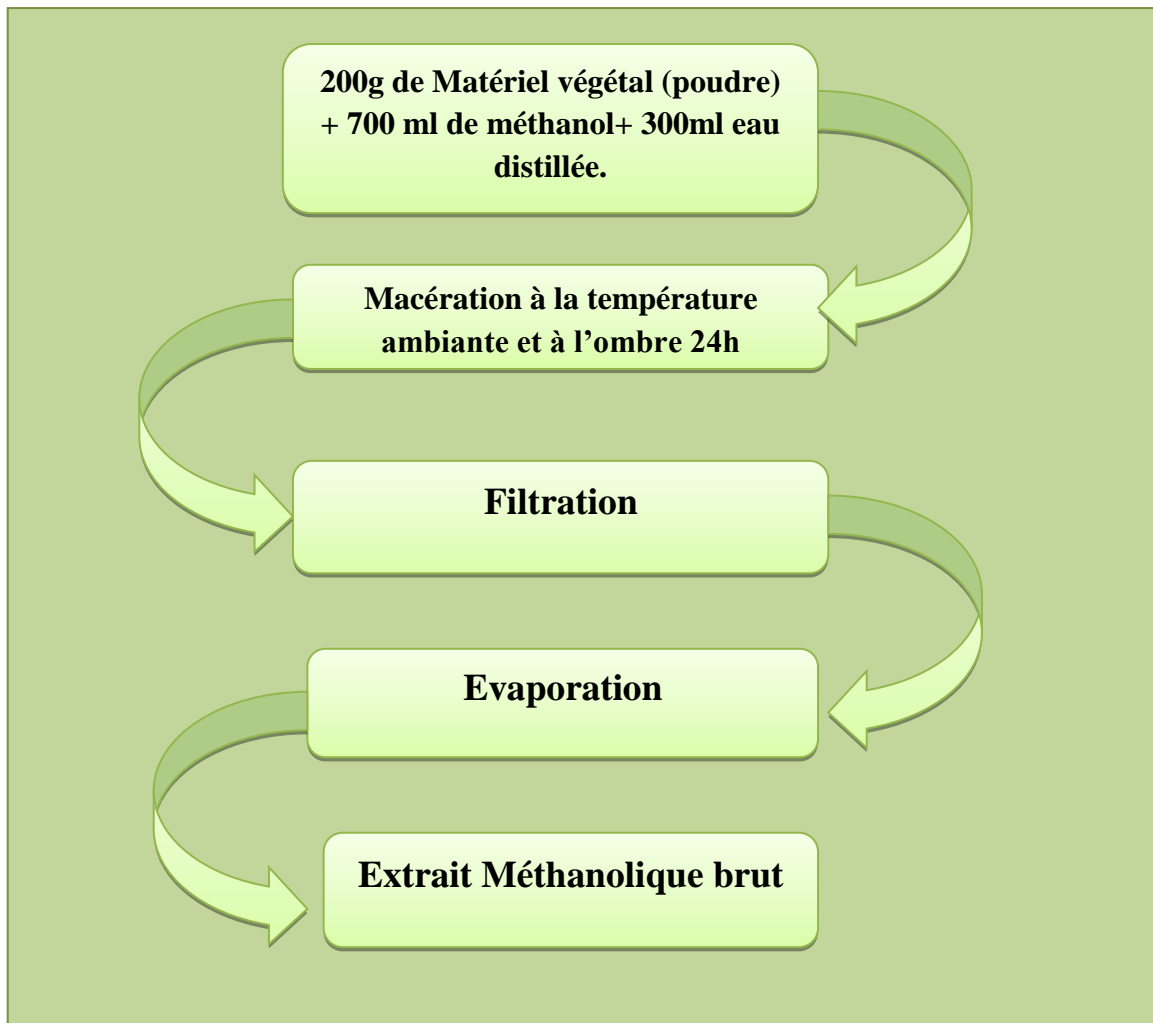


Figure 20 : Protocole de préparation de l'extrait méthanolique par macération.

II-1-2- Fractionnement de l'extrait brut par Extraction Liquide-Liquide (ELL):

Plusieurs solvants ont été utilisé pour l'affrontement : le rapport extrait/ solvant utilisé est 1 / 1 (V/ V), chaque phase est laissée pendant 24h et l'opération est répétée plusieurs fois pour chaque phase.

Chaque phase est séchée en chassant le solvant par l'utilisation de l'évaporateur rotatif.



Figure 21 : L'évaporateur rotatif.

○ **Extrait chloroformique :**

Après la dissolution de l'extrait méthanolique dans 150 ml d'eau distillé (laisser pendant quelques heures), 150 ml de phase aqueuses sont déversés dans une ampoule à décanter à laquelle on rajoute 150 ml de chloroforme. Après une agitation et un repos de quelques heures pendant chaque répétition (on a fait cinq répétions et à chaque fois on ajoute 100 ml de chloroforme récupéré) on observe deux phases :

-La phase aqueuse se retrouve en haut de l'ampoule.

-La phase chloroformique en bas, celle-ci est récupérée dans un bécher, alors que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter pour être affrontée au solvant suivant.

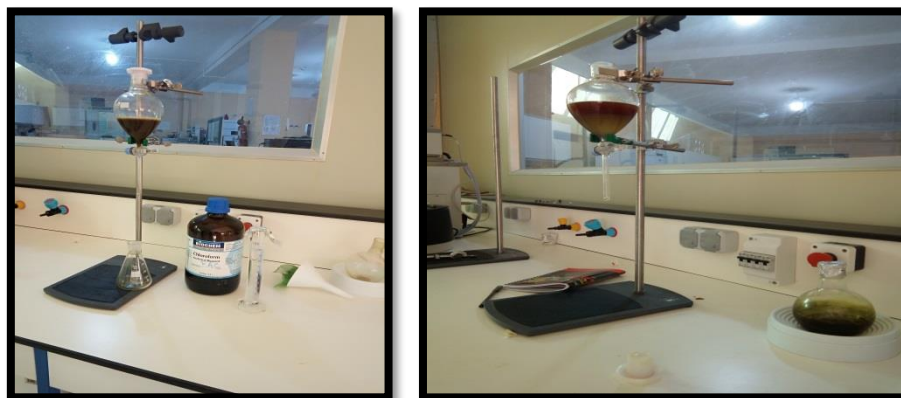


Figure 22 : Affrontement avec le chloroforme.

○ **Extrait d'Acétate d'éthyle :**

On ajoute 100 ml d'Acétate d'éthyle à la phase aqueuse. Après une agitation et un repos pour chaque répétition (on a fait quatre répétitions) on observe deux phases :

- La phase aqueuse se retrouve en bas de l'ampoule.
- La phase d'acétate d'éthyle en haut, celle-ci récupéré dans un bécher.

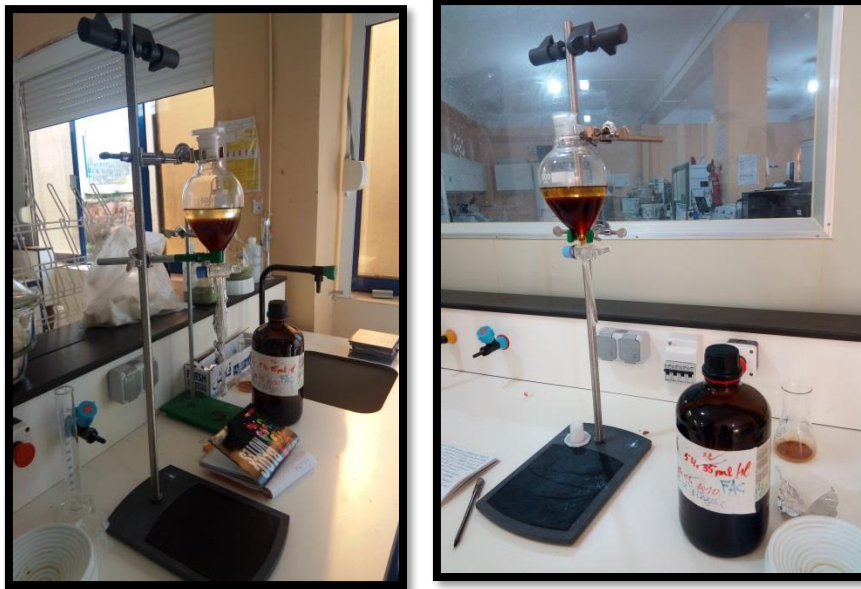


Figure 23 : Affrontement avec l'acétate d'éthyle.

○ **Extrait butanolique :**

La phase aqueuse obtenue après affrontement avec l'acétate d'éthyle est remise dans l'ampoule à décanter pour subir les mêmes opérations que précédemment mais avec le butanol (100 ml pour les huit répétitions avec un repos).

- La phase aqueuse se retrouve en bas de l'ampoule.
- La phase butanolique en haut, celle-ci récupéré dans un bécher.

Les différents phases (chloroformique, acétate d'éthyle et butanolique) sont évaporées à sec grâce au Rotavap et conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.



Figure 24: Affrontement avec le butanol.

• **Préparation des dilutions :**

- **Préparation des échantillons :**

Les concentrations préparées sont utilisées pour toute l'analyse phytochimique.

La concentration des solutions mères de chaque échantillon est exprimée en ppm. La partie par million (la ppm) est la fraction valant 10^{-6} , c'est-à-dire un millionième.

Une quantité de 4 mg ou 1 mg de l'extrait méthanolique a été dissoute dans 1 ml du méthanol (solution mère de 4000 ppm, ou 1000 ppm) respectivement avec 7 concentrations différents (une série de dilution de $\frac{1}{2}$ de l'échantillon en ordre décroissant comme suit :

4mg/ml	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration µg/ml	800	400	200	100	50	25	12.5
1mg/ml	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
Concentration µg /ml	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125

II-2- Dosage des composés phénoliques :

Cette étape du travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie du Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt).

Des méthodes colorimétriques basées sur l'utilisation du spectrophotomètre UV-visible, ont été utilisées pour évaluer la quantité des composés phénoliques dans la matière végétale.

II-2-1- Dosage des polyphénols :

a- Principe :

Le réactif utilisé est le réactif de Folin-Ciocalteu, c'est un mélange de complexe des acides phosphotungstène ($H_3PW_{12}O_{40}$) et phosphomolybdène ($H_3PMo_{12}O_{40}$) de couleur jaune.

Le principe de la méthode est basé sur l'oxydation des composés phénoliques par ce réactif, elle entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 760 nm, le dosage de polyphénols est effectué par la comparaison de la D.O observé à celle obtenus par un étalon d'acide gallique de concentration connue Muller et al. (2010).

b- Procédure :

20 μ l d'extrait diluée à 1mg/ml dans le MeOH est ajoutée à 100 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu 0.1N. on additionne 75 μ l d'une solution de Na_2CO_3 à 7.5%. Le mélange est laissé au repos pendant 2h à l'obscurité. La lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'ondes de 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé (Méthanol). Une droite d'étalonnage de 0 à 0.6 mg/ml est réalisé avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

II-2-2- Dosage des Flavonoïdes

a- Principe :

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes. La méthode de (Topçu et al., 2007) est utilisée avec quelques modifications pour une détermination sur microplaque 96 puits.

b- Procédure :

On met 50 μ l d'extrait (préparé dans le méthanol) et on ajoute 130 μ l Méthanol (MeOH) puis 10 μ l Potassium acétate (CH_3COOK) et 10 μ l nitrate d'aluminium $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, l'ensemble est incubé à l'ombre à la température ambiante pendant 40 minutes, l'absorbance est lue à 415 nm. La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard: Quercétine. Un blanc est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 μ l extrait + 150 μ l méthanol).

II-3- Activités antioxydantes :

Cette étape du travail a été réalisée au niveau du laboratoire Qualité-Analyse Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt).

Des tests mesurant l'effet antioxydant combiné des défenses non enzymatiques dans les fluides biologiques peuvent être utiles pour fournir un indice de la capacité de l'organisme à

lutter contre les espèces réactives connues sous le nom de pro oxydants, à résister aux dommages oxydatifs et à lutter contre les maladies liées au stress oxydatif.

II-3-1- Le test DPPH :

a- Principe :

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH) (Brand-William *et al.*, 1995).

L'activité anti-radicalaire libre est déterminée par spectrophotométrie par le dosage du DPPH(Blois1958), le α -tocophérol, BHT et le BHA sont utilisés comme standards antioxydants.

b- Mode opératoire :

•Préparation de la DPPH :

Dissoudre 6 mg de DPPH dans un volume de 100 ml de méthanol, le radical DPPH est dissous dans le méthanol et gardé à -20°C à l'abri de la lumière. L'absorbance est 0.5 nm (517 nm) dans le spectrophotomètre.

•Procédure:

Après la préparation du DPPH, on prend notre microplaque et on ajoute 160 μ l (DPPH) mélangé avec 40 μ l de chaque extrait (préparée dans le méthanol) à différentes concentrations. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, l'absorbance est lue à 517 nm contre un témoin négatif (sans extrait). Le pourcentage de l'activité anti-radicalaire est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité anti radicalaire (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac: Absorbance du contrôle.

At: Absorbance d'extrait ou standard.

II-3-2- ABTS scavenging activity :

a- Principe :

Le radical ABTS préformé est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec le persulfate de potassium (Re *et al.*, 1999).cette formation se traduit par l'apparition d'une coloration vert bleu intense. En présence d'un donneur d'hydrogène (agent antioxydant), le passage du radical ABTS à la forme non radicalaire s'accompagne de la disparition de cette coloration mesurée à une longueur onde de 734 nm.

b- Procédure :

Le radical ABTS⁺ est produit par réaction entre une solution aqueuse d'ABTS (7 mM) et une solution de potassium (K₂S₂O₈, 2,45 mM), utilisé comme oxydant.

Ce mélange est agité pendant 16h à l'obscurité puis dilué par l'éthanol jusqu'à obtenir une absorbance à 734 nm de 0,700 ± 0,02. Une prise (160 µl) de cette solution d'ABTS⁺ est ensuite mélangée avec 40 µl d'extrait à différentes concentrations. Après 10 mn d'incubation à température ambiante, l'absorbance du mélange est mesurée à 734 nm contre un blanc (témoin négatif) et comparé à celle des antioxydants de synthèse : BHT, BHA et TROLO (acid6-hydroxy-2,5,7,8-tetraméthyl-chroman-2- carboxylique). Les résultats permettent de calculer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer cette activité anti radicalaire en comme décrit précédemment pour le DPPH (Re et *al.*, 1999).

L'activité ABTS⁺ a été exprimée en pourcentage et calculée par l'équation suivante :

$$\text{ABTS}^+ \text{ scavenging effect (\%)} = (\text{A}_{\text{Control}} - \text{A}_{\text{Sample}} / \text{A}_{\text{Control}}) * 100$$

II-3-3- Reducing power test (Pouvoir réducteur) :

a- Principe :

L'activité réductrice d'un extrait est évaluée par la réaction d'oxydo-réduction entre l'extrait et les ions métalliques de transition, notamment le fer. Le pouvoir réducteur est déterminé selon la méthode décrite par (Oyaizu, 1986).

b- Procédure :

Cette méthode consiste à mélanger 10 µl de l'extrait à différentes concentrations avec 40 µl de tampon phosphate 0.2 M à pH 6.6 et 50 µl d'une solution de K₃Fe(CN)₆ à 1% (m/v). Le mélange obtenu est incubé pendant 20 minutes à 50°C, puis 50 µl d'acide trichloracétique (CCl₃COOH) à 10% sont ajoutés pour arrêter la réaction. On additionne 40 µl d'eau distillée et 10 µl de chlorure de fer (FeCl₃) à 0.1%. La lecture de l'absorbance se fait à 700 nm contre un blanc ou l'extrait est remplacé par le méthanol. Les résultats permettent de calculer la concentration efficace (CE50), concentration de l'extrait correspondant à une absorbance égale à 0.5, obtenu par la courbe de régression linéaire ou logarithmique. L'activité de l'extrait est enfin comparée à celle des antioxydants de synthèse (témoin positif), butylhydroxytoluène (BHT) et le butylhydroxyanisole (BHA).

II-3-4- Galvinoxyl radical (GOR) scavenging assay:

a- Principe :

Galvinoxyl, un radical phénoxy stable peut être réduit par des capteurs de radicaux libres donneurs d'hydrogène. La concentration d'extrait et d'étalon nécessaire pour atteindre une activité de piégeage des radicaux phénoxyes à 50% ont été déterminées selon la méthode de Shi, Noguchi et Niki (2001). La capacité de piéger les radicaux libres a été testée avec un test très simple, mélangeant une coumarine à un radical et suivant la réaction par spectroscopie RPE (Shi *et al.*, 2001).

b- Procédure:

Cette méthode consiste à mélanger 40 µl d'extrait à différentes concentrations avec 160 µl (0,1 mM Galvinoxyl) (4 mg dans 100 ml MeOH). Le mélange obtenu est incubé pendant 120 mn. La lecture de l'absorbance se fait à 428 nm contre un blanc.

II-3-5- Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC):

a- Principe :

Notre méthode spectrophotométrique récemment mise au point (CUPRAC) pour plusieurs polyphénols et flavonoïdes utilisant le réactif cuivre (II) -neocuproïne dans un tampon d'acétate d'ammonium a été appliquée à une série complète d'antioxydants plasmatiques permettant de mesurer la capacité antioxydante totale (TAC) du sérum et l'absorbance résultante à 450 nm a été enregistrée soit directement (par exemple pour l'acide ascorbique, l'alpha-tocophérol et le glutathion), soit après une incubation à 50 degrés C pendant 20 min (par exemple pour l'acide urique, la bilirubine et l'albumine), quantification se faisant au moyen d'une courbe d'étalonnage. Les antioxydants lipophiles, l'alpha-tocophérol et le bêta-carotène, ont été dosés dans du dichlorométhane (DCM). Les antioxydants lipophiles du sérum ont été extraits avec du n-hexane à partir d'une solution éthanolique de sérum soumise à une centrifugation. (Resat, 2008).

b- Procédure :

On prépare la solution 1 (1,927 g Acétate d'ammonium (ACNH₄) mélanger avec 25 ml H₂O, S1 est transparente, PH=7.0), puis on l'ajouter au plat qui contient les extraits pour la lecture. On additionne la solution S2 (0,042625 g de Cu Cl₂, 2H₂O mélangé avec 25 ml H₂O) avec la S3 (0,039 g de Neocupronin mélanger avec 25 ml de méthanol). La solution obtenue est déposée pour la lecture.

Cette méthode consiste à prendre 40 µl d'extrait avec 60 µl de S1, 50 µl de S3 et 50 µl de S2. Attendre 1 heure puis la lecture de l'absorbance se fait à 450nm contre un blanc.

II-4- Activités anti enzymatiques :

Cette étape du travail a été réalisée au niveau du laboratoire Qualité-Analyse Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBt).

II-4-1- Activité Anti- cholinestérase :

a- Principe :

La révélation de l'activité enzymatique est réalisée avec la méthode d'Ellman (1961), qui utilise un substrat artificiel, l'acétylthiocholine, dont l'hydrolyse conduit à la formation de Thiocholine. Cette dernière forme un dérivé coloré avec le DTNB (5,5'- dithiobis-[2 nitrobenzoate]).

L'inhibition de l'acétylcholinestérase par les extraits a été étudiée à l'aide du dosage sur microplaque.

b- Préparation des solutions et des enzymes :

•Solution tampon:

On mélange 8,890 g de (Na₂HPO₄, 2H₂O) avec 500 ml de H₂O (V1), pour la deuxième étape on ajoute 1,56 g de (NaH₂PO₄, 2H₂O) avec 100 ml de H₂O (V2), et la dernière étape c'est le mélange de la solution V1 et V2 : Solution Tampon comme montrer dans le tableau 4.

On ajoute du NaOH pour augmenter la valeur du PH.

Tableau 4 : Préparation de la solution tampon.

PH	5,8	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8
NaH ₂ PO ₄ (ml)	92	81,5	73,5	62,5	51	39	28	19	13	8,5	5,3
Na ₂ HPO ₄ (ml)	8	18,5	26,5	37,5	49	61	72	81	87	91,5	94,5

•DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitro-benzoic acid)) Solution:

16 mg DTNB avec 1 ml (PH=7), puis 7,5mg NaHCO₃ avec 1 ml (PH=7) et 2 ml (PH=7), on ajoute 4 ml (PH=8): volume total 8 ml.

•ACI (Acétylthiocholine iodide) substrat Solution:

16 mg ACI avec 4 ml H₂O et on additionne 4 ml Tampon (PH =8)

•Préparation des enzymes:

- AChE Solution:

0,2 mg de AChE avec 4 ml (PH=8) pour donner la solution A, on met 20 µl de la solution A dans 20 eppendorff et on prend un seul eppendorff qui contient 20 µl de la solution

A et on ajoute 3 ml de PH = 8, puis le contrôle de l'absorbance à 412 nm qui doit être entre 0.4-0.5

c- Procédure:

En bref, 150 µL de 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0) sont ajoutés à 10 µL d'extrait, solution dissous dans le méthanol à différentes concentrations. On additionne 20 µL de la solution d'AChE (5.32×10^{-3} U). L'ensemble est incubé à 25°C pendant 15 mn ensuite on ajoute 10 µL de DTNB (0.5 mM) et 10 µL de l'acétylthiocholine iodide (0.71 mM). La lecture de l'absorbance se fait à 412 nm (pour 0 mn, 5 mn, 10 mn et 15 mn).

Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme d'AChE est déterminé par rapport au blanc (méthanol avec le phosphate buffer pH 8) par la formule $(E - S)/E * 100$.

E : l'activité de l'enzyme sans extrait / S : l'activité de l'enzyme avec l'extrait

Le Galanthamine est utilisé comme référence.

II-4-2- Activité anti-tyrosinase :

L'activité tyrosinase est déterminée selon la méthode décrite par (Ebru Deveci et al., 2018). Cette méthode consiste à mélanger 150 µl (PH 6.8) avec 10 µl de notre extrait, puis 20 µl d'Enzyme, l'ensemble est incubé durant 10 mn à 37 ° C, après on ajoute 20 µl de L-DOPA et on finit par une incubation durant 10 mn à 37 ° C. La lecture de l'absorbance se fait à 475 nm.

III-Etude biologique :

Elle a été réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie du CRBT (Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine)

III-1- Activité antibactérienne :

III-1-1- Les souches bactériennes testées :

Deux souches de référence ont servi à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits et ont été procurées par le laboratoire de bactériologie et virologie du CRBT. Ces bactéries ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène pour l'Homme.

a- Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus*

b- Bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli*

III-1-2-Standardisation des inocula bactériens :

En plus de la pureté des souches bactériennes, la taille de l'inoculum est l'un des facteurs aussi susceptibles de modifier l'activité antibactérienne in vitro. En effet, un inoculum trop dense peut masquer l'effet antibactérien, et conduire à des faux résultats et un

inoculum trop faible peut être à l'origine des résultats faux positifs (Meyer et al., 1999). Afin d'obtenir un tapis homogène avec des colonies non confluentes, un inoculum de charge 10^6 UFC/ml a été préparé.

La standardisation de l'inoculum bactérien a été réalisée comme suit:

-La préparation d'une suspension bactérienne à partir d'une culture jeune (18 à 24 heures) préparée dans de l'eau physiologique (8,5% de Na Cl).

-La Préparation d'une série de dilutions décimales (10^{-1} jusqu'à 10^{-8}) à partir d'une suspension bactérienne initialement préparée (densité optique de 0,5 à une longueur d'onde de 600 nm).

-L'ensemencement en surface de 0,1 ml de chaque dilution à l'aide d'un râteau étaleur sur la PCA (Plate Count Agar).

- Le dénombrement, après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures.

III-1-3- Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits :

a- Principe :

L'activité antibactérienne des extraits est évaluée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé « méthode de l'antibiogramme ». Une suspension est inoculée sur une gélose de 4mm d'épaisseur par inondation ou écouvillonnage. Puis des disques de papier buvard ou de comprimés imprégnés de quantités connues d'antibiotiques sont déposés sur la surface de la gélose. Au cours de l'incubation, il ya une compétition entre la croissance bactérienne et la diffusion radiale de l'antibiotique qui crée un gradient de concentrations décroissantes. Après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C, la culture délimite des zones stériles circulaires autour des disques, dont la taille est proportionnelle à la sensibilité du germe (Chevalier et al., 2003; Meyer et al., 1999).

b- Procédure :

Le protocole suivi dans la présente étude, pour réaliser cet antibiogramme, est rapporté par plusieurs auteurs (Arias et al., 2004), (Chevalier et al., 2003), (Kablan et al., 2008), (Ksouri et al., 2009) et (Meyer et al., 1999) où les disques d'antibiotique (principe actif) sont remplacés par des disques imprégnés avec les différents extraits.

A partir d'une culture jeune de 18 à 24 heures, des colonies isolées sont prélevées puis mises dans 9 ml d'eau physiologique, après homogénéisation de la suspension bactérienne, l'absorbance de la suspension est ajustée à une absorbance de 0,50 à 600 nm; Des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre coulées avec le milieu gélosé Mueller Hinton de 4 mm d'épaisseur, sont ensemencées avec un volume de 1 ml d'une suspension bactérienne de 10^6 UFC/ml (l'excès d'inoculum est éliminé à l'aide d'une pipette); Des disques de papier stériles

(6mm de diamètre) sont déposés dans des boîtes de Pétri stériles (vides) puis imprégnés avec un volume de 20 μ l des différents extraits de plante (préparés dans du méthanol) à une concentration de (100 mg/ml). Le témoin négatif est préparé avec du méthanol. Les disques séchés sont déposés à équidistance de la surface de la gélose. Une légère pression est exercée sur les disques pour assurer une meilleure adhérence ; Les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 heures afin que les substances actives puissent diffuser avant de permettre aux germes de se multiplier. Les boîtes sont incubées par la suite à 37°C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'une règle.

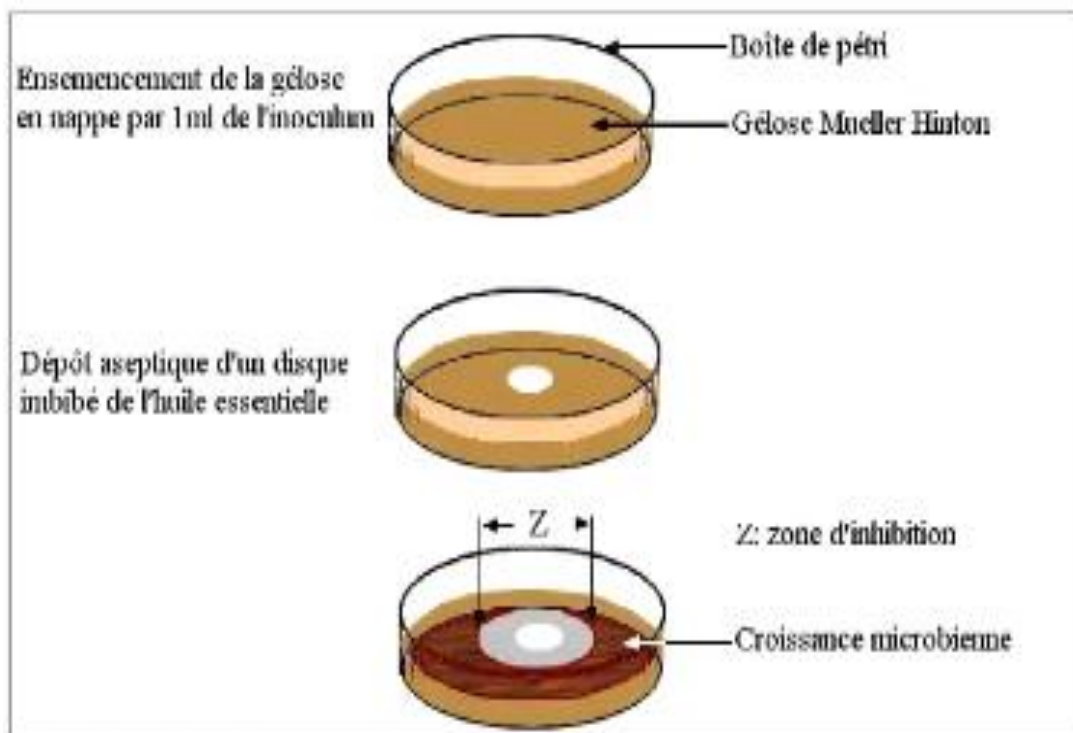


Figure 25 : Illustration de la méthode d'aromatogramme (Zaiki ,1988)

III-2- Activité antifongique :

Le champignon phytopathogène utilisé est le *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* (FOL.), procuré par le laboratoire de bactériologie et virologie du CRBT

III-2-1- Préparation des extraits :

1, 2, 4, 8,16 mg de chaque extrait sont mélangés avec 1ml de DMSO (Diméthylsulfoxyde) dans des tubes Eppendorf et homogénéisés à l'aide du vortex.

Une deuxième série de concentration (16, 32, 64, 128, et 256mg) a été préparée par la même méthode sauf pour l'extrait chloroformique (par manque d'extrait on n'a pas pu préparer la dernière concentration de 256mg)

III-2-2- Préparation du milieu de culture :

Le milieu utilisé est le PDA (Potato Dextrose Agar). 340g de pomme de terre épluché et bien découpé sont mélangés avec 1700ml d'eau distillé, bouillir à 100° C pendant 20 à 25 minutes, recueillir l'eau de la pomme de terre. 34g de glucose sont ajoutées à l'eau récupéré, avec une agitation de 10min. 34g d'agar sont ajoutées au mélange en petites quantités pour éviter la solidification en gardant l'agitation. Mettre le mélange dans des Erlen Meyer de 100ml (17 Erlens), mettre dans la cuve pendant 24h. Après 24h le milieu est placé dans l'étuve et prêt à être utilisé.

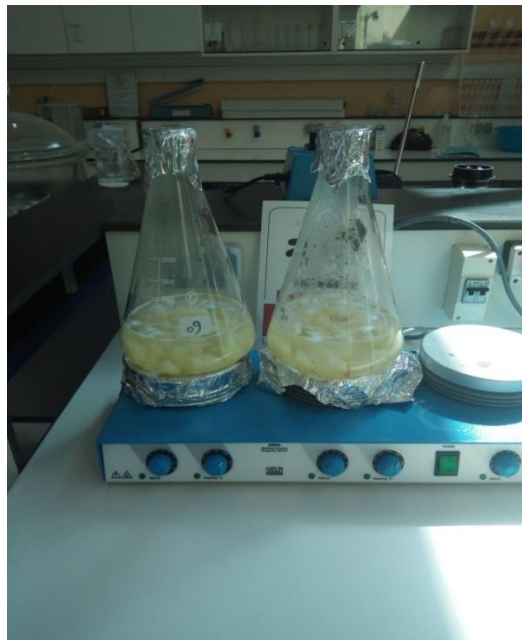


Figure 26 : Préparation du milieu PDA.

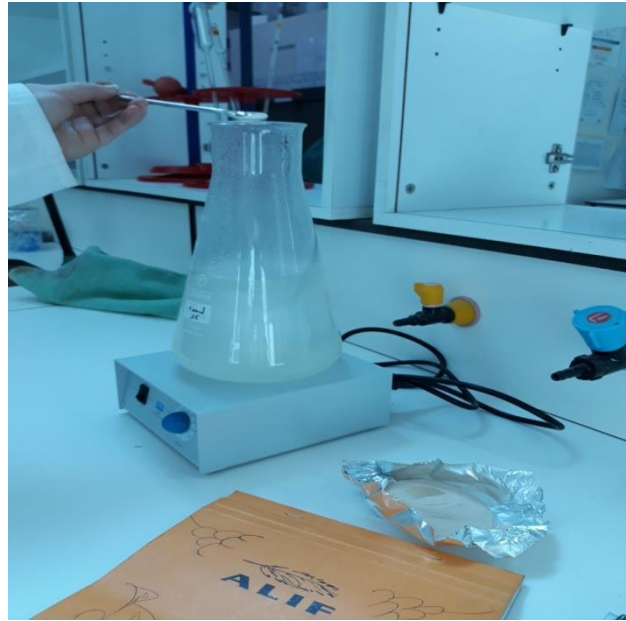


Figure 27 : L'addition de l'agar.

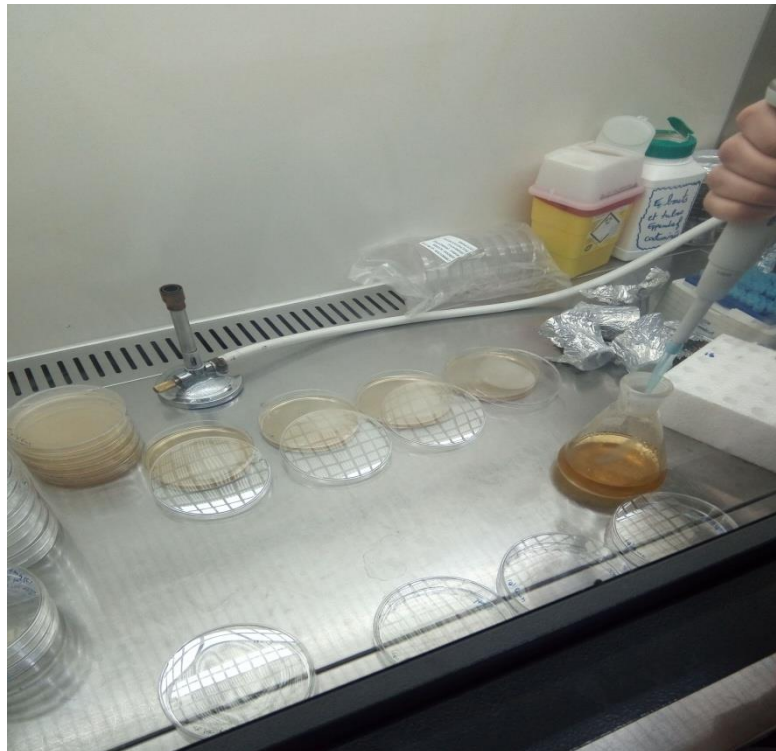


Figure 28 : L'addition de l'extrait au PDA et coulage dans les boites de pétri.



Figure 29 : Dépôt des disques de champignon.

III-2-3- Evaluation de l'activité antifongique des différents extraits :

L'activité antifongique des extraits est évaluée par la méthode de contact direct. Un disque de 5mm de diamètre pris d'une culture jeune de champignon est déposé aseptiquement au centre de la boîte de pétri contenant le PDA et l'extrait, l'expérience est répétée 4 fois pour chaque concentration d'extrait. Après 7 jours d'incubation à 28° C, la croissance mycélienne du champignon est mesurée à l'échelle millimétrique à l'aide d'une règle. L'activité inhibitrice est exprimée en pourcentage et calculée selon la formule : $I = (C - T / C) \times 100$ (Dennis et *al.* ; 1971).

I= taux d'inhibition en %

C= Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA avec DMSO (témoin)

T= Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA contenant l'extrait

Le témoin est préparé en remplaçant l'extrait par le DMSO. Un témoin négatif est préparé en mettant le champignon sur le PDA seulement.

On a classé l'activité antibactérienne des extraits testés comme suit:

- Diamètre de la zone d'inhibition < 1mm: absence de l'activité antibactérienne (-);
- Diamètre de la zone d'inhibition égale à 1 mm: Activité antibactérienne très faible (f);

- Diamètre de la zone d'inhibition varie entre 2 et 3 mm: Activité antibactérienne faible (+);
- Diamètre de la zone d'inhibition varie entre 4 et 5 mm: Activité antibactérienne modérée (++);
- Diamètre de la zone d'inhibition varie entre 6 et 9 mm: Activité antibactérienne forte (+++);
- Diamètre de la zone d'inhibition >9mm: Activité antibactérienne très forte (++++).

Partie 3

Résultats et discussions

Résultats et discussions

I- Etude phytochimique :

I- 1- Dosage des composés phénoliques :

I- 1-1- Dosage des polyphénols totaux :

Une droite d'étalonnage est réalisée avec de l'acide gallique dans les mêmes conditions que les échantillons à analyser.

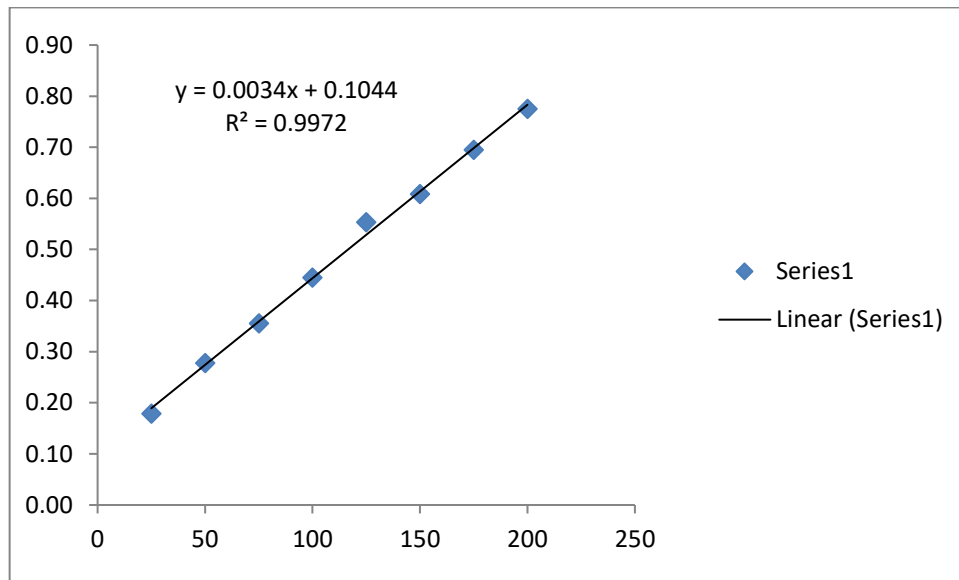


Figure 30 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

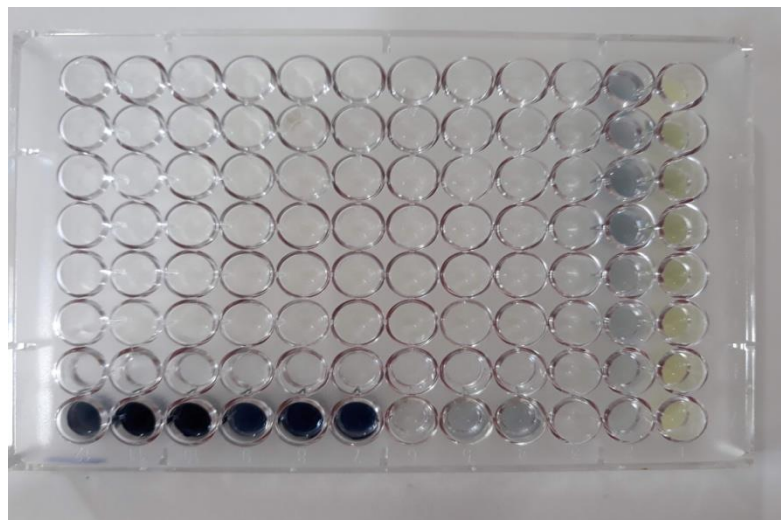


Figure 31 : Résultats du dosage des polyphénols sur microplaque.

Les teneurs en polyphénols totaux exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait sont représentées dans le tableau 05.

Tableau 05 : Résultats du dosage des polyphénols :

Extraits	Taux de polyphénols totaux (mg EAG/g d'extrait)
Extrait d'acétate	540,47±3,75
Extrait butanolique	410,96 ± 4,14
Extrait chloroformique	21,64 ± 3,74

I- 1-2- Dosage des Flavonoïdes :

La quantification des flavonoïdes se fait en fonction d'une courbe d'étalonnage réalisée par un flavonoïde standard (la quercétine)

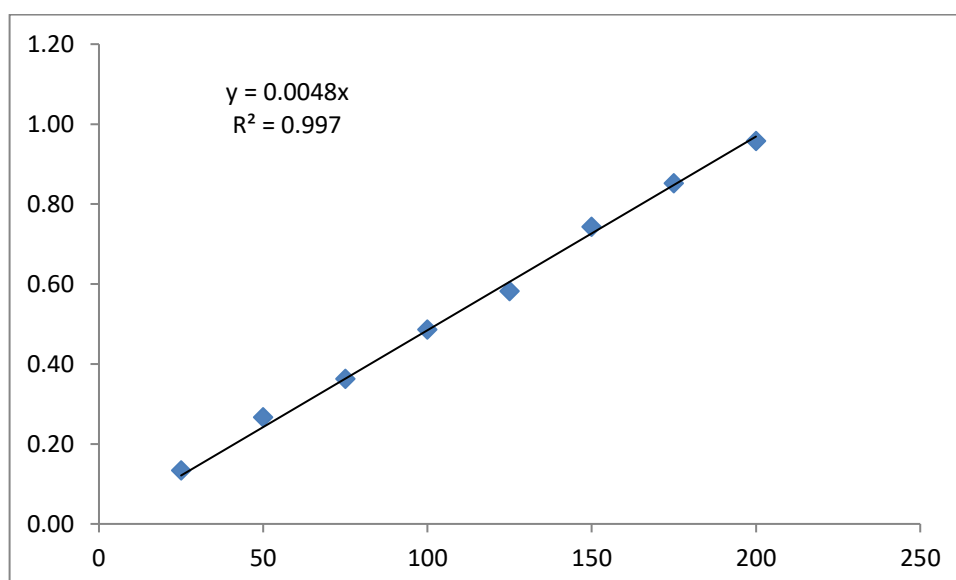


Figure 32 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Les teneurs en flavonoïdes des différents extraits sont exprimées en mg EQ/ g E. Les résultats obtenus sont énoncés sur le tableau 06.

Tableau 06 : Résultats du dosage des Flavonoïdes :

Extraits	Taux de Flavonoïdes (mg EQ/g d'extrait)
Extrait d'acétate	156,59± 6,77
Extrait butanolique	78,33 ± 3,97
Extrait chloroformique	63,47 ± 2,35

Discussion :

Le taux des polyphénols totaux calculé a révélé que l'*E.globulus* présente une teneur importante en composés phénoliques pour l'extrait d'acétate et l'extrait butanolique avec un taux plus élevé pour l'extrait d'acétate (540,4706 mg EAG/g d'extrait), tandis que l'extrait chloroformique présente une teneur faible en composés phénoliques avec un taux de (21,64 mg EAG/g d'extrait). Pour les flavonoïdes, le taux calculé a montré que l'extrait d'acétate a la plus grande valeur (156,59 mg EQ/g d'extrait) suivi par l'extrait butanolique (78,33 mg EQ/g d'extrait) et enfin l'extrait chloroformique (63,47 mg EQ/g d'extrait). Les résultats du dosage des polyphénols totaux sont conformes avec ceux des flavonoïdes. Ces résultats ont permis de classer les extraits selon leur richesse en composés phénoliques comme suit : Extrait d'acétate > Extrait butanolique > Extrait chloroformique.

Atoui et *al.* (2005) ont trouvé une teneur de $113 \pm 1,33$ mg EAG / tasse (240 ml) d'infusion de feuilles d'*E. globulus*, et d'autre part Amakura et *al.* (2009) ont utilisé la méthode de Folin –Ciocalteu pour évaluer la quantité de polyphénols totaux dans les extraits des feuilles d'Eucalyptus A et Eucalyptus B (utilisés comme additifs alimentaires), ces auteurs ont détecté une teneur de 360 mg EAG/ g d'extrait et 29 mg EAG/ g d'extrait pour l'Eucalyptus A et Eucalyptus B, respectivement.

I- 2- Activités anti oxydantes :

I-2-1- Le test DPPH:

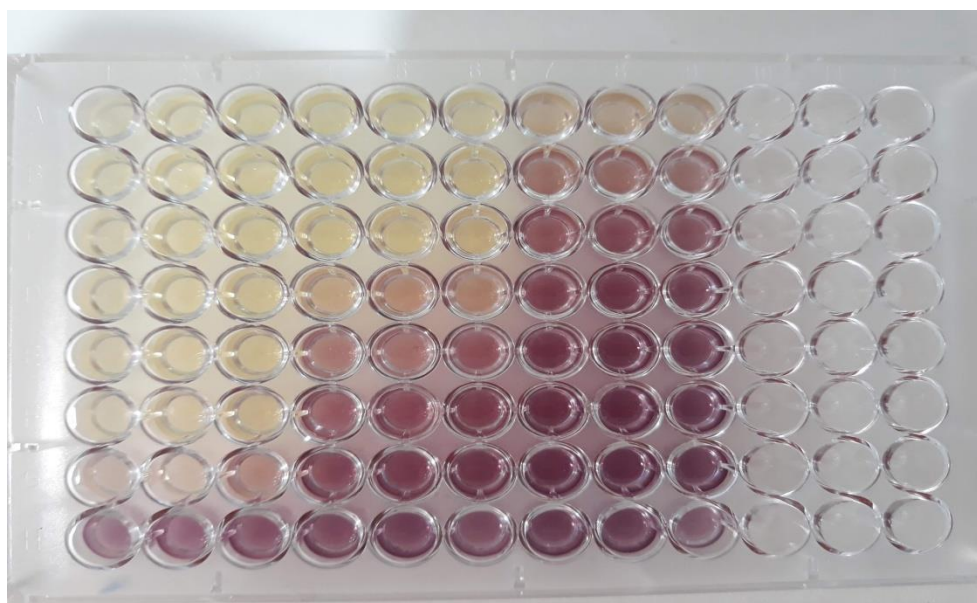


Figure 33 : Résultats du DPPH sur microplaque.

Tableau 07 : Résultats du test DPPH des extraits foliaires d'*E. globulus*.

Extraits	% d'inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/ml
Extrait d'acétate	NA	16,73±0,68	69,96±0,65	78,51±0,49	79,57±0,24	81,27±0,12	81,55±0,76	10,16±0,07
Extrait butanolique	NA	NA	12,39±15,64	46,26±9,66	80,20±1,03	81,38±0,41	81,77±0,54	31,11±1,72
Extrait chloroformique	NA	NA	NA	NA	NA	16,72±4,42	57,10±1,18	181,45±3,97
BHT	11,69±1,88	22,21±1,30	37,12±1,80	52,63±2,70	56,02±0,53	83,60±0,23	87,28±0,26	22,32±1,19
BHA	28,95±1,16	54,33±1,59	76,76±1,65	84,09±0,35	87,53±0,82	87,73±0,15	88,43±0,23	5,73±0,41

NA: Non Absorbance.

Les résultats du test DPPH sont exprimés en IC₅₀. La valeur IC₅₀ (Concentration d'inhibition à 50 %) est définie comme étant la concentration du substrat nécessaire à diminuer de 50 % l'absorbance de la solution initiale du DPPH. Les IC₅₀ sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Dasgupta et De, 2007; Maisuthisakul *et al.*, 2007).

L'extrait d'acétate a présenté une activité antioxydante plus importante que celle du BHT avec l'IC₅₀ la plus faible (10,16±0,07 µg/ml), suivi par l'extrait butanolique (31,11±1,72 µg/ml), alors que l'extrait chloroformique a présenté l'IC₅₀ la plus importante (181,45±3,97 µg/ml).

I-2-2-Le test ABTS:

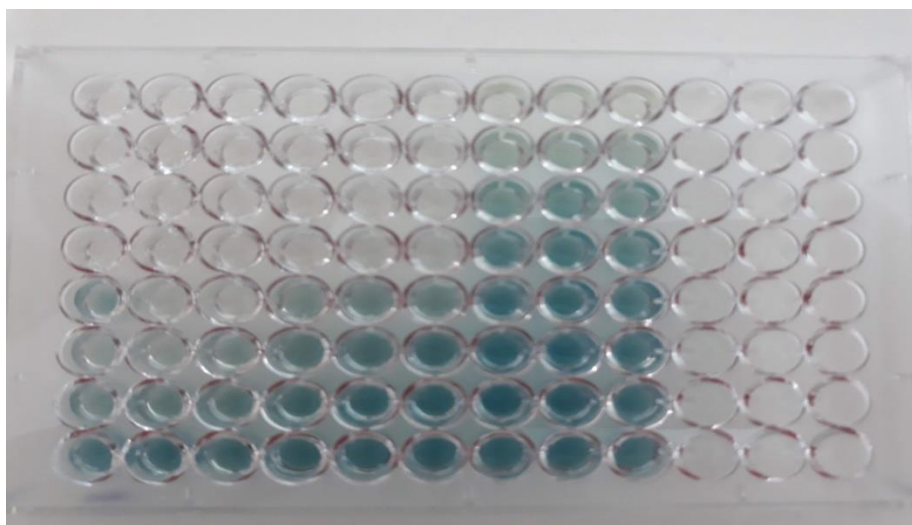


Figure 34 : Résultats de l'ABTS sur microplaque.

Tableau 08 : Résultats du test ABTS des extraits foliaires d'*E. globulus*.

Extraits	% d'inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/ml
Extrait d'acétate	20,72±4,38	48,63±8,80	80,61±7,85	89,76±0,72	90,85±1,02	Sat	Sat	7,26±0,68
Extrait butanolique	NA	16,97±4,88	35,03±5,52	86,32±3,58	89,68±0,62	90,15±0,23	Sat	15,61±1,17
Extrait chloroformique	NA	NA	NA	NA	15,87±3,99	46,99±1,43	77,25±3,08	125,19±2,47
BHT	59,22±0,59	78,55±3,43	90,36±0,00	92,18±1,27	93,37±0,86	94,87±0,87	96,68±0,39	1,29±0,30
BHA	83,42±4,09	93,52±0,09	93,58±0,09	93,63±0,16	93,63±0,95	94,20±0,90	95,39±2,62	1,81±0,10

NA: Non Absorbance.

Sat: Saturation.

L'extrait d'acétate a présenté l'IC₅₀ la plus faible (7,26±0,68µg/ml), suivi par l'extrait butanolique (15,61±1,17µg/ml), alors que l'extrait chloroformique a présenté la plus grande IC₅₀ (125,19±2,47µg/ml). Alors c'est l'extrait d'acétate qui a un pouvoir antioxydant plus important.

I-2-3- Le test Reducing power (Pouvoir réducteur) :

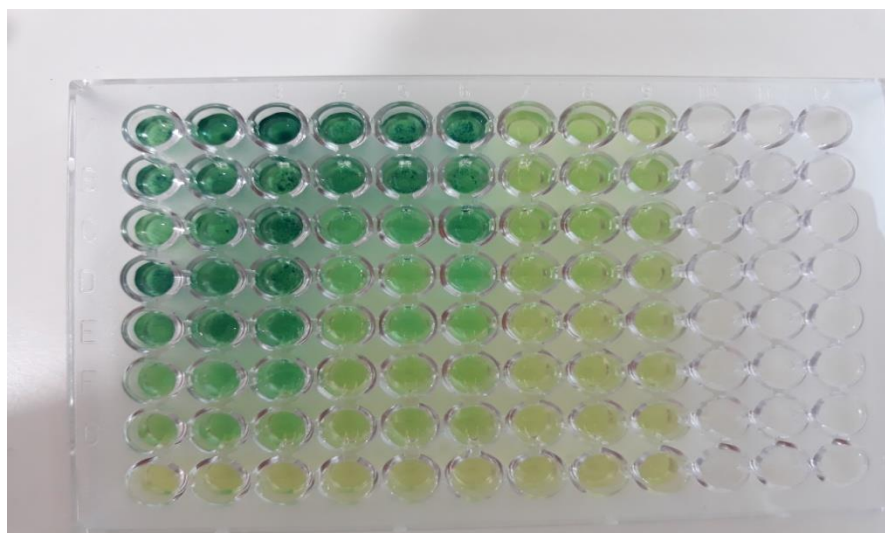


Figure 35 : Résultats du pouvoir réducteur sur microplaque.

Tableau 09 : Résultats du test du Pouvoir réducteur des extraits foliaires d'*E.globulus*

Extraits	Absorbance							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0.50} µg/ml
Extrait d'acétate	0,37±0,0 3	0,45±0,0 6	0,64±0,1 3	0,85±0,19	0,55±0,2 4	0,53±0,0 8	1,52±0,9 9	6,54±4,10
Extrait butanolique	0,18±0,0 3	0,18±0,0 1	0,28±0,0 7	0,29±0,13	0,43±0,2 0	0,56±0,1 3	0,81±0,1 7	76,33±35,2 8
Extrait chloroformique	0,09±0,0 0	0,11±0,0 1	0,10±0,0 5	0,15±0,02	0,20±0,0 2	0,14±0,0 2	0,17±0,0 1	>200
	0.78125 µg	1.5625 µg	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	A_{0.50} µg/ml
BHT	0,07±0,0 0	0,08±0,0 0	0,10±0,0 1	0,13±0,02	0,22±0,0 4	0,28±0,0 5	0,43±0,0 2	>50
BHA	0,09±0,0 0	0,11±0,0 1	0,18±0,0 2	0,36±0,04	0,78±0,0 7	1,74±0,0 7	3,53±0,1 9	8,41±0,67
AscAICd	0,09±0,00	0,11±0,00	0,16±0,01	0,33±0,04	0,76±0,16	2,02±0,23	3,87±0,27	9,01±1,46

Les résultats du pouvoir réducteur sont exprimés en A_{0,50}. La valeur A_{0,50} est définie comme étant la concentration du substrat qui donne une absorbance de 0,50.

L'extrait d'acétate a présenté l'A_{0,50} la plus faible (6,54±4,10µg/ml) qui est inférieure à celles des standards, suivi par l'extrait butanolique (76,33±35,28µg/ml), alors que l'A_{0,50} de l'extrait chloroformique est la plus grande (>200µg/ml).

I-2-4-Le test Galvinoxyl radical (GOR):

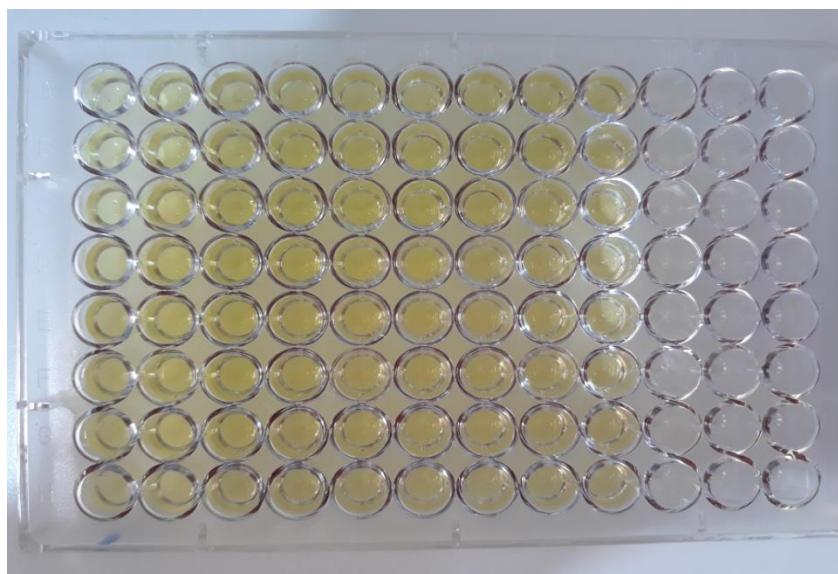


Figure 36 : Résultats du test GOR sur microplaque.

Tableau 10: Résultats du test GOR des extraits foliaires d'*E. globulus*.

Extraits	%d'inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100µg	200µg	IC ₅₀ µg/ml
Extrait d'acétate	28,53±4,5 2	62,73±0,5 7	63,01±0,9 3	63,87±0,4 2	65,77±0,6 1	69,43±0,5 5	72,28±0,49	3,54±0,36
Extrait butanolique	3,65±2,12	11,97±1,6 2	29,22±4,0 6	61,42±0,8 2	73,37±0,1 3	76,47±1,0 2	77,86±0,10	20,59±0,52
Extrait chloroformique	NA	NA	NA	NA	15,14±0,9 8	34,45±5,2 6	57,88±2,22	168,05±10,06
	1.5625	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100µg	IC₅₀µg/ml
BHT	34,66±2,6 2	49,23±0,7 7	61,29±0,6 9	68,89±0,2 6	70,02±0,5 0	70,49±0,5 5	71,13±0,74	3,32±0,18
BHA	25,99±2,5 6	39,15±0,8 8	54,16±0,2 7	65,02±1,2 6	70,19±0,5 1	70,32±0,6 5	70,60±0,10	5,38 ±0,06

NA: Non Absorbance.

Les résultats du GOR sont exprimés en IC₅₀. La valeur IC₅₀=la concentration d'inhibition à 50 %.

L'extrait d'acétate a présenté l'IC₅₀ la plus faible (3,54±0,36µg/ml) qui est inférieure à celles des standard BHT et BHA, suivi par l'extrait butanolique (20,59±0,52µg/ml), alors que l'extrait chloroformique a présenté la plus grande IC₅₀ (168,05±10,06µg/ml).

I- 2-5-Le test CUPRAC (Cupric reducing antioxidant capacity):

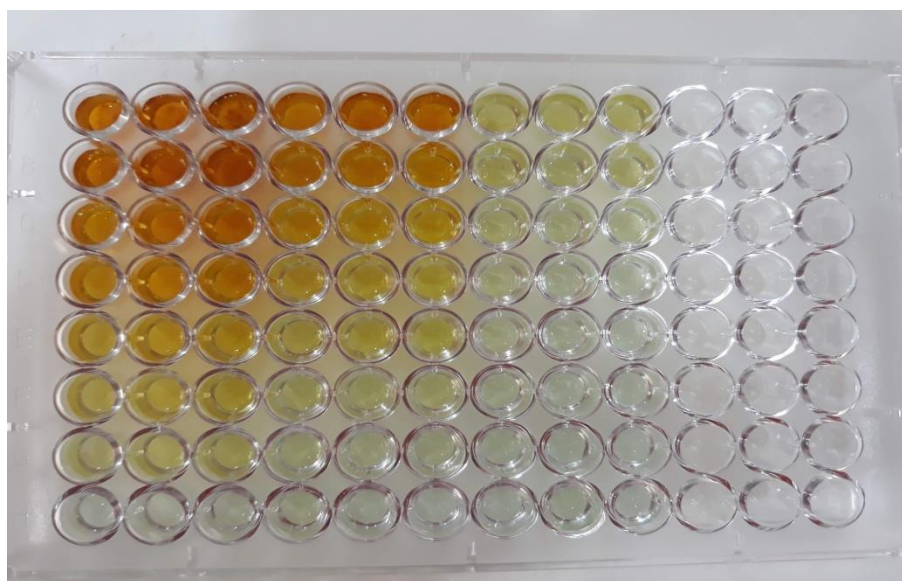


Figure 37 : Résultats du CUPRAC sur microplaque.

Tableau 11 : Résultats du test CUPRAC des extraits foliaires d'*E.globulus*

Extraits	% d'inhibition du CUPRAC							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0.50} µg/ml
Extrait d'acétate	0,33±0,00	0,56±0,01	0,85±0,03	1,53±0,07	2,12±0,11	3,09±0,16	3,69±0,16	5,82±0,15
Extrait butanolique	0,15±0,00	0,19±0,01	0,38±0,08	0,49±0,02	0,87±0,01	1,57±0,04	3,27±0,47	26,14±0,03
Extrait chloroformique	0,11±0,01	0,11±0,01	0,13±0,01	0,16±0,01	0,23±0,01	0,32±0,05	0,56±0,04	175,11±16,79
BHT	0,19±0,01	0,33±0,04	0,66±0,07	1,03±0,07	1,48±0,09	2,04±0,14	2,32±0,28	9,62±0,87
BHA	0,46±0,00	0,78±0,01	1,34±0,08	2,36±0,17	3,45±0,02	3,76±0,03	3,93±0,01	3,64±0,19

Les résultats du CUPRAC sont exprimés en A_{0,50}. La valeur A_{0,50} est définie comme étant la concentration du substrat qui donne une absorbance de 0,50.

L'extrait d'acétate a présenté l'A_{0,50} la plus faible (5,82±0,15 µg/ml) qui est inférieure à celle du standard BHT, suivi par l'extrait butanolique (26,14±0,03 µg/ml), alors que l'A_{0,50} de l'extrait chloroformique est la plus grande (175,11±16,79 µg/ml).

Discussion :

Les résultats issus des différents tests utilisés pour évaluer l'activité antioxydante ont révélé que l'extrait d'acétate et l'extrait butanolique ont exprimé une forte activité antioxydante comparée à l'extrait chloroformique. Toutes les méthodes utilisées (DPPH, ABTS, Reducing power, GOR et CUPRAC) ont révélé que l'extrait d'acétate des feuilles d'*E. globulus* est le plus fort antioxydant suivi par l'extrait butanolique. Ces résultats confirment ceux trouvés au dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes. Cette importante activité antioxydante des différents extraits est proportionnelle au taux des composés phénoliques ce qui pourrait être expliqué par le rôle direct de ces derniers dans le pouvoir antioxydant et l'activité inhibitrice des radicaux libres. Le faible potentiel antioxydant de l'extrait chloroformique pourrait être dû à la faible concentration en composés phénoliques. Les études faites sur l'activité antioxydantes des polyphénols foliaires du genre *Eucalyptus* sont rares, les espèces de ce genre sont beaucoup plus étudiées par rapport à leur richesse en huiles essentielles. Conde et al.(1997) ont noté la présence de la vanilline dans les extraits des feuilles d'*E.globulus* obtenus avec le méthanol aqueux (80 %).

Yanishlieva-Maslarova(2001) a signalé que les monophénols expriment une faible activité antioxydante par rapport aux autres composés phénoliques. De plus, Villaño et ses collaborateurs (2007) ont constaté que certains composés phénoliques tels que l'acidevanillique, acide p-coumarique, tyrosol, vanilline, syringaldéhyde et l'acide p-hydroxybenzaldehyde n'interviennent pas dans la réduction du radical DPPH.

I-3- Activité anti-enzymatique :

I-3-1-Activité Anti-acétylcholinestérase :

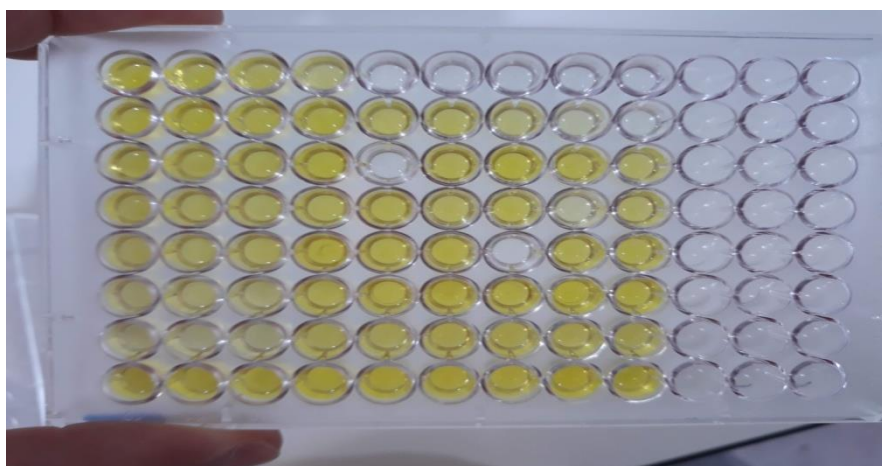


Figure 38 : Résultats Anti-Acétylcholinestérase sur microplaque.

Tableau 12 : Résultats de l'Anti-Acétylcholinestérase des extraits foliaires d'*E. globulus*

Extraits	% d'inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/ml
Extrait d'acétate	62,73±1,70	49,18±2,45	Sat	Sat	Sat	Sat	Sat	6,48±0,02
Extrait butanolique	29,56±3,62	9,14±10,21	1,77±5,98	16,22±4,71	34,24±5,62	21,42±2,57	98,06±0,13	137,38±2,19
Extrait chloroformique	32,56±4,26	2,71±6,43	41,12±4,9,83	34,14±2,9,30	7,41±18,22	66,53±2,7,00	98,97±0,68	98,13±3,2,20
Galantamine	35,93±2,28	43,77±0,00	68,50±0,31	80,69±0,41	85,78±1,63	91,80±0,20	94,77±0,34	6,27±1,15

Sat: Saturation.

Les résultats de l'Activité Anti-Acétylcholinestérase sont exprimés en IC₅₀. La valeur IC₅₀=la concentration d'inhibition à 50 %.

Discussion :

A ce jour, la maladie d'Alzheimer reste incurable. Cependant, l'une des approches les plus prometteuses pour le traitement de cette maladie consiste à améliorer le niveau d'acétylcholine dans le cerveau en utilisant des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Ingkaninan et al., 2003). En effet, la plupart des médicaments anti-Alzheimer qui sont disponibles sur le marché agissent sur cette activité cholinergique en inhibant la dégradation de l'acétylcholine tels que la donepezil, la rivastigmine et la galantamine (Etienne, 2008).

L'acétylcholinestérase (AChE) est un neurotransmetteur synaptique qui, en se fixant au récepteur cholinergique membranaire, permet la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx au niveau des jonctions neuromusculaires. L'AChE joue un rôle primordial dans la régulation de l'influx nerveux. Elle assure la libération de la fente synaptique en vue d'une nouvelle transmission par dégradation de l'acétylcholine résiduelle issue d'une neurotransmission (Figure 38). Chez les personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, le taux d'acétylcholine est particulièrement faible, ce qui explique les troubles cognitifs observés. La solution pour augmenter le taux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste alors à diminuer sa dégradation, ceci en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Houghton et al., 2006).

En se basant sur l'hypothèse d'inhiber l'action de l'AChE pour mieux traiter la MA, il est apparu sur le marché plusieurs inhibiteurs de cette enzyme (Grossberg, 2003).

En 2000, il est apparu sur le marché un alcaloïde naturel qui est la galantamine issue de l'espèce *Galanthus nivalis* L. De la famille des Amaryllidaceae. La galantamine diffère des autres inhibiteurs par son mécanisme à double action : en plus d'inhiber l'AChE, elle provoque une modulation allostérique des récepteurs présynaptiques nicotiques, ce qui augmente la libération de neuromédiateurs (Maelicke et al., 2001). D'autres caractères favorisent l'utilisation de la galantamine comme meilleur inhibiteur de l'AChE tels que sa demi-vie longue et son action sélectif, réversible et compétitif (Woodruff-Pak et al., 2001).

La galantamine est largement utilisée comme une substance de référence dans les tests *in vitro* du fait de son fort pouvoir inhibiteur de l'AChE (Lopez et al., 2002). Aujourd'hui, elle est autorisée dans plusieurs pays Européens comme un des traitements de la MA à des stades avancés (Sramek et al., 2000).

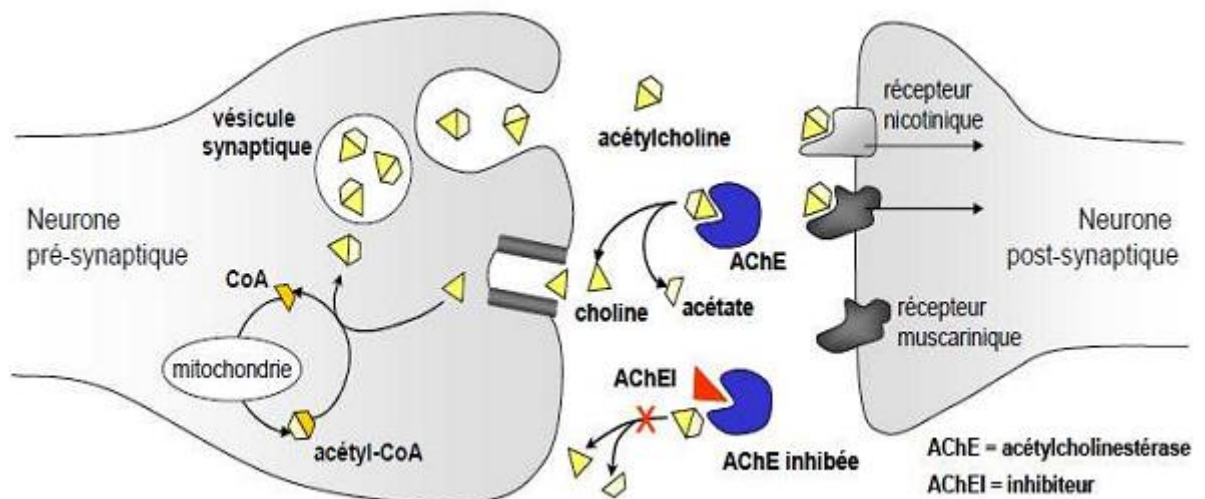


Figure 39 : Schéma d'une synapse et mécanismes de neurotransmission cholinergique (Urbain 2007).

Bien que la plupart des inhibiteurs connus de l'enzyme AChE soient des alcaloïdes, récemment, plusieurs études ont été faites pour identifier d'autres molécules naturelles pouvant avoir une activité anti-AChE importante. Ainsi, selon Houghton et al. (2006) plusieurs composés, autres que les alcaloïdes, présentent une grande capacité d'inhiber l'enzyme AChE tels que les terpenoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes et les iso-coumarines.

Dans notre étude, l'extrait acétate exerce une activité anti- AChE très importante avec une IC_{50} de $(6,48 \pm 0,02 \mu\text{g/ml})$ presque équivalente à celle du standard Galantamine

(6.27 ± 1.15 $\mu\text{g/ml}$). Ce résultat confirme encore le rôle des polyphénols dans l'activité anticholinestérase.

Dans le même objectif, Nag et De (2011) ont montré aussi que des composés phénoliques simples tels que l'acide gallique et l'acide ellagique sont de bons inhibiteurs de l'AChE. Aderogba et *al.* (2013) ont isolé, à partir des extraits des feuilles de *Croton penduliflorus*, quelques composés phénoliques tels que la quercetin-3-O-rhamnoside, le kaempferol-3-O-rhamnoside, le protocatchualdéhyde et l'acide p-hydroxybenzoïque. L'étude de leur activité anti-AChE a montré que ces composés phénoliques sont des inhibiteurs puissants de l'AChE.

L'étude réalisée par Xian et *al.* (2014) a montré que les extraits de plusieurs fougères originaires du Chine, riches en flavonoïdes, présentent une activité anti-AChE importante. En se basant sur les exemples récents de la littérature, dont certains sont cités précédemment, plusieurs recherches sont menées pour tester des extraits naturels riches en composés phénoliques et en flavonoïdes et d'identifier d'autres molécules plus compétitives dans l'inhibition de l'enzyme AChE que celles commercialisées sur le marché. Ainsi, la première partie de notre étude a confirmé la richesse des extraits des feuilles d'*E globulus* en composés phénoliques et en flavonoïdes. Cela nous a encouragé de revaloriser cette espèce en testant, en plus de l'activité anti-oxydante, l'activité anti-AChE.

I-3-2-Activité anti-tyrosinase :

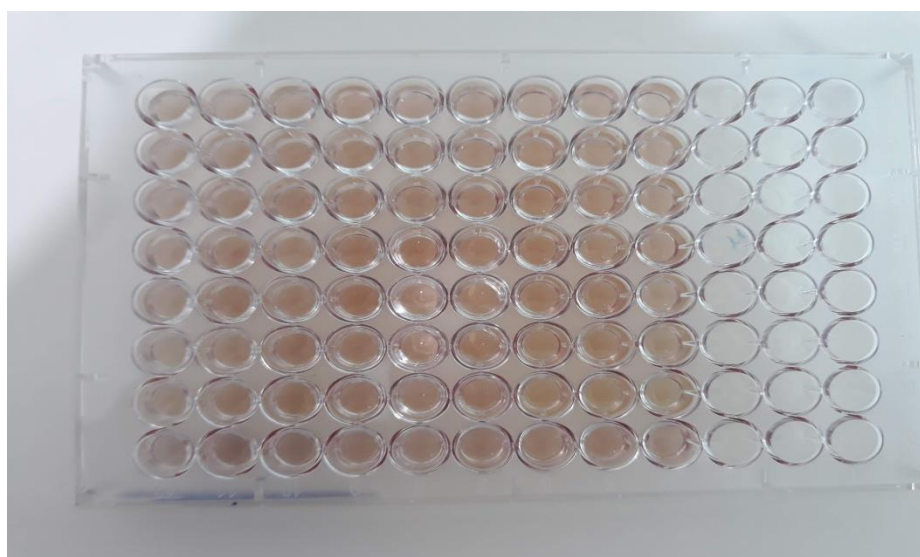


Figure 40 : Résultats de l'activité anti-tyrosinase sur microplaque.

Tableau 13 : Résultats de l'activité anti-tyrosinase des extraits foliaires d'*E. globulus*

Extraits	% d'inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µ g	200 µg	IC ₅₀ µg/ml
Extrait d'acétate	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	////////
Extrait butanolique	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	////////
Extrait chloroformique	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	////////
Acide kojique	6,91± 0,75	19,22 ± 0,75	36,29± 2,92	49,46± 2,24	58,32± 0,37	64,36± 0,65	66,95±2,2 4	25.23 ± 0.78

NA: Non Absorbance.

Discussion :

Les résultats de l'Activité anti-tyrosinase sont exprimés en IC₅₀. La valeur IC₅₀ = la concentration d'inhibition à 50 %.

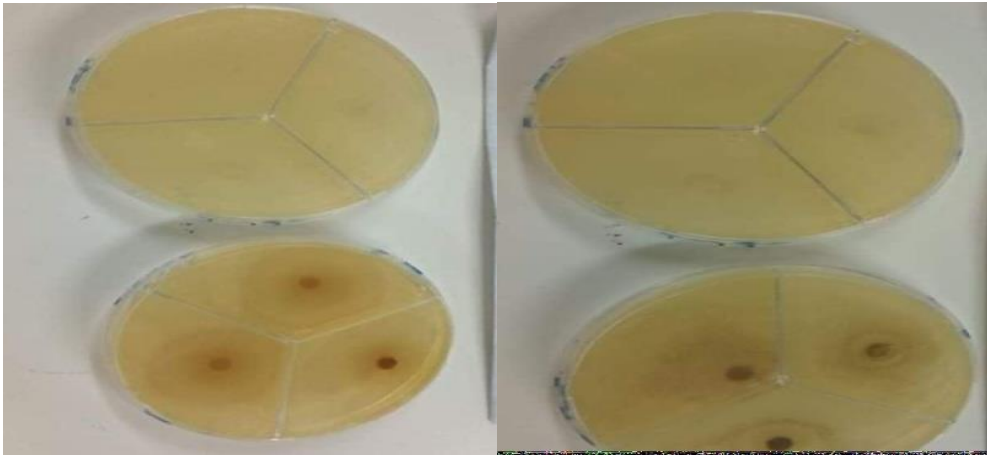
La tyrosinase est une enzyme jouant un rôle primordial dans la synthèse des mélanines, pigments de la peau. Plusieurs polyphénols sont connus pour leur effet inhibiteur de cette enzyme.

Nos résultats montrent une inefficacité totale des trois extraits foliaires d'*E. globulus* comme inhibiteur de la tyrosinase, c'est-à-dire les composés phénoliques de cette espèce ne causent pas des problèmes de pigmentation et de production de mélanine chez l'être humain.

II- Etude biologique:

II-1-Activité antibactérienne :

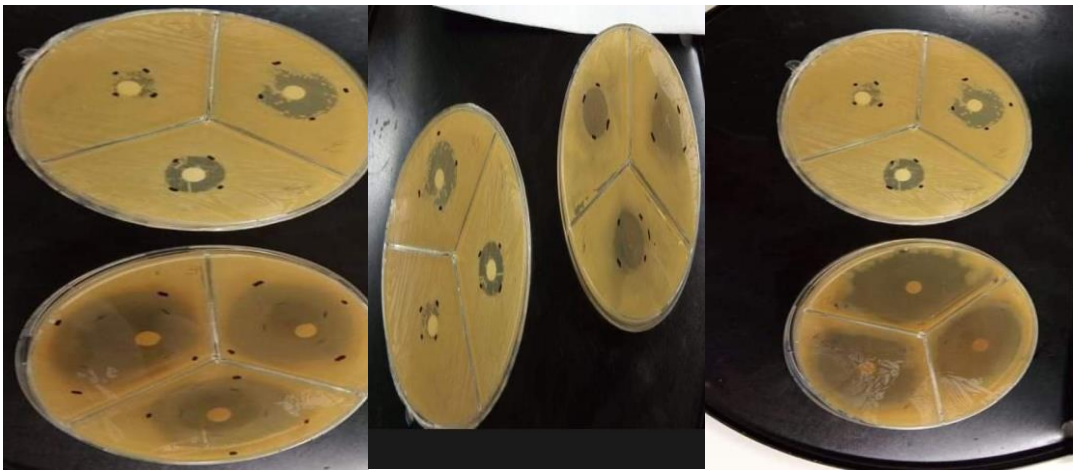
L'activité antibactérienne des extraits d'*E. globulus* est testée vis-à-vis de deux souches bactériennes (*Staphylococcus aureus* : Gram+, et *E. coli* : Gram-) par la méthode de diffusion sur disque.



A : Extrait butanolique

B : Extrait chloroformique

Figure 41 : L'effet des extraits sur *E. coli*.



A : Extrait butanolique **B** : Extrait chloroformique **C** : Extrait d'acétate d'éthyle

Figure 42: L'effet des extraits sur *Staphylococcus aureus*.

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux suivant :

Tableau 14 : Diamètre des zones d'inhibitions d'*E. Coli*.par les extraits foliaires d'*E.globulus*.

Extraits	Zone d'inhibition (mm)
Extrait d'acétate d'éthyle.	07
Extrait butanolique.	31
Extrait chloroformique.	39

Tableau 15 : Diamètre des zones d'inhibitions de *Staphylococcus aureus* par les extraits foliaires d'*E.globulus*

Extraits	Zone d'inhibition (mm)
Extrait d'acétate d'éthyle.	13
Extrait butanolique.	32
Extrait chloroformique.	37

• Evaluation de l'activité antibactérienne :

La lecture des résultats se fait après 18 à 24 heures d'incubation, elle est basée sur la mesure des diamètres des zones d'inhibition exprimée en millimètre. En se basant sur les diamètres des zones d'inhibition (DZI) obtenus par la méthode de diffusion en milieu solide après soustraction de diamètre du disque. Rodríguez Vaquero *et al.* (2007)

Le méthanol utilisé pour la dissolution des extraits n'a pas montré un effet antibactérien sur les souches testées ce qui est en accord avec la constatation de Al-Zoreky (2009).

Tableau 16 : Diamètre des zones d'inhibition d'*E. Coli.* par les extraits foliaires d'*E.globulus*

Extraits	Zone d'inhibition (mm)
Extrait d'acétate d'éthyle.	(+++)
Extrait butanolique.	(++++)
Extrait chloroformique.	(++++)

Tableau 17 : Diamètre des zones d'inhibition de *Staphylococcus aureus* par les extraits foliaires d'*E.globulus*

Extraits	Zone d'inhibition (mm)
Extrait d'acétate d'éthyle.	(++++)
Extrait butanolique.	(++++)
Extrait chloroformique.	(++++)

Pour la bactérie *E. Coli* l'extrait d'acétate d'éthyle présente une activité antibactérienne forte, tandis que les extraits butanolique et chloroformique présentent une activité antibactérienne très forte. Alors que pour la bactérie *Staphylococcus aureus* tous les extraits présentent une activité antibactérienne très forte.

Ces dernières années, plusieurs bactéries ont développé des résistances envers des antibiotiques utilisés pour le traitement des différentes affections chez l'Homme (Zampini *et al.*, 2005). Chaque année un à trois antibiotiques sont retirés des pharmacies à cause de leurs effets secondaires et de l'apparition des maladies qui, avant, étaient rares (Karou *et al.*, 2005; Zampini *et al.*, 2005). Ces situations ont motivé les scientifiques à chercher de nouvelles substances antibactériennes à partir de sources multiples telles que les plantes médicinales (Zampini *et al.*, 2005). Des études basées sur la recherche des agents antibactériens ont montré que les plantes représentent une source potentielle de nouveaux agents antibactériens (Arias *et al.*, 2004; Zampini *et al.*, 2005).

Une étude réalisée par Slimani (2010) a révélé que les extraits des feuilles, de l'écorce ainsi que des fruits d'*E.globulus* semblent capables d'inhiber la croissance de bactéries

pathogènes essentiellement staphylococcus aureus. Ces résultats sont parfaitement conformes avec les nôtres.

II-2-Activité antifongique :



A : extrait Butanolique **B** : extrait Chloroformique **C** : Extrait d'Acétate d'éthyle.

Figure 43: L'évolution de *Fusarium oxysporium* à la faible concentration (1 mg)



A : extrait Butanolique **B** : extrait Chloroformique **C** : Extrait d'Acétate d'éthyle.

Figure 44 : L'évolution de *Fusarium oxysporium* à la forte concentration (256 mg, 128mg)

Tableau 18 : Diamètres des zones de développement du champignon de la première série de concentrations (en mm).

Extraits	1 mg	2 mg	4 mg	8 mg	16 mg
Extrait d'acétate d'éthyle.	73	74	78	75	74
Extrait butanolique.	75	78	79	77	75
Extrait chloroformique.	66	74	69	63	57

Tableau 19 : Diamètres des zones de développement du champignon de la deuxième série de concentrations (en mm).

Extraits	16 mg	32 mg	64 mg	128 mg	256 mg
Extrait d'acétate d'éthyle.	76	70	74	71	60
Extrait butanolique.	80	77	73	69	65
Extrait chloroformique.	65	56	48	47	/

Evaluation de l'activité antifongique :

L'activité inhibitrice est exprimée en pourcentage et calculée selon la formule : $I = (C - T/C) \times 100$ (Dennis et *al.* ; 1971).

I= taux d'inhibition en %

C= Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA avec DMSO (témoin)

T= Croissance radiale du champignon en mm sur le PDA contenant l'extrait.

En sachant que les diamètres des zones de développement du champignon du témoin sont :

Pour la première série de concentrations :(71 mm).

Pour la deuxième série de concentrations :(77 mm).

Les résultats de l'activité inhibitrice sont représentés dans les tableaux suivants :

Tableau 20 : Résultats de l'activité inhibitrice de la première série de concentrations.

Extraits	1 mg	2 mg	4 mg	8 mg	16 mg
Extrait d'acétate d'éthyle.	-2,81%	-4,22%	-9,85%	-5,63%	-4,22%
Extrait butanolique.	-5,63%	-9,85%	-11,26%	-8,45%	-5,63%
Extrait chloroformique.	7,04 %	-4,22%	2,81%	11,26%	19,71%

Tableau 21 : Résultats de l'activité inhibitrice de la deuxième série de concentrations.

Extraits	16 mg	32 mg	64 mg	128 mg	256 mg
Extrait d'acétate d'éthyle.	1,30%	9,10%	3,90%	7,80%	22,08%
Extrait butanolique.	-3,90%	0%	5,19%	10,39%	15,58%
Extrait chloroformique.	15,58%	27,27%	37,66%	38,96%	/

Discussion :

D'après les résultats obtenus, on remarque que l'activité inhibitrice de l'extrait chloroformique est plus importante que les deux autres extraits butanolique et d'acétate d'éthyle. Le taux d'inhibition le plus élevé est celui de l'extrait chloroformique avec un pourcentage de 38.96% pour la concentration de 128 mg, suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle avec un pourcentage de 22.08% pour la concentration de 256 mg et en dernier l'extrait butanolique avec un pourcentage de 15.58% pour la concentration de 256 mg.

D'après une étude faite dans le but de rechercher des moyens de lutte biologique contre les champignons responsables de la pourriture des pommes en conservation, des tests de l'activité antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* ont été réalisés. Le pouvoir antifongique de ces huiles a été étudié vis-à-vis d'*Alternaria alternata* et de *Penicillium expansum*. C'est l'huile essentielle de *M.pulegium* qui s'est révélée la plus active, en effet 10 µl de son extrait ont été suffisants pour inhiber totalement la croissance mycélienne des deux moisissures ; alors qu'il a fallu 30µl d'huile essentielle d'*E. camaldulensis* pour obtenir le même effet sur les deux champignons. (Shama et al., 2011)

D'après notre étude, et les critères de classifications habituelles, les extraits des feuilles d'*E. globulus* ont révélé une faible activité pour toutes les concentrations. Les travaux de (Chebli et al., 2003 ; Vilela et al., 2009) ont montré que la pulégone et le 1,8-cinéole purs provoquent une inhibition de la croissance mycélienne, mais à des concentrations plus élevées.

Conclusion
et
perspectives

Conclusion et perspectives :

L'espèce *Eucalyptus globulus* Labill. Est très connue pour le caractère aromatique de ses feuilles et est utilisée depuis longtemps comme plante médicinale. La majorité des études menées sur cet arbre s'intéressaient aux huiles essentielles extraites des feuilles, rares sont les recherches faites sur les composés phénoliques. Les polyphénols foliaires d'*Eucalyptus globulus* Labill. ont fait l'objet de la présente étude.

Nos résultats ont révélé des taux très importants en polyphénols totaux et flavonoïdes de nos extraits, particulièrement l'extrait d'acétate d'éthyle, ce même extrait a exercé la plus forte activité antioxydante dans tous les tests faits (le test DPPH, ABTS, le pouvoir réducteur, GOR et le CUPRAC). Les effets anti-enzymatiques des extraits ont été évalués contre deux enzymes, l'acétylcholinestérase et la tyrosinase. La première est responsable de la maladie d'Alzheimer, et a été inhibé par nos extraits. Ces résultats sont prometteurs pour l'utilisation de l'espèce *Eucalyptus globulus* pour les traitements symptomatiques de la maladie d'Alzheimer.

Le pouvoir antimicrobien est toujours recherché chez les plantes pour lutter contre la propagation des maladies d'origine bactérienne, fongique et virale. Notre étude révèle une inhibition remarquable par nos extraits sur les bactéries *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, et sur le champignon *Fusarium oxysporum* f. *splycopersici*.

A travers les résultats obtenus, les extraits foliaires de la plante *Eucalyptus globulus* présentent des potentiels médicaux remarquables justifiant l'usage traditionnel de cette plante dans le traitement de certaines maladies (diarrhées, affections pulmonaires).

Ces résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes à l'avenir dont il serait nécessaire de:

- Séparer, isoler et identifier les composés phénoliques foliaires de cette espèce par l'utilisation des techniques chromatographiques.
- Étaler l'étude phytochimique sur d'autres parties de cette plante.
- Étendre cette étude à d'autres espèces du genre *Eucalyptus*.
- Étudier d'autres activités biologiques à savoir: les propriétés anti inflammatoires, antivirales et autres.
- Réaliser des combinaisons entre ces extraits et les antibiotiques et les tester sur des bactéries multi-résistantes.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques :

- Abd El Mohsen, J P., Minihane, MM., AM JC. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols : strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nur.* 99 :12-22.
- Aderogba, M.A., Ndhala, A.R., Van Staden, J., 2013. Acetylcholinesterase inhibitory activity and mutagenic effects of *Croton penduliflorus* leaf extract constituents. *S. Afr. J. Bot.*, 87, pp 48-51.
- Aït youssef M. (2006). *Eucalyptus globulus* L. In «Plante Médicinale de Kabylie», Ed.: Paris, pp: 126-130.
- Al-Zoreky N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum*L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134, pp: 244-248.
- Amakura Y.; Umino y.; Tsuji S.; Ito H.; Hatano T.; Yoshida T. and Tonogai Y. (2002). Constituents and their antioxidative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. *Food Chemistry*, 77, pp: 47-56.
- Amakura Y.; Yoshimura M.; Sugimoto N.; Yamazaki T. and Yoshida T. (2009). Marker constituents of the natural antioxidant Eucalyptus leaf extract for evaluation of food additives. *Bioscience, Biotechnologie, Biochemistry*.73, pp:1060-1065.
- Apak, R., Guclu , K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970–7981.
- Arias M. E.; Gomez J.D.; Cudmani N. M.; Vattuone M. A. and Isla M. I. (2004). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. *Life Sciences*, 75, pp: 191–202.
- Atoui A. K.; Mansouri A.; Boskou G. and Kefalas P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, pp: 27–36.
- Auddy B, Ferreira M., Blasina F., Lafon L., Arredondo F., Dajas F., Tripathi P.C., Seal T., Mukherjee B. (2003). Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology* 84 (2003) 131_/138

Références bibliographiques

- Ayad, R.(2008).recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce *zygophyllum cornutum*, Mémoire magister En Chimie Organique, université Mentouri Constantine. p 35-39, 40, 47.
- Baba Aïssa F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles: flore d'Algérie et du Maghreb. Plus de 800 plantes de la flore d'Algérie et du Maghreb, ainsi que des substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident.Ed.: Librairie Moderne –Rouiba,pp:101.
- Badiaga,M. (2011).Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.10 p.
- Balmey M. et Wilson G. (2000). Les guides du naturaliste .Toutes les fleurs de Méditerranée: les fleurs, les graminées, les arbres et arbustes, Ed.: Lausanne Paris, ISBN: 2-60-301179-0, pp: 151-152.
- Batish D. R.; Pal Singh H.; Kohli R. K. and Kaur S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide.Forest Ecology and Management, 256, pp: 2166–2174.
- BeaulieuJ.C., &Baldwin, E. A. (2002).Flavor and aroma of fresh-cut fruits andvegetables. Fresh-cut fruits and vegetables. Science, technology and market. CRCPress, Florida, 391-425.
- Belbache, H. (2003).Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de *CentaureaParvifloraDesf*, mémoire de magister en chimie organique, université Mentouri Constantine. p 16-20.
- Benaïssa,O. (2011).Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.
- Benayache F., 2005- Recherche et Détermination Structurale desMétabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (Fabaceae) : *G. saharae*,*G. ferox*. Thèse de Doctorat en chimie organiques. Université Mentouri Constantine. Algérie. 199 p.
- Bigendako J. M. (2004).Identification et zonage des *Eucalyptus globulus* au Rwanda. pp: 1-2.<http://pdf.usaid.gov>.
- Bisset W.J et Shaw N. H (1954) A comparison of D.C.P.A., T.C.P.A. and Arsenic for killing *Eucalypt* regrowth in subtropical native pastures. J. Aust. Inst. Agric. Sci., 20, 177-181.
- Blois M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable Free Radical. Nature, 4617 (181): 1119-1200.

Références bibliographiques

- Bouakaz, I., (2006). Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister, Batna.
- Boudjouref M., 2011- Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbes, Sétif. Algérie. 99 p.
- Boudy P (1952) Guide du forestier en Afrique, du Maroc, de Tunisie. Ed librairie agricole. Horticole forestier et Ménagère, Paris, 496p.
- Boullard B. (1997). Dictionnaire plantes et des champignons. Ed.: Editions ESTEM, ISBN:2909455998, pp: 309-310.
- BRAND-WILLIAMS W, CUVELIER ME, BERSET C., 1995 Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LebensmWissTechnology*. Vol. (28):25-30.
- Bruneton, J. (1993). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, 2ème Ed. Lavoisier, Paris.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 3ème Ed. Ed. médicales internationales and Tec & Doc Lavoisier, Paris.
- Bruneton, J. (1999). Tannins. In: Pharmacognosie, phytochimie, Plantes Cannas A. www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin/pos_effects.html - 6k.
- Buchanan, R. (2001) cours de métabolisme secondaire.
- Chaouche T. (2014). Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobienne des extraits de quelques plantes médicinales. Doctorat. Biochimie. Université Abou-Bakr-Benlkaid, Tlemcen. P 121.
- Chebli B; Achouri M; Idrissi Hassani L.M; And Hmamouchi M. (2003). Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. : fr, j. ethnopharmacol. 89: 165-169.
- Chevalier J.; Choisy C.; Crémieux A.; Darbord J.-C.; Davin-Régli A.; Dubreuil L.; Finance C.; Linxe C.; Quentin-Noury C.; Quero A.-M. et Reynaud A. (2003). Agents antimicrobiens, -antiviraux - Antibiotiques-. In « Microbiologie générale et santé », Ed.: Eska, ISBN: 2-7472-0420-0, pp: 278-321.
- Conde E.; Cadahia E. and García-Vallejo M. C. (1997). Low Molecular Weight polyphenols in leaves of *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. *Phytochemical Analysis*, 8, pp: 186-193.
- Cowan N. M., 1999- Plant products as anti microbial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 12(4): 564-582.

- Cyril T. (2001). Étude des métabolismes primaires et secondaires de racines transformées de *Catharanthus roseus*, vue du développement d'un modèle cinétique, université de Montréal. 28p.
- Daker M.; Abdullah N.; Vikineswary S.; Goh P. C. and Kuppusamy U. R. (2008). Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. As stabilizer of lipid-rich foods. *Food Chemistry*, 107, pp: 1092-1098.
- Dasgupta N. and De B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, 101, pp: 471-474.
- Dastmalchi K.; Damien Dorman H. J.; Oinonen P.P.; Darwis Y.; Laakso I. and Hiltunen R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT*, 41, pp: 391-400.
- De Billerbeck V-G (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytotherapie* (2007) 5: 249–253 © Springer 2007 DOI 10.1007/s10298-007-0265-z
- Dennis C and Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* III. Hyphal interaction. *Trans. Br. mycol. Soc.* 57 (3): 363-369.
- Dewick PM. (1995). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* p12, 579-607.
- Deysson G. (1979). *Systématique*. Tome II: Organisation et classification des plantes vasculaires. Ed.: Enseignement supérieurs, ISBN: 2-7181-3514-X, pp: 378-382.
- Djerroumi A. et Nacef M. (2004). Eucalyptus. In « *Plantes médicinales d'Algérie* », Ed.: Palais des livres, ISBN: 9961-749-25-1, pp: 75.
- Donatien K., 2008. Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes - extraction, Identification d'alkaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de Doctorat mention chimie organiques. Université Paul Verlaine de METZ –UPV- M. France. 150 p.
- Ebru Deveci, Gulsen Tel-Çayan, and Mehmet Emin Duru Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and anti-tyrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritis stricta* *International Journal Of Food Properties*. 2018, Vol. 21, No. 1, 771–783
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherston, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Erlund. (2004). *Nut. Res.* p24, 851-74.

Références bibliographiques

- Etienne, J., 2008. Observer l'acétylcholine en action pour mieux traiter Alzheimer, Futura-Sciences. <http://www.futura-sciences.com/magazines/sante/infos/actu/d/medecine-observer-acetylcholineaction-mieux-traiter-alzheimer-16357/> Site accédé le 15/07/2014
- Fisher K.; Philip C (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? Trends in Food Science & Technology 19 (2008) 156e164
- Fleuriet, A. (1982). Thèse Doc. Etat, Montpellier.
- Forrest M. and Moore T. (2008). Eucalyptus gunnii: A possible source of bioenergy?. Biomass and Bioenergy, 32, pp:978–980.
- Ghedira K.; Goetz P. et Le Jeune R. (2008). Eucalyptus globulus Labill. Phytothérapie, pp:197-200.
- Giordano E (1968) Osservazioni sull'apparato radicale dell'Eucalyptus globulus Labill. Publ. del Centro di Sperimentazione Agricola e Forestale. X, 2 : 135-148.
- Goetz P. (2007). Phytothérapie du diabète. Phytothérapie, 5, pp: 212-217.
- González A.G., Barrera J.B., García T.Z., Rosas F.E., 1984-Sesquiterpene lactones from *Centaurea* species. *Phytochemistry*. Vol. 23(9):2071–2072.
- Gorham J., 1977- Lunularic acid and related compounds in liverworts, algManallah, A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.
- Graebe J.E., 1987- Gibberellin biosynthesis and control. *Annu. Ruv. Plantphysiol*. Vol. (38): 419-465.
- Grossberg, G.T., 2003. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. *Curr. Ther. Res.*, 64, pp 216-235.
- Guignard JL., 1996- Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris. France. 274 p.
- Gutiérrez M. E.; Garcia A. F.; de Madariaga M. A.; Sagrista M. L.; Casado F. J. and Mora M. (2003). Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Science*, 72, pp: 2337-2360.
- Hale A.L., Reddivari L., Ndambe Nzaramba M., Bamberg J.B., Creighton Miller J. (2008) Interspecific Variability for Antioxidant Activity and Phenolic Content Among *Solanum* Species. *Jr Am. J. Pot Res* 85:332–341 DOI 10.1007/s12230-008-9035-1

Références bibliographiques

- Handa S.S., 2008- An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. (Eds) Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. International Centre For Science and High Technology, Trieste. Italy. Pp 21-54.
- Hanson J. R., 2003- Natural products : the secondary metabolites. Ed. Royaume-Uni : Royal society of chemistry, Italy. 137 p.
- Harborne JB, 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Third Edition.. Paris M, Hurabielle M, 1981. Abrégé de matière médicale- Pharmacognosie. Tome 1. Edition Masson, Paris. p.182.
- Haslam E. (1994). Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. Nat. Prod. p11, 41-66.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol. Therapeut. p96, 67– 202.
- Hernandez-Ochoa L.R., 2005- Substitution de solvants et matières actives de synthèse par combiné (solvant/actif) d'origine végétale. Thèse de Doctorat. Institut national polytechniques, Toulouse. France. 255p.
- Herzi, N. (2013). Extraction et purification de substances naturelles: comparaison de l'extraction au CO₂-supercritique et des techniques conventionnelles (Doctoral dissertation, INPT).
- Hess M., 2002- Alkaloids, Nature's Curse or Blessing 1ère édition. Ed. Wiley-VCH, New York. USA. 297 p.
- Hostettmann K., 1992- Les plantes sources de médicaments phlébotropes, la lettre de la phlébologie. Ed. Zyma SA, Nyon. Switzerland. 25p.
- Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors of plant and fungi. Nat. Prod. Rep., 23, pp 181-199.
- Houlst J. R. S., Paya M., 1996- Pharmacological and Biochemical actions of simple coumarine: Natural Products with Therapeutic potential. Gen Pharmacol. Vol (27): 711-722.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. J. Ethnopharmacol., 89, pp 261-264.
- Jacob M.R (1955) Growth habits of the eucalyptus. Ed. by Forest and Timber Bureau. Dept of the Interior. Canberra. Australia.

- Jacovelli A. P. (2002). Cultivation and production of eucalypts in Africa With special reference to the leaf oils. In «Eucalyptus The Genus Eucalyptus», Ed.: Taylor and Francis, ISBN: 041527879-1.
- Judd W.; Campbell C.; Kellog E. et Stevens P. (2002). Botanique systématique-Une perspective phylogénétique. ISBN: 2-7445-0123-9, pp: 321-323.
- Kabera, J. N., Semana E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- Kablan B. J.; Adiko M. et Abrogoua (2008). Evaluation in vitro de l'activité antimicrobienne de *Kalanchoe crenata* et de *Manotes longiflora* utilisées dans les ophtalmies en Côte d'Ivoire. *Phytothérapie*, 6, pp: 282-288
- Karou D.; Dicko M. H.; Simpore J. and Traore A. (2005). Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4, pp: 823-828.
- Khenaka, K. (2011). Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovine, Diplôme de Magister En Microbiologie Appliquée, Université Mentouri Constantine. p19, 24.
- Kim J.-P.; Lee I.-K.; Yun B.-S.; Chung S.-H.; Shim G.-S.; Koshino H. and Yoo I.-D. (2001). Ellagic acid rhamnosides from the stem bark of *Eucalyptus globulus*. *Phytochemistry*, 57, pp: 587-591.
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p. 17p
- Ksouri R.; Falleh H.; Megdiche W.; Trabelsi N.; Mhamdi B.; Chaieb K.; Bakrouf A.; Magné C. and Abdelly C. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of edible medicinal Halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 47, pp: 2083-2091.
- Leybros J, Fremaux P., 1990- Extraction solide-liquide aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur, Génie des procédés*. Vol. (2J2780):J2780.1-J2780.22.
- Litvak M.E., Monson R.K., 1998- Patterns of induced and constitutive monoterpene production in conifer needles in relation to insect herbivory. *Oecologia*. Vol. (114): 531-540.
- Lopez S., Bastida J., Viladomat F., Codina C. 2002. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci.*, 71, pp 2521-2529.

- Lovegrove, J. A., Stainer, A., & Hobbs, D. A. (2017). Role of flavonoids and nitrates in cardiovascular health. *Proceedings of the Nutrition Society*, 13.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-Manchado P., 2006- Les Polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp:1-28.
- Maelicke, A., Samochocki, M., Jostock, R., Fehrenbacher, A., Ludwig, J., Albuquerque, E. X., Zerlin, M., 2001. Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiat.*, 49, pp 279-288.
- Maisuthisakul P.; Suttajit M. and Pongsawatmanit R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chemistry*, 100, pp: 1409-1418.
- Manallah, A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, Option : Biochimie Appliquée. Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire *ae and hydrangea*. *Phytochemistry*. Vol. (16):249-253.
- Martin, S., Andriantsitohaina, R. (2002). Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des polyphénols au niveau de l'endothélium. *Annales de cardiologie et d'angéiologie*. p51, 304–315.
- Mauro, N. M. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.
- Mayer A.M., 2004- Resistance to herbivores and fungal pathogens: Variations on a common theme? A review comparing the effect of secondary metabolites, induced and constitutive, on herbivores and fungal pathogens. *Israel Journal Of Plant Sciences*. Vol. (52): 279-292.
- Mekelleche Hassiba. 2015. Contribution à l'étude morphométrique d'*Eucalyptus globulus* Labill. (Myrtacées) dans la région de Tlemcen. Master. Ecologie végétale et Environnement. Université ABOUBAKER BELKAID-Tlemcen. P 13.
- Meyer A.; Deiana J. et Leelere H. (1999). Agents chimiothérapeutiques. In « Cours de microbiologie générale », Ed.: Doin Paris, ISBN 2-70-40-0745-4, pp: 220-236.
- Michael W. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. p3–19.

- Muanda, F. N. (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activitéantioxydante et étude de leurs propriétés biologiques (Doctoral dissertation, Thèse de Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, 55-86
- Murry R. D. H., Mendez J., Brown S. A., 1982- the naturalcoumarinsOccurrence Chemistry and Biochemistry. Ed. Chichester John Wiley and Sons,UK. New York. England. 702 p.
- Nacoulma AP., 2012- Reprogrammation métabolique induite dans lestissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par *Rhodococcus fascians*:aspects fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat enSciences Pharmaceutiques. Université Libre de Bruxelles Europe. Belgique. 92p.118
- Naczka, M., SHAHIDI, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A. p1054, 95–111.
- Nag, G., De, B., 2011. Acetylcholinesterase inhibitory activity of Terminalia chebula, Terminalia bellerica and Emblica officinalis and some phenolic compounds. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., 3, pp 121-124.
- Newman D.J., CRAAGG G.M., 2012 – Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. Vol. (75): 311-335.
- of Food Microbiology, 56(1): 3-12.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307–315.
- Ozenda P. (1982). Organisation et reproduction des angiospermes. In «Précis de botanique», Tome II: Végétaux supérieurs, Ed.: Masson, Paris, ISBN: 2-225-65483-2, pp:342-344.
- Pandey KB et Rizvi SI., 2009- Plant polyphenols as dietary antioxidants inhuman health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol. 2(5) : 270 – 278.
- Paris M., HURABIELLE., 1981- Abrégé de matière médicale.Pharmacognosie. Tome 1. .Ed. Masson, Paris. France. 339 p.
- Peeking A., PICAND B., HACENE K., LOKIEC F., GUERIN P., 1987-Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. Publications médicales AGCF. Vol. (6): 512-513.
- Perret C., 2001- Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydaseproduite par *Botrytis cinerea*. Thèse de Doctorat .Université de Neuchâtel.Suisse. 184 p.

Références bibliographiques

- Pire, Myriam(2011).Caoutchouc Naturel Epoxydé et Réticulation par les Acides Dicarboxyliques : Chimie, Cinétique et Propriétés Mécaniques. Thèse De Doctorat De L'université Pierre Et Marie Curie. 217 p.
- Poletti A. (1982). Plantes médicinales. In « Fleurs et plantes médicinales » .Edition : Delachaux et Niestlé, pp: 192-196.
- Privas E., 2013- Matériaux ligno-cellulosiques «Élaboration etCaractérisation laboration ». Thèse de Doctorat en Science et génie desmatériaux, L'École Nationale Supérieure des Mines, Paris. France. 166 p.
- Rakotonanahary, M. (2012).thèse présentée pour l'obtention du titre de docteur en pharmacie diplôme d'état, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.
- Rauha J-P, Remes S, Heinonen M, Hopia A,Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H,Vuorela P, 2000. Antimicrobialeffects ofFinnish plant extractscontainingflavonoids andotherphenoliccompounds. International Journal
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999.Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cationdecolorizationassay. Free Radical Bio. Med. 26, 1231–1237.
- Resat A. (2008). Mecanism of antioxydant capacityassays and the CUPRAC (cupric ion reducingantioxydantcapacity) assay.Department of Chemistry, Faculty of Engineering, Istanbul University, Istanbul, Turkey. Vol 160. Numéro 4. Pp 413-419.
- Rufini L., Sampaolo G., 1977- Plants Off. Aromi. Saponi., Cosmétol.Aerosol. Vol. (59) :9-75.
- Scalbert A.,Williamson G., 2000- Dietaryintake and bioavailabilityof polyphenols. *Journal of Nutrition*. Vol. (130): 2073-2085.
- Schauenbeg P. et Paris F. (1977). Guide des plantes médicinales Analyse, description et utilisation de 400 plantes. ISBN: 2-603-00001-2, pp: 330.
- Shama Hmiri, Mohamed Rahouti, Zakaria Habib, Badr Satrani, Mohamed Ghanmi & Mustapha El Ajjouri, «Évaluation du potentiel antifongique des huiles essentielles de *Mentha pulegium* et d'*Eucalyptus camaldulensis* dans la lutte biologique contre les champignons responsables de la détérioration des pommes en conservation», *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège* [En ligne], Volume 80 - Année 2011, 824 - 836 URL : <https://popups.uliege.be:443/0037-9565/index.php?id=3375>.
- Shi H, Noguchi N, Niki E. Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *MethodsEnzymol* 2001;335:157-66.

Références bibliographiques

- Singh N., Luthra R., Sangwan R.S., Thakur R.S., 1989-Metabolism of monoterpenoids in aromatics plants. *Curr. res. Med. Arom.Plants*. Vol. (11): 174-197.
- Singleton V.L and Rossi J.A.J. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16:144-58.
- Müller L., Gnoyke S., Popken A.M., V. Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT - Food Science and Technology*, 43: 992-999.
- Slimani Sakina.2010. Activité antioxydante et antibactérienne des extraits phénoliques d'une plante médicinale *Eucalyptus globulus*. Magister. Sciences Alimentaires. Université Abderrahmane Mira- Bejaïa. p 39.
- Spichiger R.-E.; Savolainen V.V.; Figeat M.et Jeanmonod D. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs. Une approche phylogénétique nouvelles des Angiospermes des régions tempérées et tropicales. ISBN: 2-88074-502-0, pp: 288.
- Sramek, J.J., Frackiewicz, E.J., Cutler, N.R., 2000. Review of the acetylcholinesterase inhibitor galanthamine. *Expert Opin. Inv. Drug.*, 9, pp 2393-2402.
- Taiz, Lincoln et Eduardo Zeiger, Secondary métabolites and Plant Defense in : *Plant Physiology*, Fourth Edition, Sinauer Associates, 2006, ch. 13.
- Takahashi T.; Kokubo R. and Sakaino M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extract and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in Applied Microbiology*, 39, pp: 60-64.
- Topçu G., Ay A., Bilici A., Sarıkürkcü C., Öztürk M., and Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistaciaterebinthus*. *Food Chemistry* 103: 816-822
- Treiner J (2000) Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France. 39-143.
- Urbain, A., 2007. Isolement de xanthones et coumarines inhibitrices de l'acétylcholinestérase, respectivement à partir de *Gentianella campestris* (L.) Börner et *Gentianella amarella* (L.) Börner ssp. *acuta* (Michx.) J.M.Gillett (Gentianaceae), et *Peucedanum ostruthium* (L.) Koch (Apiaceae). Thèse de doctorat à la Faculté des sciences de l'Université de Genève, p 29.
- Vankar P. S.; Tiwari V. and Srivastava J. (2006). Extracts of stem bark of *Eucalyptus globules* as food dye with antioxidant properties. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 5, pp: 1664-1668.
- Verpoorte R., Alfermann A.W., 2000- *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Ed. Kluwer Academic, Dordrecht. Netherlands. 286 p.

Références bibliographiques

- Vilela G. R; Almeida G. S; Regitano D'arce M. A. B; Moraes M. H.D; Brito J. O; Da Silva M. F. G.F; Silva S.C; Piedade S.M.S; Calori-Domingues M. A; And Gloria E. M. (2009). Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* against the storage fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Prod. res.* 45:108-111.
- Villaño D.; Fernández-Pachón M.S.; Moyá M. L.; Troncoso A. M. and García-Parrilla M.C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71, pp: 230-235.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sharma, J. (2001). High Performance liquid chromatography in phytochemical science. *Chromatographic Science Series*, 477-478.
- Waksmundzka-Hajnos, M., Sharma, Kowalcka., T. (2008). This layer chromatography in phytochemistry. Vol. 99. USA : CRC Press. 896p.
- Warot S. (2006). Les Eucalyptus utilisés en Aromathérapie. Préparatrice en pharmacie. Mémoire de fin de formation en Phyto-aromathérapie. p3
- Wichtl M. et Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Ed.: 2^{ème} TEC& DOC, ISBN: 2-7430-0631-5, pp: 200-201.
- Wink M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. Vol. (64): 3-19.
- Woodruff-Pak, D.S., Vogel, R.W., Wenk, G.L., 2001. Galantamine: effect on nicotinic receptor binding, acetylcholinesterase inhibition, and learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (4), pp 2089- 2094.
- Xian, X., Jianguo, C., Yunxia, Z., Quanxi, W., Jianbo, X., 2014. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. *Ind. Crop. Prod.*, 58, pp 91-98.
- Yanishlieva-Maslarova N. V. (2001). Inhibiting oxidation- Antioxidants and food stability-. In « Antioxidants in food », Ed.: Woodhead Publishing Ltd, ISBN 0-8493-1222-1, pp: 22-57.
- Yezza S. et Bouchama S. (2014). Index des métabolisme secondaire végétaux. Licence. Biochimie fondamentale et appliquée. Université Kasdi Merbah. Ouargla. P : 47.
- Yusuf, Y. (2006). *Trends Food Sci. Tech.* p17, 64-71.
- Zampini I. C.; Vattuone M. A. and Isla M. I. (2005). Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, pp: 450-456.

Références bibliographiques

- Ziegler J., Facchini P.J., 2008- Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* Vol (59): 735 – 769.

INTITULÉ : Contribution à l'étude de l'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-enzymatique des extraits foliaires de l'espèce :***Eucalyptus globulus* Labill.**Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en :
Biologie et physiologie végétale**Résumé :**

L'espèce *Eucalyptus globulus* Labill. possède d'importantes propriétés médicinales. C'est une plante aromatique riche en métabolites secondaires, de ce fait notre étude s'intéresse à l'évaluation des effets antioxydants, anti-enzymatiques et antimicrobiens de ses extraits foliaires.

Les polyphénols totaux et les flavonoïdes ont été dosés et estimés à des taux considérables dans les différents extraits alcooliques des feuilles.

L'activité antioxydante des extraits a été estimée par l'utilisation des méthodes DPPH, ABTS, Reducing power, CUPRAC et GOR. Les résultats ont montré une très importante inhibition des radicaux libres avec des valeurs significatives très proches à celles des standards.

L'activité anti Alzheimer a été testée par l'évaluation du pouvoir anti enzymatique contre l'acétylcholinestérase (AChE). L'extrait acétate exerce une activité anti- AChE très importante avec une IC_{50} de $(6,48 \pm 0,02 \mu\text{g/ml})$ presque équivalente à celle du standard Galantamine $(6.27 \pm 1.15 \mu\text{g/ml})$. Ce résultat confirme encore le rôle des polyphénols dans l'activité anticholinestérase.

On ce qui concerne l'activité biologique, on a testé le pouvoir antibactérien de nos extraits vis-à-vis deux souches, *Staphylococcus aureus* et *E. coli*. Les résultats ont révélé une inhibition très forte par les trois extraits. L'activité antifongique a été également testé vis-à-vis l'espèce *Fusarium oxysporum*. Les résultats ont révélé que ce champignon a montré une faible sensibilité à différentes concentrations de nos extraits.

Mots clés : *Eucalyptus globulus* Labill. - Polyphénols- Activité antioxydante- Acétylcholinestérase-
Activité antibactérienne- Activité antifongique.**Laboratoire de recherche : Laboratoires du CRBt**
(Qualité-Analyse, Biochimie, Bactériologie, Mycologie)**Jury d'évaluation :**

Président du jury :	Mme BAAZIZ BOUCHIBI Nacira	(M.C.B- UFM Constantine 1)
Rapporteur :	Mme BOUCHOUKH Imane	(M.A.A- UFM Constantine 1),
Examineur :	Mme AOUALDJIA Naouel	(M.C.B- UFM Constantine 1).

Date de soutenance : 26 /06/2019