République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira - Bejaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Alimentaires

Laboratoire de **B**iomathématiques, **B**iochimie, **B**iophysique et de **S**cientométrie

L3BS

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Magister

En Sciences Alimentaires

Option : Contrôle de **Q**ualité des **A**liments, **C**ertification et **M**éthodes de **V**alidation

Thème

Activité antioxydante et antibactérienne des extraits phénoliques d'une plante médicinale Eucalyptus globulus

Préparé par : Melle Slimani Sakina

Membres du jury :

Président: Mr Chibane M.	Professeur à l'UAMB.
Examinateurs: Mr Moali A.	Professeur à l'UAMB.
Mr Kaci Y.	Maître de conférences A à l'USTHB.
Directeur: Mr Madani K.	Maître de conférences A à l'UAMB.
Invitée: Mme Boulekbache-Makhlouf L.	Maître assistante A à l'UAMB.

Année : 2009 -2010

Remerciements

Je tiens à exprimer mes remerciements au « Bon Dieu » pour la patience et la santé qui m'ont été utiles tout au long de mon parcours, et j'adresse mes plus sincères remerciements aux êtres les plus chers au monde « Mes Parents » pour tous leurs efforts et sacrifices. Je les remercie pour l'éducation qu'ils m'ont prodiguée, pour leur présence permanente, leur disponibilité, leur confiance et leur soutien en toutes circonstances. Mes remerciements, s'adressent également à mes très chers frères et ma sœur adorée qui ont su me soutenir.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur le Docteur MADANI K., d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, de m'avoir ouvert les portes de son équipe et de me guider durant mes années de thèse. Ce travail témoigne de sa confiance et de son soutien dans les moments les plus difficiles. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie également Madame BOULEKBACHE L., ma co-promotrice pour ses efforts, sa disponibilité, ses conseils fréquents et avisés, son aide ainsi que son soutien. Je la remercie également pour la qualité de son encadrement, son esprit de synthèse et son érudition restent pour moi un exemple à suivre. J'éprouve un respect profond pour son travail et ses qualités humaines. Soyez rassurée, Madame, de ma sincère gratitude.

Je remercie Monsieur le Professeur CHIBANE M. qui me fait l'honneur de présider ce jury. Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux Professeurs: Monsieur MOALI A. et Monsieur KACI Y. qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

Je tiens à remercier les enseignants Monsieur BEKDOUCHE, Monsieur IGUEROUADA et Monsieur BACHIR BEY, qui nous ont fait profiter de leurs conseils plus qu'indispensables en statistiques.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Madame OUKIL et Madame BOUALI de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires.

Je remercie également Mme IDRES, Mme YAHIYAOUI, Melle LOUNES, Mr LADJOUZI , Mme MERZOUK, Mr ZAIDI, Mr BOUKHALFA, Mr BOUDERIAS et tous les enseignants pour leurs aides et conseils.

Mes remerciements vont s'adresser également à tous les techniciens des différents laboratoires, tout le personnel de la faculté des sciences de la nature et de la vie et le personnel de la bibliothèque universitaire.

Je saisie cette occasion pour remercier Monsieur le Docteur MOUALEK et tout le personnel de son laboratoire. Je tiens également à remercier tout le personnel du Parc National de Gouraya, Monsieur HAMADI, Monsieur BOULEKBACHE pour leur aide et leur disponibilité.

Une grande pensée pour tous mes amis (es) qui m'ont soutenue au cours de ces années.

Enfin, je remercie toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Que Dieu vous bénisse.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents, à toute ma famille et à toute personne qui, un jour, consultera ce document.

Liste des abréviations

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique.

BHA: Butyl Hydroxy Anisol.

CI_{50}: Concentration à 50 % d'inhibition.

CLHP: Chromatographie Liquide à Haute Performance.

CMB: Concentration Minimale Bactéricide.

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.

DPPH: 2,2-DiPhényl-1-Picryl Hydrazyle.

DZI: Diamètre de Zone d'Inhibition

EAG: Equivalant Acide Gallique.

EAT: Equivalent Acide Tannique.

EB: Extrait Brut.

EQ: Equivalent Quercétine.

ERO: Espèce Réactive de l'Oxygène.

FAD : Flavine Adénosine Dinucléotide.

FADH: Flavine Adénosine Dinucléotide, forme réduite.

GPx: Glutathion peroxydase.

GHS: Glutathion réduit.

GSSG: Glutathion oxydé.

NADP: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate.

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, forme réduite.

$NO^{\bullet}$: Monoxyde d'azote.

$CR_{0,5}$: Capacité réductrice correspondante à une absorbance 0,5 à 700 nm.

SOD: Superoxyde dismutase.

$TRX\text{-}(SH)_2$: Thioredoxine réduite.

Trx-SS: Thioredoxine oxydée.

UFC: Unité Formant Colonie.

Liste des tableaux

Tableau I: Effets thérapeutiques des huiles essentielles de certaines espèces de la famille des Myrtacées. 34

Tableau II: Noms vernaculaires de *E. globulus* 36

Tableau III: Composés identifiés des différentes parties de *E.globulus* 39

Tableau IV: Quelques usages traditionnels de *E. globulus.* 41

Tableau V: Taux d'humidité des différentes parties de *E. globulus* 60

Tableau VI: Taux d'extraction des polyphénols des différentes parties de *E. globulus* 62

Tableau VII: Les $CR_{0,5}$ du pouvoir réducteur des différents extraits et des standards 74

Tableau VIII: Les CI_{50} du pouvoir antiradicalaire des différents extraits et des standards….79

Tableau IX: Effets des différents extraits bruts sur *S. aureus.*…..... ……88

Tableau X: Effets des différents extraits bruts sur *B. subtilis.*… 89

Tableau XI: Effets des acides phénoliques sur *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *S. aureus* 93

Tableau XII: Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits et des composés phénoliques purs. 94

Liste des Figures

Figure 1: Principales sources des radicaux libres dans la cellule 5

Figure 2: Schéma représentant les éléments de la chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne 6

Figure 3: Production de $NO^{\bullet}$ à partir de la L-arginine 8

Figure 4: Produit de l'oxydation de la base de l'ADN, la guanine 10

Figure 5: Défenses cellulaires contre le stress oxydant 12

Figure 6: Structure du β-carotène (carotènes) et de la lutéine (xanthophylles) 15

Figure 7: Structure chimique de l'α –tocophérol 16

Figure 8: Structure chimique de la vitamine C 16

Figure 9: Structure d'une unité isoprène 17

Figure 10 : Structure des acides phénoliques 20

Figure 11: Structure de base des flavonoïdes 21

Figure 12: Structures de base des principaux flavonoïdes 22

Figure13: Structures chimiques des tannins 24

Figure 14: Les monomères constitutifs des lignines 25

Figure 15: Les groupes fonctionnels des flavonoïdes à haute capacité antioxydante 28

Figure 16: *Eucalyptus globulus* 38

Figure 17: Structures de quelques composés identifiés des feuilles de *E. globulus* 40

Figure 18: Photographies du matériel végétal. 42

Figure 19: Protocole d'extraction des polyphénols 45

Figure 20: Schéma du fractionnement des extraits bruts par chromatographie sur colonne....47

Figure 21: Protocole de dosage des composés phénoliques totaux 48

Figure 22: Procédure de dosage des flavonoïdes totaux 49

Figure 23: Procédure de dosage des flavonols 50

Figure 24: Procédure du dosage des tannins 51

Figure 25: Protocole de détermination du pouvoir réducteur 53

Figure 26: Protocole d'étude de l'activité antiradicalaire 54

Figure 27: Protocole d'évaluation de l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène 55

Figure 28: Teneur des différents extraits en polyphénols totaux 64

Figure 29: Chélation de l'ion aluminium par les flavonoïdes 66

Figure 30: Teneur des différents extraits bruts en flavonoïdes totaux et en flavonols. 67

Figure 31: Teneur des différents extraits en tannins 69

Figure 32: Pouvoir réducteur des extraits bruts, des feuilles et des standards 71

Figure 33: Pouvoir réducteur des extraits de l'écorce, des fruits et des standards..... 72

Figure 34: Activité antiradicalaire des extraits bruts, des feuilles et des standards. 76

Figure 35: Activité antiradicalaire des extraits de l'écorce, des fruits et des standards…..... 77

Figure 36: Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène des extraits bruts, des feuilles et des standards 81

Figure 37: Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène des extraits d'écorce, des fruits et des standards 82

Liste des abréviations
Liste des tableaux
Liste des figures

Sommaire

Introduction..... 1

Synthèse bibliographique

I. Les radicaux libres, le stress oxydant et la défense antioxydante

I.1. Les radicaux libres 4

I.1.1.Formation des espèces réactives de l'oxygène 5

I. 2. Le stress oxydant 8

I. 2. 1. Les conséquences du stress oxydant 8

I. 2. 1. 1. Les conséquences biochimiques 9

I. 2. 1. 2. Les conséquences biologiques 11

I. 3. La défense antioxydante contre les ERO 11

I. 3. 1. La défense endogène 12

I. 3. 2. La défense exogène 14

II-Les composés phénoliques

II. 1. Les terpènoïdes 17

II. 2. Les alcaloïdes 17

II. 3. Les composés phénoliques 18

II. 3. 1. La biosynthèse 18

II. 3. 2. Les différentes classes de polyphénols 19
II. 3. 2. 1. Acides phénoliques 19
II. 3. 2 .2. Flavonoïdes 21
II. 3. 2. 3. Tannins 23
II. 3. 2. 4. Lignines 24
II. 3. 3. Activités biologiques des composés phénoliques 26
II. 3. 3. 1. Activité antioxydante 26
II. 3. 3. 2. Activité antibactérienne 29

III. Les Plantes médicinales-Eucalyptus globulus

III. 1. Les Myrtacées et l'espèce *Eucalyptus globulus* 32
III. 1. 1. La famille des Myrtacées 32
III. 1. 1. 1. Description botanique 32
III. 1. 1. 2. Distribution géographique 32
III. 1. 1. 3. Genres principaux 33
III. 1. 1. 4. Intérêts de certaines espèces de Myrtacées 33
III. 1. 2. Le genre *Eucalyptus* 34
III. 1. 2. 1. Origine et définition 34
III. 1. 2. 2. Description botanique 35
III. 1. 2. 3. Distribution géographique 35
III. 1. 2. 4. Historique des eucalyptus en Algérie 35
III. 1. 3. L'espèce *Eucalyptus globulus* 36
III. 1. 3. 1. Classification 36
III. 1. 3. 2. Noms vernaculaires 36
III. 1. 3. 3. Description botanique 37
III. 1. 3. 4. Composition chimique 38
III. 1. 3. 5. Usages traditionnels de *E. globulus* 40

Partie pratique

IV. Matériels et méthodes

IV. 1. Matériel végétal 42
IV. 2. Détermination du taux d'humidité 43
IV. 3. Extraction des composés phénoliques 43
IV. 4. Fractionnement des extraits bruts par chromatographie sur colonne 46
IV. 5. Dosage des composés phénoliques 48
IV. 5. 1. Dosage des composés phénoliques totaux 48
IV. 5. 2. Dosage des flavonoïdes totaux 49
IV. 5. 2.1. Dosage des flavonols 50
IV. 5. 3. Dosage des tannins 51
IV. 6. Evaluation des activités biologiques des différents extraits 52
IV. 6. 1. Activité antioxydante 52
IV. 6. 1. 1. Pouvoir réducteur 52
IV. 6. 1. 2. Effet scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$ 54
IV. 6. 1. 3. Activité réductrice du peroxyde d'hydrogène 55
IV. 6. 2. Activité antibactérienne 56
IV. 6. 2. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits 57
IV. 6. 2. 2.Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide..58
IV. 6. 2. 3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB) 58
IV. 7. Analyse statistique 59

V. Résultats et discussions

V. 1. Taux d'humidité des différents échantillons 60
V. 2. Extraction des polyphénols 61
V. 3. Taux d'extraction 62
V. 4. Résultats du fractionnement des extraits bruts par chromatographie sur colonne 62
V. 5. Teneurs en composés phénoliques des différents extraits 63
V. 5. 1. Teneurs des différents extraits en polyphénols totaux 63
V. 5. 2. Teneurs en flavonoïdes totaux et en flavonols des différents extraits bruts..... 66
V. 5. 3. Teneurs en tannins des différents extraits 68
V. 6. Activités biologiques des différents extraits 70
V. 6. 1. Activité antioxydante 70
V. 6. 1. 1. Pouvoir réducteur 70
V. 6. 1. 2. Activité antiradicalaire des extraits ……75
V. 6. 1. 3. Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène 80
V. 6. 1. 4. Corrélations entre les polyphénols et l'activité antioxydante 85
V.6.2 Activité anti bactérienne 85
V. 6. 2. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques) 87
V. 6. 2. 2. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts 87
V. 6. 2. 2. 2. Activité antibactérienne des acides gallique et tannique 92
V.6. 2. 2 .Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides 94

Conclusion et perspectives..... 98

Références bibliographiques

Glossaire

Annexes

Introduction

Le corps humain produit des espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que: l'anion superoxyde, le radical hydroxyle et le peroxyde d'hydrogène, par plusieurs systèmes enzymatiques à partir de l'oxygène consommé (Wong *et al*., 2006). A des concentrations modérées, ces espèces sont connues par leurs rôles physiologiques variés allant de la transduction du signal cellulaire à la défense contre les pathogènes (Dastmalchi *et al*., 2008). Cependant, au cours du stress oxydant, des quantités importantes des ERO peuvent être dangereuses, elles réagissent avec de nombreuses molécules telles que les protéines et les lipides (Lee *et al.*, 2007) ce qui conduit à l'apparition de diverses maladies chroniques telles que: le cancer, les inflammations, l'athérosclérose…etc (Biglari *et al*., 2008).

Les cellules peuvent réduire l'impact des ERO par des systèmes endogènes comme les enzymes (catalase, superoxyde dismutase) et par des systèmes exogènes non enzymatiques tels que : la vitamine C, l' α-tocophérol (Lee *et al*., 2007) et les polyphenols (Wang *et al*., 2007).

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).

Le *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 youssef, 2006). En Algérie, le *Eucalyptus* occupe une surface de 39.000 ha en 1995 (Jacovelli, 2002) et l'espèce *E. globulus* est l'une des éspèces 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 *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 de *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). Plusieurs publications ont rapporté que l'écorce contient différentes classes de polyphénols en particulier des tannins (Cruz *et al*., 2005; González *et al.*2004; Kim *et al*., 2001; Vázquez *et al*., 2008), ainsi ses extraits inhibent la peroxydation lipidique (González *et al*., 2004) et exercent des effets antibactériens (Cruz *et al*., 2001). Toutefois, et à nos jours aucun travail n'a été publié sur la quantification des composés phénoliques et sur l'activité antioxydante des fruits de cette plante.

En Algérie, aucune donnée n'a été rapportée sur l'étude des polyphénols de *E. globulus*, d'où l'intérêt de mener une étude de ce contexte. Le présent travail est réservé donc, à l'étude des composés phénoliques et de deux activités biologique (antioxydante et antibactérienne) des extraits des différentes parties (feuilles, écorce et fruits) de *E. globulus* de la région de Derguinah wilaya de Béjaia.

Le but de cette étude consiste non seulement à renforcer les données phytochimiques, antioxydantes et antibactériennes des extraits phénoliques de l'écorce et des feuilles *de E. globulus*, mais aussi à mettre en évidence pour la première fois, l'activité antioxydante et antibactérienne de l'extrait de ses fruits en vue de leur utilisation ultérieure dans les différentes industries.

Ce document est divisé en deux parties :

- ✓ La première partie est une synthèse bibliographique relative aux radicaux libres, stress oxydant, et les systèmes antioxydants (endogénes et exogènes), les composés phénoliques et aux données bibliographiques liées à la plante *E. globulus* qui a fait l'objet de la présente étude.
- ✓ La deuxième partie concerne l'étude expérimentale, en premier lieu, la description des différentes étapes suivies au cours de cette étude: la récolte des échantillons et l'extraction des polyphénols, suivie du fractionnement des extraits bruts sur le gel de Sephadex LH-20 et le dosage de différentes classes de polyphénols. En second lieu, l'évaluation par trois méthodes l'activité antioxydante des extraits bruts et leurs fractions chromatographiques et en dernier lieu l'étude de l'activité antibactérienne des extraits bruts.

Synthèse bibliographique

I. Les radicaux libres, le stress oxydant et la défense antioxydante

I. 1. Les radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron, soit au cours d'une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (Koechlin-Ramonatxo, 2006; Leverve, 2006). Cet état leur confère une très grande réactivité afin de revenir à l'état stable soit en donnant un électron ou en prenant un électron d'une autre molécule (Koechlin-Ramonatxo, 2006). En jouant le rôle d'accepteur ou donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs envers d'autres molécules et possédant un temps de demi-vie de la nano- à la milliseconde (Houée-Levin *et al*., 2005; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Dans l'organisme l'oxygène est à l'origine des différents radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006), l'ensemble de ces radicaux et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Favier, 2003). Les ERO peuvent être des radicaux de l'oxygène, de l'azote ou des espèces non radicalaires qui peuvent être facilement oxydées ou converties aux radicaux libres (Aron and Kennedy, 2008). Les ERO sont des produits inévitables de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme et leur production est permanente (Koechlin-Ramonatxo, 2006). En effet, les ERO participent à de nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme telles que la phagocytose, l'amélioration de la fixation du glucose par les cellules musculaires et la reconstitution des stocks en glycogène musculaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les radicaux libres les plus courants sont: l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$), l'hydroxyle ($OH^{\bullet}$), l'alkoxyle ($RO^{\bullet}$), le peroxyde ($ROO^{\bullet}$), le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) et les espèces non radicalaires qui incluent: le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet ($^1O_2$) et le peroxynitrite ($ONOO^-$) (Aron and Kennedy, 2008; Baudin, 2006).

I. 1. 1. Formation des espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites d'une manière continue dans l'organisme, la figure ci-dessous résume les principales sources des radicaux libres dans la cellule.

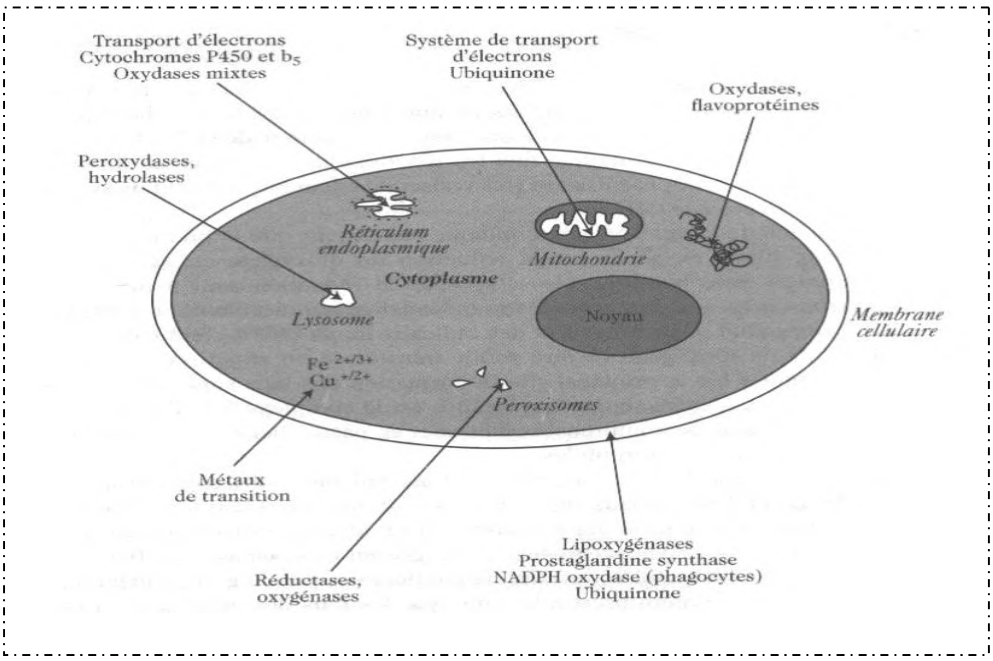


Figure 1: Principales sources des radicaux libres dans la cellule (Houée-Levin *et al*., 2005).

Les principaux radicaux libres dérivés de l'oxygène sont les suivants :

❖ **L'anion superoxyde**

L'oxygène consommé par la mitochondrie est réduit de façon tétravalente (addition de quatre électrons) en deux molécules d'eau par le cytochrome oxydase (1), et participe à la production d'énergie par l'intermédiaire d'une série de transporteurs d'électrons appelés communément la chaîne de transport d'électrons (Figure 2) (Karp, 1998; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

$$O_2 + 4\,e^- + 4\,H^+ \xrightarrow{\text{Cytochrome oxydase}} 2\,H_2O \quad (1)$$

Cependant, une fuite d'électrons qui ne dépasse pas 3 à 5% de la production mitochondriale peut avoir lieu au niveau du complexe I et III, ce qui est à l'origine de la formation de l'anion superoxyde (2) (Beaudeux *et al.*, 2006).

$$O_2 + 1\,e^- \longrightarrow O_2^{\bullet -} \quad (2)$$

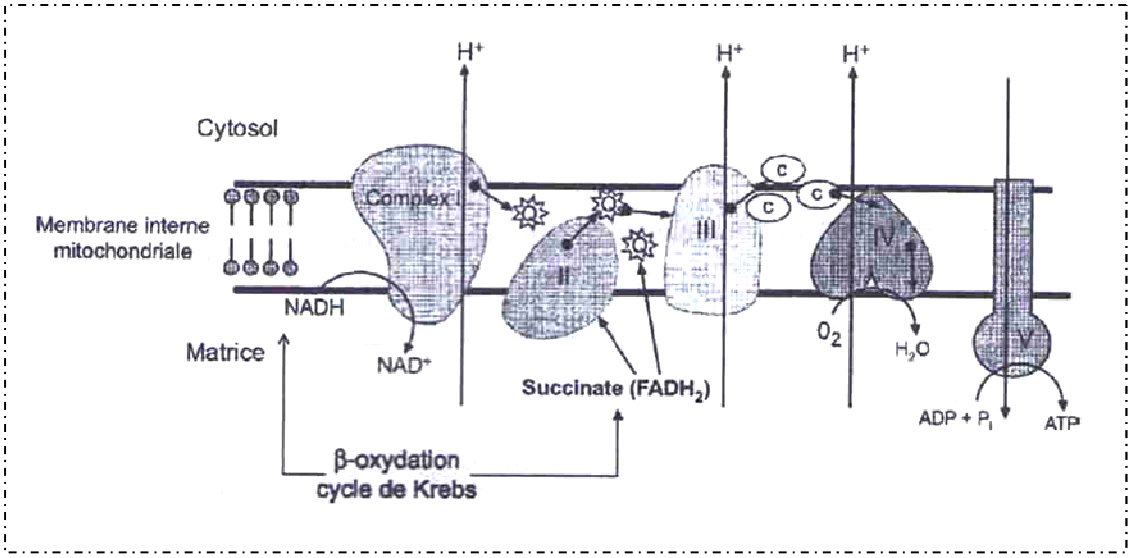


Figure 2: Schéma représentant les éléments de la chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les électrons issus du NADH et du succinate provenant de la β-oxydation des substrats au niveau du cycle de Krebs, sont transférés respectivement au complexe I (complexe NADH- ubiquinone réductase) et au complexe II (complexe succinate déshydrogénase). Les ubiquinones, aussi connus sous le nom de coenzyme Q, acceptent les électrons issus des deux premiers complexes qui sont réduits alors en ubisemiquinone puis ubiquinol. Les électrons sont alors transférés de l'ubiquinol au complexe III (ubiquinol cytochrome C réductase) puis au cytochrome C et enfin au complexe IV (cytochrome C oxydase). L'oxygène moléculaire présent à ce niveau accepte de façon tétravalente et simultanée les électrons, se réduisant en eau.

Outre la mitochondrie, qui est le site principal de la formation des ions superoxydes dans la cellule (Houée-Levin *et al*., 2005), la NADPH oxydase des cellules phagocytaires intervient également dans la production extracellulaire d'anions superoxydes au cours de la de destruction des corps étrangers (Baudin, 2006).

La NADPH oxydase existe également dans d'autres cellules telles que les cellules endothéliales vasculaires et les cellules musculaires (Beaudeux *et al.*, 2006). En dehors de ces fonctions physiologiques, elle joue un rôle prépondérant dans la production intracellulaire de superoxyde (Beaudeux *et al.*, 2006).

La xanthine oxydase est une autre source importante de superoxyde. Elle catalyse l'oxydation de la xanthine (produit de dégradation des purines) en présence d'oxygène en acide urique (3) (Owen and Johns, 1999; Valko *et al*., 2006).

$$\text{Xanthine} + 2\,O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Xanthine oxydase}} \text{Acide urique} + 2\,O_2^{\bullet -} + 2H^+ \quad (3)$$

❖ Le peroxyde d'hydrogène

Le radical superoxyde est peu réactif avec les biopolymères (protéines, acide nucléique (Marfak, 2003), mais il se transforme rapidement en peroxyde d'hydrogène lors de la réaction (4) catalysée par l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) (Gardès-Albert *et al*., 2003).

$$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2\,H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \quad (4)$$

❖ Le radical hydroxyle

Le peroxyde d'hydrogène est potentiellement toxique (Marfak, 2003) car il diffuse très facilement à travers les membranes et peut donc agir à distance de son lieu de production et en présence de cations tels que Fe^{2+}, il se transforme en radical hydroxyle selon la réaction Fenton (5) (Beaudeux *et al*., 2006; Gardès-Albert *et al*., 2003) ou bien par la réaction Haber-Weiss (6) (Beaudeux *et al*., 2006). Le radical hydroxyle ainsi obtenu par ces réactions est extrêmement réactif (Favier, 2003).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^- \quad (5)\ \text{Réaction de Fenton}$$

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \longrightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2 \quad (6)\ \text{Réaction Haber-Weiss}$$

❖ Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ($NO^{\bullet}$) joue un rôle très important dans l'organisme comme un puissant vasodilateur, il contribue également dans la défense contre les cellules malignes et les bactéries (Parke, 1999). La principale source endogène de la production de $NO^{\bullet}$ chez les mammifères est le système enzymatique NO synthétase qui transforme la L-arginine en citrulline (Figure 3) (Beaudeux *et al.*, 2006). Le $NO^{\bullet}$ ainsi formé n'est pas réactif mais constitue un précurseur pour d'autres espèces plus réactives. En effet, lors d'une surproduction d'anions superoxydes, ces derniers réagissent très rapidement avec le monoxyde d'azote pour former le peroxynitrite ($ONOO^-$) qui est très toxique pour la cellule car il intervient dans l'oxydation de ADN et des lipides (Beaudeux *et al.*, 2006; Parke, 1999; Valko *et al*., 2006).

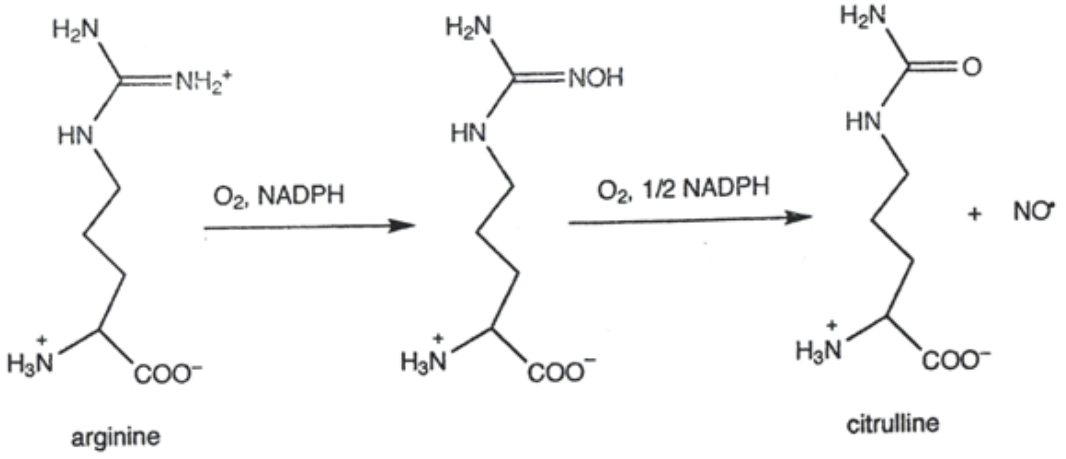


Figure 3: Production de NO• à partir de la L-arginine (Houée-Levin *et al*., 2005).

I. 2. Le stress oxydant

Le stress oxydant est un déséquilibre profond entre les antioxydants et les prooxydants en faveur de ces derniers (Pincemail *et al*., 2002). Cette situation peut résulter d'une altération de la membrane mitochondriale suite au dysfonctionnement de la chaîne respiratoire (Leverve, 2006), d'une activation des systèmes enzymatiques (xanthine oxydase, NADPH oxydase,..), d'une libération du fer à partir des protéines chélatrices (ferritine) ou d'une oxydation de certaines molécules (glucose, hémoglobine) (Pincemail *et al.*, 2002).

D'autres facteurs tels que la fumée de cigarettes, les polluants, les ultraviolets (Lee *et al*., 2007), et les efforts répétés (Pincemail *et al.*, 2002) sont également à l'origine d'une production accrue de radicaux libres dans l'organisme. Une alimentation pauvre en antioxydants contribue aussi à l'apparition du stress oxydant (Pincemail *et al.*, 2002).

I. 2. 1. Les conséquences du stress oxydant

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques comme l'oxydation de l'ADN, des protéines, et des lipides (Favier, 2003; Tapiero *et al.*, 2004), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. L'organisme peut aussi réagir contre ces composés toxiques par production d'anticorps, qui malheureusement peuvent être aussi des auto-anticorps créant ainsi une troisième ligne d'attaque chimique (Favier, 2003).

I. 2. 1. 1. Les conséquences biochimiques

❖ La peroxydation lipidique

Les lipides notamment les acides gras insaturés sont les cibles privilégiées des radicaux libres (Baudin, 2006). En présence de dioxygène, la réaction des radicaux sur les doubles liaisons initie une réaction en chaîne menant à des peroxydes ou à des hydroperoxydes (Houée-Levin *et al.*, 2005). Les hydroperoxydes ainsi formés peuvent subir plusieurs transformations: être réduits et neutralisés par la glutathion peroxydase ou continuer à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhyde et en alcane qui, par leur volatilité, sont éliminés par voie pulmonaire (Favier, 2003; Guichardant *et al.*, 2006).

L'attaque des lipides peut concerner les lipoprotéines circulantes ou les phospholipides membranaires, les conséquences seront différentes:

- ✓ L'attaque des lipides circulants aboutissent à la formation de LDL (lipoprotéines de légére densité) oxydées, qui seront captées par des macrophages formeront ainsi des dépôts lipidiques de la plaque d'athérome responsables des maladies cardiovasculaires (Favier, 2003);
- ✓ L'attaque des phospholipides membranaires a une action sur la fluidité des membranes et donc sur le fonctionnement de nombreux récepteurs, les aldéhydes ainsi libérés dans le cytosol réagissent avec les protéines (Favier, 2003; Houée-Levin *et al.*, 2005).

❖ L'oxydation des protéines

La toxicité des ERO s'exerce également sur les protéines. Les ERO sont en effet capables de réagir avec les différents acides aminés des protéines. Les plus sensibles aux actions des ERO sont :

- ✓ les acides aminés aromatiques comme le tryptophane et la tyrosine sur lesquels le radical $OH^{\bullet}$ s'additionne en modifiant la conformation de la protéine (Baudin, 2006; Koechlin-Ramonatxo, 2006);
- ✓ Les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine; leur oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts disulfures, donc à l'agrégation de plusieurs molécules de protéines (Koechlin-Ramonatxo, 2006);
- ✓ Les acides aminés basiques : l'histidine, la lysine et l'arginine, sont également sensibles au radical hydroxyle et forment ainsi des dérivés carbonyles ou hydroxyles semi-aldéhydes (Baudin, 2006).

Les ERO peuvent aussi couper les liaisons peptidiques et former ainsi des fragments peptidiques. Les protéines modifiées perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, récepteur,..) et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Favier, 2003). Les protéines oxydées deviennent aussi hydrophobes et vont alors former des amas anormaux dans ou autour des cellules. Ces amas, associés aux lipides, forment des dépôts caractéristiques des tissus des sujets âgés (Favier, 2003).

❖ L'oxydation de l'ADN

L'ADN qu'il soit nucléaire ou mitochondrial est également la cible majeur des ERO (Koechlin-Ramonatxo, 2006). Les radicaux hydroxyles sont les plus actifs, ils ont la capacité d'oxyder rapidement les bases azotées. La guanine est la base la plus exposée à l'oxydation et le principal produit formé est la 8-hydroxyguanine (figure 4). Ces radicaux peuvent aussi attaquer la fraction glucidique de l'ADN. L'oxydation du désoxyribose est moins probable que celle des bases, elle mène soit à une perte de base adjacente et donc à la formation des sites abasiques ou bien à une rupture de la liaison phosphodiester créant une coupure du simple brin d'ADN (Favier, 2003; Houée-Levin *et al.*, 2005).

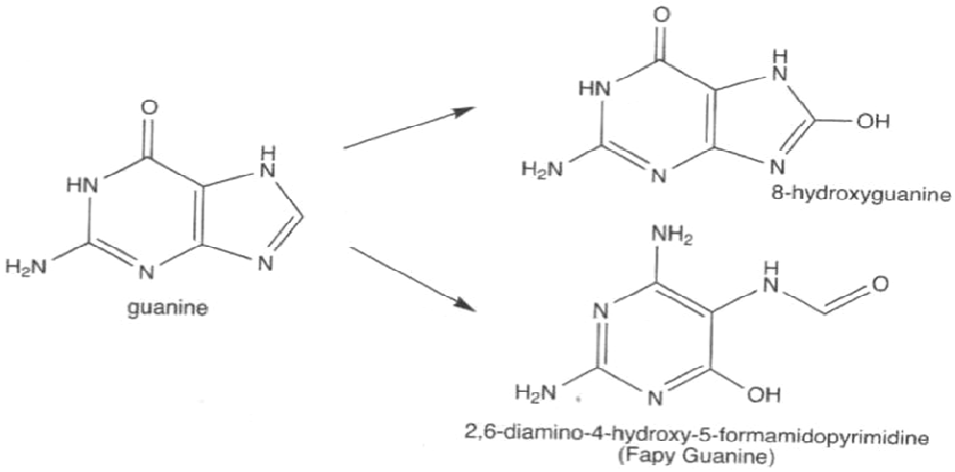


Figure 4: Produit de l'oxydation de la base de l'ADN, la guanine (Houée-Levin *et al.*, 2005).

Ces altérations structurales, lorsqu'elles ne sont pas réparées, entraînent à long terme des altérations génétiques telles que les cassures chromosomiques, les mutations, et les délétions qui sont à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

I. 2. 1. 2. Les conséquences biologiques

Elles sont extrêmement variables selon la concentration des ERO :

- ✓ des légers stress augmenteront la prolifération cellulaire et l'expression de protéines;
- ✓ des stress moyens faciliteront l'apoptose;
- ✓ des forts stress provoqueront une nécrose;
- ✓ les stress violents désorganiseront la membrane cellulaire et entraîneront des lyses immédiates (Favier, 2003).

De nombreuses autres anomalies biologiques sont induites par le stress oxydant telles que les mutations, la carcinogénèse, les malformations du fœtus, les dépôts de protéines anormales, les fibroses, la formation d'auto-anticorps, les dépôts de lipides oxydés, et les immunosuppressions (Favier, 2003).

I. 3. La défense antioxydante contre les ERO

Les effets physiologiques des ERO s'observent uniquement lorsqu'il ya un équilibre entre les ERO et les antioxydants qui représentent un système de protection cellulaire face à la réactivité des radicaux libres (Koechlin-Ramonatxo, 2006).

L'organisme possède deux systèmes de défense : Le système endogène constitué d'enzymes dont le rôle est de neutraliser les ERO par leur transformation en molécules stables et non réactives. La deuxième ligne de défense « les piégeurs de radicaux libres » qui sont des composés exogènes apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets toxiques des ERO, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire (Koechlin-Ramonatxo, 2006; Negre-Salvayre et Salvayre, 2005).

La figure 5 illustre les différents antioxydants exogènes et endogènes qui interviennent dans le mécanisme de la défense antioxydante contre le stress oxydant.

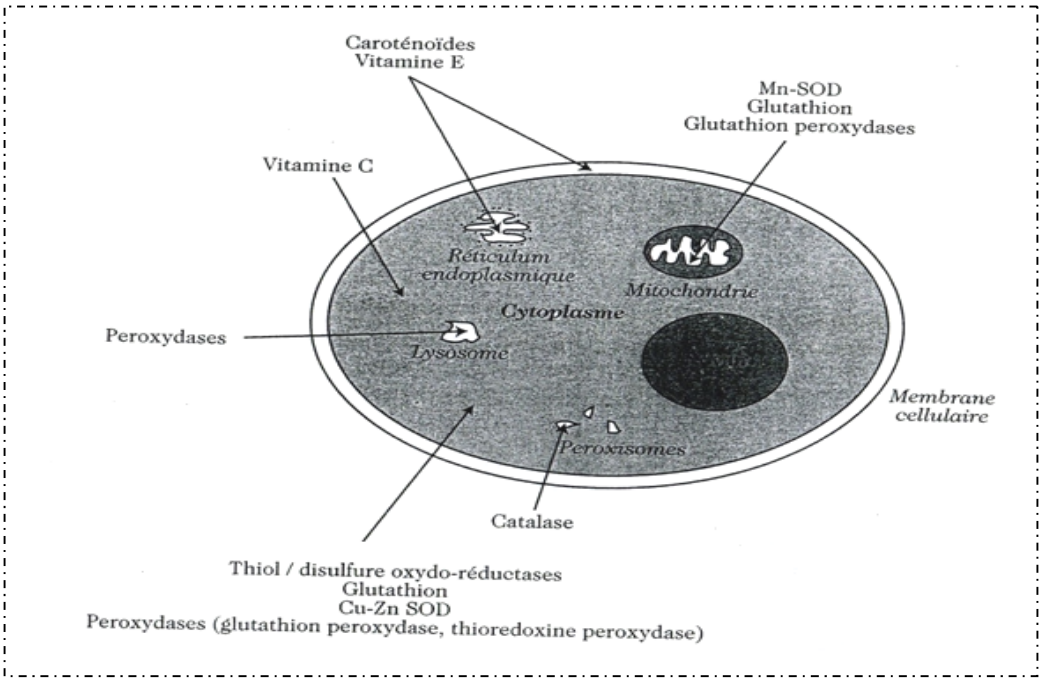


Figure 5: Défenses cellulaires contre le stress oxydant (Houée-Levin *et al.*, 2005).

I. 3. 1. La défense endogène

La défense endogène est caractérisée par deux systèmes différents: le système enzymatique et le système non enzymatique.

❖ **Le système enzymatique**

Les systèmes enzymatiques sont au nombre de trois et ils fonctionnent en complémentarité.

***Les superoxydes dismutases (SOD)**

Les SOD existent sous trois types : les SOD cytosolique à cuivre –zinc (Cu-ZnSOD), les SOD mitochondriales à manganèse (MnSOD) et les SOD extracellulaire à cuivre –zinc (Cu-ZnSOD). Les SOD transforment le $O_2^{\bullet -}$ en peroxyde d'hydrogène (Negre-Salvayre et Salvayre, 2005; Valko *et al*., 2006).

L'activité antioxydante des SOD est incomplète, car en éliminant l'anion superoxyde, elles produisent du peroxyde d'hydrogène (Baudin, 2006).

Les deux autres systèmes enzymatiques antioxydants à savoir les peroxydases (glutathion-peroxydase) et la catalase ont pour rôle d'éliminer le H_2O_2 y compris celui produit par les SOD (Baudin, 2006).

***Les peroxydases**

Un taux de 85% de l'activité peroxydasique est assuré par les peroxydases, et chez l'Homme tout particulièrement par les glutathion-peroxydases (GPX) (Baudin, 2006). Ces enzymes sont séléno-dépendantes et leurs réactions catalytiques nécessitent le glutathion réduit (GSH) (Baudin, 2006).Trois GPX ont été identifiées :

- ✓ La GPX classique (cGPX) localisée dans le cytosol et les mitochondries, elle intervient dans la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes;
- ✓ La GPX gastro-intéstinale (GI-GPX) est spécifique des cellules digestives, elle intervient dans la réduction des peroxydes apportés par l'alimentation;
- ✓ La HPGPX localisée au niveau des membranes cellulaires, elle catalyse la réduction des hydroperoxydes des acides gras polyinsaturés (AGPI) et des phospholipides (Negre-Salvayre et Salvayre, 2005).

Les GPX peuvent également éliminer les peroxynitrites qui sont des oxydants très puissants (Cillard et Cillard, 2006).

Il existe d'autres peroxydases comme la thioredoxine-peroxydase qui est une enzyme antioxydante à sélénium, elle intervient également dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène (Houée-Levin *et al.*, 2005).

***La catalase**

La catalase est une enzyme antioxydante intracellulaire, localisée essentiellement au niveau des peroxysomes; elle est capable d'éliminer le peroxyde d'hydrogène *in situ* en le transforment en eau et en oxygène moléculaire (Cillard et Cillard, 2006; Negre-Salvayre et Salvayre, 2005; Valko *et al*., 2006).

En plus de ce principal système enzymatique de défense, il en existe un autre secondaire composé de phospholipases, de l'ADN endonucléase, de lipases et de macroxyprotéinases empêchant d'une part l'accumulation dans la cellule des molécules oxydées (lipides, ADN et protéines) et d'autre part participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (Pincemail *et al.*, 2002).

❖ **Le système non-enzymatique**

Ce système est composé de:

***Le glutathion**

Le glutathion est un tripeptide, composé de glutamate, de glycine et de cystéine, cette dernière lui apporte le groupement soufré caractérisant cette molécule (Gardès-Albert *et al*., 2003). Le glutathion réduit (GSH) est généré à partir de glutathion oxydé (GSSG) par la glutathion réductase en présence de NADPH (Baudin, 2006). Le GSH élimine directement les ERO ou intervient comme cofacteur dans les réactions catalytiques de la glutathion-peroxydase (Baudin, 2006; Houée-Levin *et al.*, 2005) et il régénère également les principaux antioxydants tels que la vitamine C et la vitamine E (Houée-Levin *et al.*, 2005).

***La thioredoxine**

C'est une protéine à deux fonctions thiols. La thioredoxine réduite (TRX-$(SH)_2$) est générée à partir du thioredoxine oxydée (Trx-SS) par la thioredoxine réductase (Houée-Levin *et al.*, 2005); elle intervient dans la réduction des ponts disulfures des protéines oxydées en thiols (Houée-Levin *et al.*, 2005).

*** Les protéines de stockage de métaux de transition**

Les protéines telles que la ferritine et la céruloplasmine jouent un rôle important dans le système de défense antioxydante comme agents chélateurs de métaux de transitions libres (fer, cuivre) en les rendant inactifs à la formation des ERO (Curtay et Robin, 2000; Pincemail *et al.*, 2002).

I. 3. 2. La défense exogène

***Les polyphénols**

Les polyphénols en particulier les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes *in vitro.* Les flavonoïdes réagissent avec les radicaux libres les plus prooxydants particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique. De plus, ils ont une activité chélatrice des métaux (Curtay et Robin, 2000). Plusieurs études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et légumes riches en flavonoïdes est associée à la prévention de nombreuses maladies chroniques et dégénératives telles que le cancer, le

vieillissement, la cataracte, la perte de mémoire, l'inflammation et l'infection (Pham-Huy *et al.*, 2008).

***Les caroténoïdes**

Les pigments caroténoïdes sont très répandus dans la nature. Ils contribuent à la coloration de nombreux fruits et légumes, dont la couleur varie du jaune au rouge orangé (Nicol et Maudet, 2000). Les caroténoïdes font partie de la famille des tétraterpenoïdes et ils sont classés en deux catégories: les composés non oxygénés "les carotènes ", tels que le bêta carotène et les composés oxygénés "les xanthophylles" tels que la lutéine (Figure 6) (Dutta *et al*., 2005). Les caroténoïdes sont les composés les plus efficaces dans le piégeage de l'oxygène singulet ($^1O_2$) (Stahl and Sies, 2004). L'efficacité des caroténoïdes dans le piégeage des ERO est liée au nombre de double liaisons conjuguées présent dans la molécule (Tapiero *et al.*, 2004).

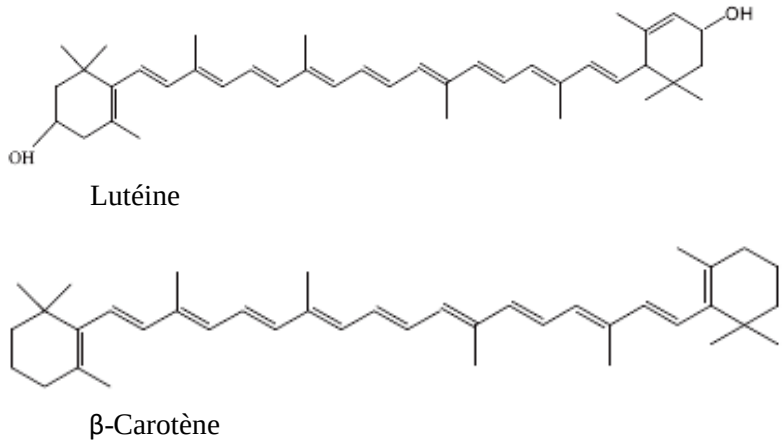


Figure 6: Structure du β-carotène (carotènes) et de la lutéine (xanthophylles) (Liu, 2007).

***La vitamine E**

La vitamine E est le terme générique utilisé pour décrire la famille des huit antioxidants liposolubles avec deux types de structures; les tocophérols (α-tocophérol, β-tocophérol, γ-tocophérol et δ-tocophérols) et tocotriénols (α-tocotriénol, β-tocotriénol, γ-tocotriénol, δ-tocotriénol) (Liu, 2007).

L'α-tocophérol (Figure 7) est la forme la plus abondante dans la nature et la plus active (Berset, 2006). Son caractère liposoluble lui confère une possibilité de s'insérer entre les acides gras des phospholipides constituants les membranes et les lipoprotéines et de les protéger des radicaux libres (Gardès-Albert *et al*., 2003).

Son rôle essentiel est de bloquer l'étape de propagation de la peroxydation lipidique en réduisant les peroxydes lipidiques en alcool (Negre-Salvayre et Salvayre, 2005). De plus, l'α-tocophérol est capable de capter les radicaux superoxydes, hydroxyles ainsi que l'oxygène singulet ($^1O_2$) (Gardès-Albert *et al*., 2003).

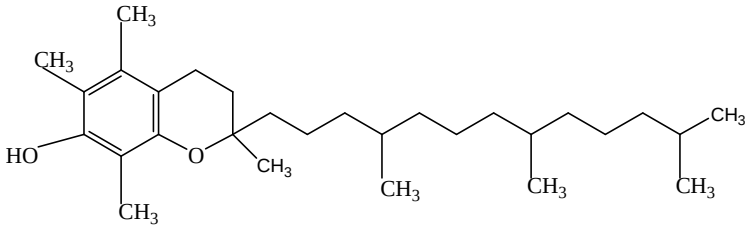


Figure 7: Structure chimique de l'α -tocophérol (Berset, 2006).

***La vitamine C**

La vitamine C inclue l'acide ascorbique et son produit d'oxydation acide déhydroascorbique (Podsedek, 2007). La vitamine C est un bon capteur de radicaux libres oxygénés notamment les radicaux hydroxyles et les superoxydes et elle intervient également dans la régénération de la vitamine E (Gardès-Albert *et al*., 2003).

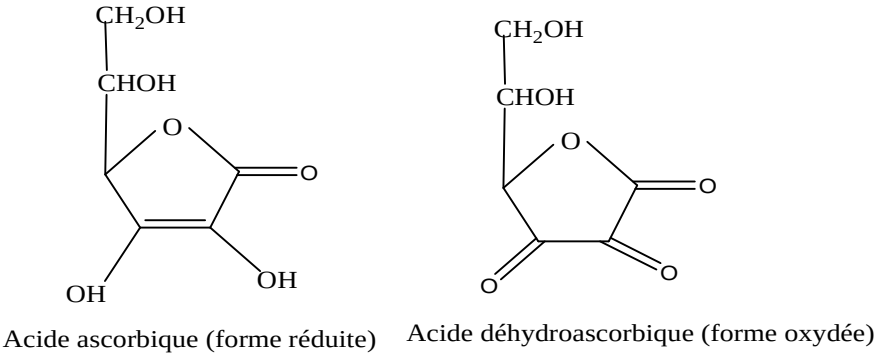


Figure 8: Structure chimique de la vitamine C (Grusse, 2003).

***Les oligo-éléments**

Les oligo-éléments comme le cuivre, le zinc et le sélénium exercent un rôle important contre le stress oxydant. En effet, ces éléments sont des cofacteurs de nombreuses enzymes impliquées dans la détoxification des ERO telles que les Cu-ZnSOD et la glutathion-peroxydase (Pincemail *et al.*, 2002).

II. Les composés phénoliques

Les plantes produisent une grande variété de composés non nutritifs et qui ne sont pas directement liés à leur développement. Ces composés sont appelés les métabolites secondaires. En se basant sur leurs origines biosynthétiques, les substances naturelles végétales peuvent être divisées en trois groupes principaux: les terpènoïdes, les alcaloïdes et les composés phénoliques ou les polyphénols (Richter, 1993).

II. 1. Les terpènoïdes

Les composés de ce groupe sont constitués uniquement de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils résultent de la condensation des unités isopréniques (Figure 9). La chaîne carbonée par la suite peut être modifiée par des réactions d'oxydations ou de réductions ou par l'élimination du carbone. Ce groupe comporte les huiles essentielles, les caroténoïdes, les résines, les stéroïdes et les polymères comme le caoutchouc (Richter, 1993).

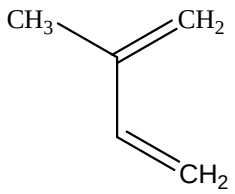


Figure 9 : Structure d'une unité isoprène (Richter, 1993).

II. 2. Les alcaloïdes

Ce sont des bases organiques possèdent souvent deux où plusieurs atomes d'azote dans la molécule. La majorité des alcaloïdes dériveraient des acides aminés tels que le tryptophane, la tyrosine, la lysine et l'ornithine. D'autres éléments peuvent introduire également dans la structure moléculaire des alcaloïdes et en particulier des groupes méthyle et acétyle, des unités en C_5 et C_{10} (isoprène, monoterpène), des dérivés de l'acide cinnamique et des composés phénoliques. Parmi ces composés la nicotine et la colchicine (Richter, 1993).

II. 3. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des composés possédant un ou plusieurs cycles benzéniques portant un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants (Chira *et al*., 2008). Plusieurs milliers de composés phénoliques ont été caractérisés (Macheix *et al.*, 2006).

Ces composés peuvent aller de molécules simples comme les acides phénols à des composés hautement polymérisés de poids moléculaire élevé (30 000 Dalton) (Balasundram *et al.*, 2006; Chira *et al*., 2008).

Chez les végétaux, ces composés fournissent des fonctions essentielles dans la reproduction et la croissance, ils sont impliqués dans les mécanismes de défense contre les pathogènes, les parasites et les prédateurs, et ils contribuent également à la couleur des plantes (Liu, 2007).

La distribution des polyphénols dans la plante, les tissus et au niveau de la cellule n'est pas uniforme. Les polyphénols solubles se localisent au niveau des vacuoles tandis que les insolubles se retrouvent au niveau des parois cellulaires (Maisuthisakul *et al*., 2008; Naczk and Shahidi, 2004).

II. 3. 1. La biosynthèse

Les phénols des plantes sont synthétisés à partir de deux voies principales:

***Voie du shikimate** : Cette voie permet la transformation des monosaccharides, issus du métabolisme primaire, en acides aminés aromatiques (phényalanine et tyrosine). Par désamination, ces acides aminés conduisent à la formation des acides cinnamiques et à leurs nombreux dérivés tels que les acides benzoïques, les lignines et les coumarines (Bruneton, 1999).

***Voie acétate-malonate**: Cette voie de biosynthèse consiste à former des noyaux aromatiques par cyclisation des chaînes polycétoniques. Ces dernières sont obtenues par condensation d'unités acétate (Richter, 1993). La voie de l'acétate-malonate intervient dans la synthèse d'un second noyau benzénique de nombreux composés ayant déjà un noyau aromatique obtenu par la voie du shikimate chez les végétaux supérieurs (Richter, 1993).

La diversité structurale des composés phénoliques est due à cette double origine biosynthétique et augmente par la fréquence de combinaison des deux voies dans l'élaboration des composés d'origine mixte tels que les flavonoïdes (Bruneton, 1999; Chira *et al.*, 2008).

II. 3. 2. Les différentes classes de polyphénols

Vue la diversité structurale des composés phénoliques, ces métabolites peuvent être repartis en plusieurs classes (Balasundram *et al.*, 2006), parmi ces dernières: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins. Ces classes de composés phénoliques sont les plus rencontrées chez les végétaux (Balasundram *et al.*, 2006).

II. 3. 2. 1. Acides phénoliques

Ils appartiennent à deux groupes, les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques. Ces substances sont généralement à l'état soluble dans les vacuoles (Macheix *et al*., 2006).

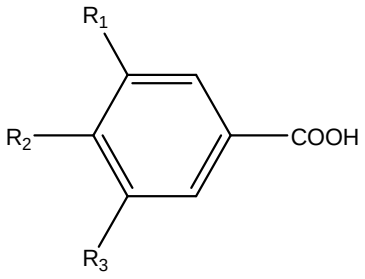
❖ **Les acides hydroxybenzoïques**

Ces acides présentent une structure en C_6-C_1, composée d'un noyau benzénique sur lequel s'attache une chaîne aliphatique à un carbone (Figure 10 a). Ils incluent l'acide vanillique, l'acide syringique et l'acide gallique, ce dernier est le composé le plus répandu dans la nature (Chira *et al*., 2008). Ces acides existent fréquemment sous formes d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans de nombreuses structures complexes comme celles de certains tannins (Macheix *et al*., 2006; Richter, 1993).

❖ **Les acides hydroxycinnamiques**

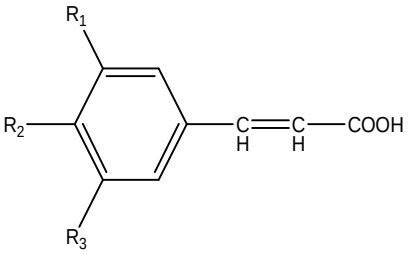
Ils représentent une classe très importante, dont la structure en C_6-C_3 (figure 10 b) dérive de l'acide cinnamique. Ces acides sont rarement présents à l'état libre et existent généralement sous forme d'esters ou de glucosides (Macheix *et al.*, 2006; Richter, 1993). Les acides hydroxycinnamiques les plus répandus dans la nature sont les acides caféique, *p*-coumarique, férulique et sinapique (Bruneton, 1999).

a



Dérivés d'acide benzoïque	Substitutions		
	R_1	R_2	R_3
Acide *p*-hydroxybenzoïque	H	OH	H
Acide protocatéchique	H	OH	OH
Acide vanillique	CH_3O	OH	H
Acide syringique	CH_3O	OH	CH_3O
Acide gallique	OH	OH	OH

b



Dérivés d'acide cinnamique	Substitutions		
	R_1	R_2	R_3
Acide *p*-coumarique	H	OH	H
Acide caféique	OH	OH	H
Acide férulique	CH_3O	OH	H
Acide sinapique	CH_3O	OH	CH_3O

Figure 10 : Structure des acides phénoliques: (a) les dérivés d'acide benzoïque et (b) les dérivés d'acide cinnamique (Liu, 2007).

II. 3. 2. 2. Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes dérive du latin *flavus* qui veut dire jaune. Les flavonoïdes sont des pigments de divers végétaux. Cette classe comprend des composés contribuants à la pigmentation jaune, d'autres sont responsables des couleurs variées (bleu, violet,.. etc.) alors que certains sont incolores (Richter, 1993). Ces composés constituent le groupe le plus abondant parmi les composés phénoliques (Chira *et al*., 2008), environ 4000 flavonoïdes ont été identifiés (Heim *et al*., 2002). Chez les plantes, les flavonoïdes ont des rôles variés en tant que métabolites secondaires, ils sont impliqués dans les processus de défense contre les ultraviolets, la stimulation des nodules de fixation de l'azote et la résistance aux maladies (Chira *et al.*, 2008; Marais *et al*., 2006).

Les flavonoïdes se caractérisent par un squelette carboné C_6-C_3-C_6 (Marais *et al*., 2006; Pietta, 2000), à deux cycles aromatiques A et B liés par un hétérocycle C oxygéné (figure 11) (Balasundram *et al.*, 2006). Le noyau A dérive de la voie acétate –malonate, alors que le noyau B et le pont à 3 carbones sont issus de la voie de l'acide shikimique (Chira *et al*., 2008).

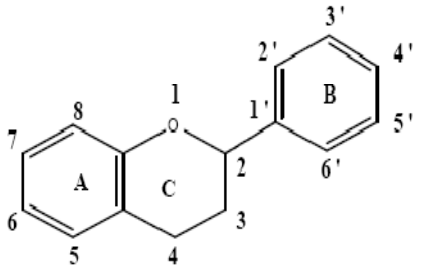


Figure 11: Structure de base des flavonoïdes (Heim *et al*., 2002).

La structure de l'hétérocycle ainsi que son degré d'oxydation permettent de distinguer les différentes classes des flavonoïdes (Aron and Kennedy, 2008; Macheix *et al*., 2006), les plus importantes (Figure 12) sont: les flavones, les flavanones, les isoflavones, les flavonols, les flavan-3-ols et les anthocyanidines (Pietta, 2000; Scalbert et Williamson 2000).

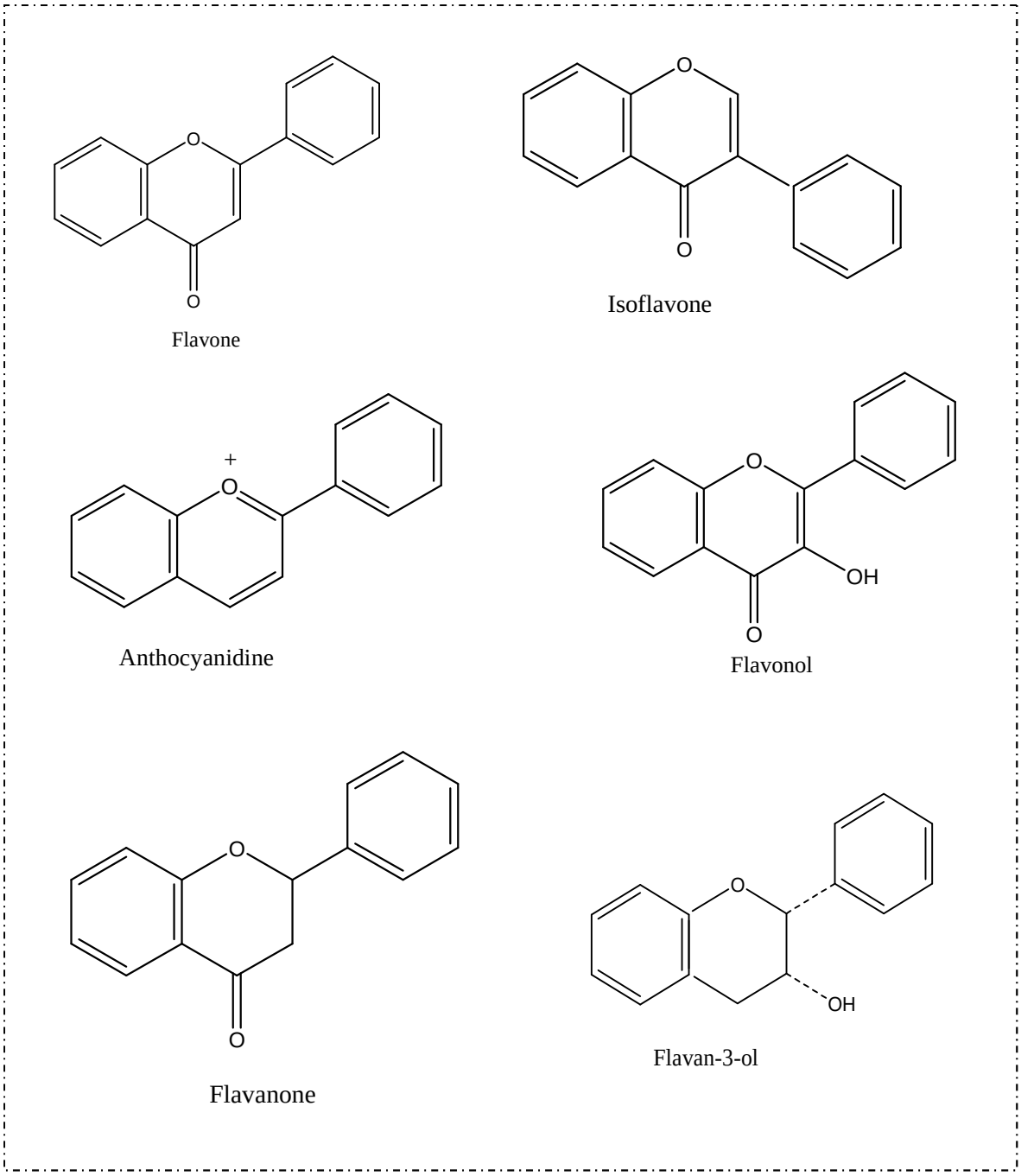


Figure 12: Structures de base des principaux flavonoïdes (Chira *et al*., 2008; Heim *et al*., 2002).

Les substitutions autour de la structure de base des flavonoïdes donnent naissance à des composés différents à l'intérieur de chaque classe (Tableau I, annexe I) (Macheix *et al*., 2006). La plupart des flavonoïdes existent sous forme de glycosides. La solubilité des ces composés est modifiée par les réactions de substitutions, les hydroxylations et les

glycosilations les rendent généralement plus hydrophiles en revanche d'autres substitutions telle que la méthylation, les rendent plus lipophiles (Chira *et al*., 2008).

II. 3. 2. 3. Tannins

Le terme tannin utilisé depuis l'Antiquité par l'Homme, pour designer les composés d'origine végétale responsables de la transformation des peaux animales fraîches en cuir imputrescible et peu perméable, cela en formant des complexes stables avec le collagène (Bennick, 2002; Ribéreau-Gayon, 1968). Ainsi, les tannins sont considérés comme étant des composés phénoliques ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton et qui ont la propriété de précipiter les alcaloïdes et les protéines (Ribéreau–Gayon, 1968).

Les tannins sont classés en deux groupes différents selon leur réactivité chimique et leur composition: les tannins hydrolysables et les tannins condensés (Macheix *et al*., 2006; Ribéreau –Gayon, 1968).

❖ **Les tannins hydrolysables**

Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (acide ou alcaline) ou enzymatique (Macheix *et al*., 2006). Ils libèrent une fraction phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (cas des gallotannins) soit un dimère de ce même acide appelé l'acide éllagique (cas des tannins éllagiques) et une fraction non phénolique qui est souvent du glucose (Figure 13A) (Bennick, 2002; Bossu *et al*., 2006). Les tannins hydrolysables sont abondants dans le bois, l'écorce, les feuilles et les fruits des végétaux (Bossu *et al*., 2006).

❖ **Les tannins condensés**

Les tannins condensés sont des monomères de flavan-3-ols tels que la catéchine ou l'épicatéchine qui sont liés par des liaisons C-C le plus souvent C_4-C_8 ou C_4-C_6. Le degré de polymérisation varie considérablement de quelques molécules de flavanols à plus de 50 (figure 13B) (Bennick, 2002; Chira *et al*., 2005; Rahim *et al*., 2008). Contrairement aux tannins hydrolysables, les tannins condensés sont résistants à l'hydrolyse et seules les attaques chimiques fortes permettent de les dégrader. Ainsi, par traitement acide et à chaud, les tannins condensés peuvent libérer des pigments rouges (les anthocyanidines), pour cette raison, les tannins condensés sont également désignés par le terme "proanthocyanidine" (Bennick, 2002; Macheix *et al*., 2006).

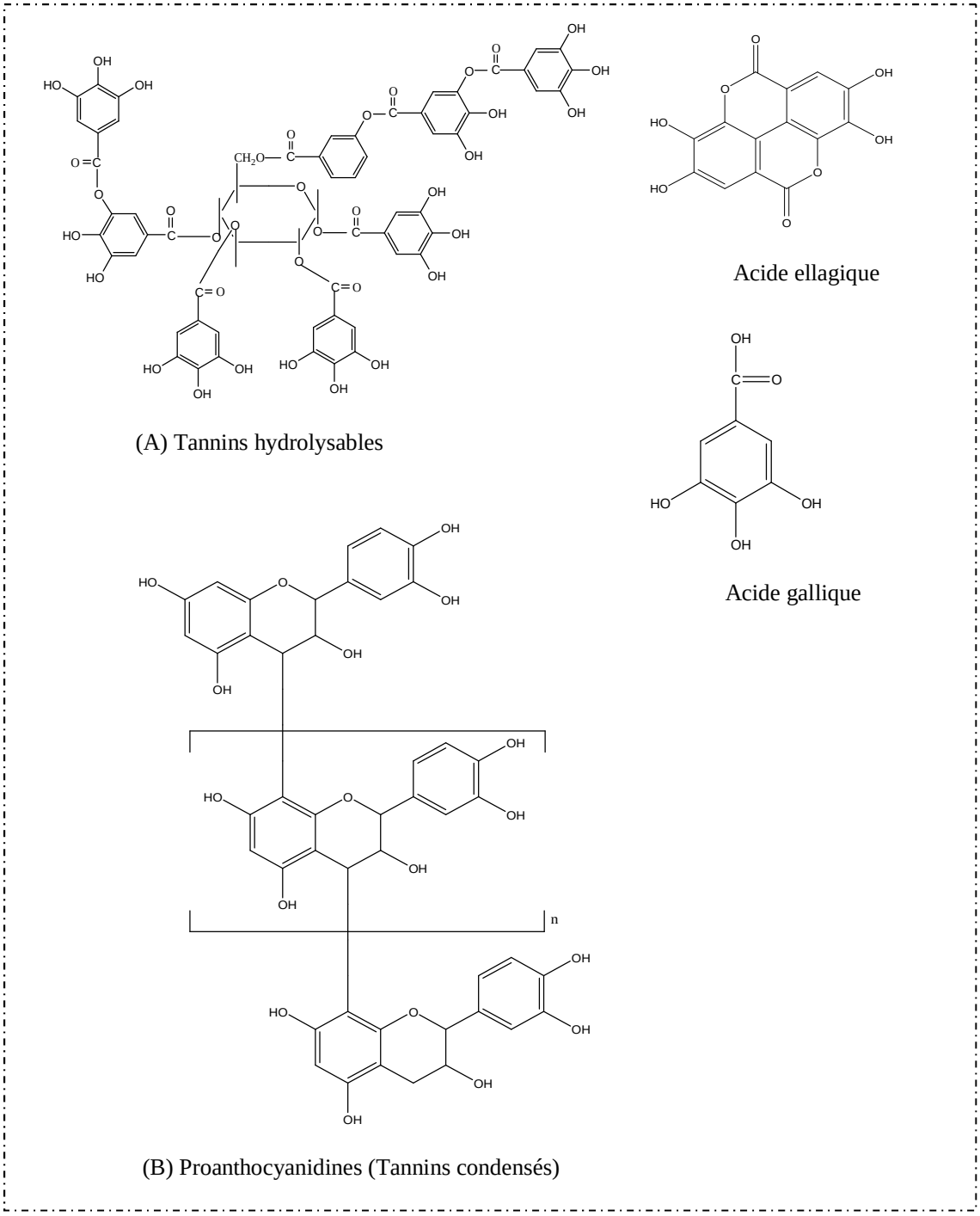


Figure13: Structures chimiques des tannins ; (A) Tannins hydrolysables, (B) Tannins condensés (Naczk and Shahidi, 2004).

II. 3. 2. 4. Lignines

Les lignines sont des polymères phénoliques qui sont les seconds biopolymères répandus dans la nature après la cellulose (Vermerris and Nicholson, 2009). Les lignines constituent 15 à 35 % du bois des angiospermes et des gymnospermes, ils constituent une biomasse considérable produite par les végétaux (Macheix *et al.*, 2006).

En raison de leur caractère hydrophobe marqué, les lignines s'accumulent au niveau des parois des cellules, elles se localisent au niveau des vaisseaux conduisant la sève et sont responsables de la rigidité des fibres végétales (Vermerris and Nicholson, 2009). Ces composés se localisent également dans les tissus végétaux présentant une forte résistance mécanique comme le noyau des fruits (Macheix *et al.*, 2006). Les lignines jouent un rôle de barrière chez la plante contre les champignons et les attaques d'insectes (Vermerris and Nicholson, 2009).

L'étude des lignines reste difficile pour cette raison une dégradation est préconisée avant de pouvoir les analyser (Macheix *et al.*, 2006). Elles résultent de la polymérisation tridimensionnelle de trois unités phénoliques dénommées monolignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique (Figure14), dérivant respectivement des acides *p*-coumarique, férulique et sinapique (Vermerris and Nicholson, 2009).

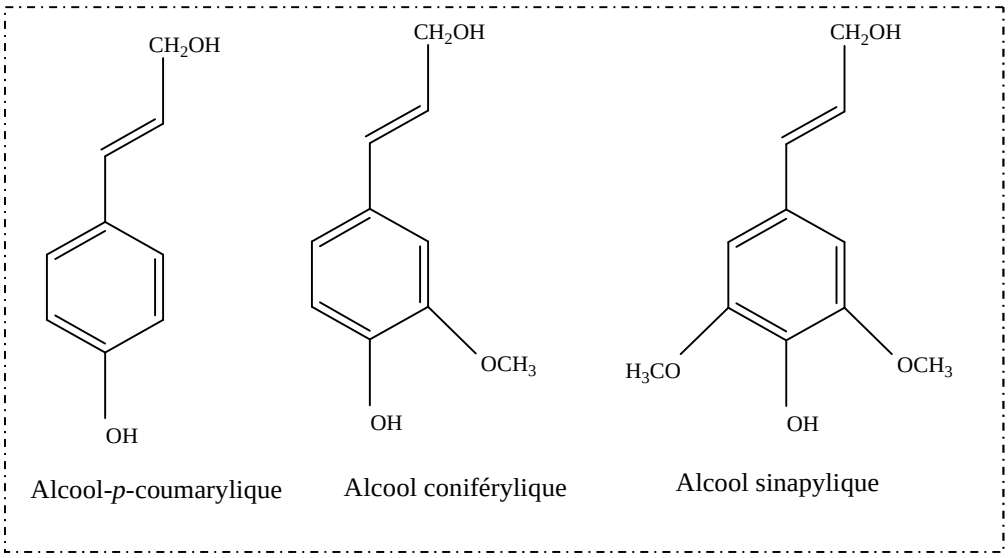


Figure 14: Les monomères constitutifs des lignines (Vermerris and Nicholson, 2009).

La structure des lignines varie d'une façon remarquable avec les groupes végétaux (gymnospermes ou angiospermes), avec la nature ou l'âge des tissus concernés ou encore sous l'action de certains facteurs exogènes comme la lumière (Macheix *et al.*, 2006). Ces variations reposent principalement sur trois points; la fréquence des trois monomères dans le polymère final, l'hétérogénéité des liaisons intervenant entre les différents monomères (Macheix *et al.*, 2006) et les constituants incorporés dans le polymère tels que: l'acides *p*-coumarique, l'acétate, les sucres simples, et les aldéhydes phénoliques (Vermerris and Nicholson, 2009).

II. 3. 3. Activités biologiques des composés phénoliques

Les polyphénols ont une importance remarquable vue leurs effets bénéfiques sur la santé. En effet, leur rôle comme antioxydants naturels suscite, de plus en plus, l'intérêt des chercheurs dans la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires, de l'athérosclérose, du diabète et des maladies neurodégénératives (Chira *et al*., 2008; Siddhuraju, 2007). De plus, ces métabolites sont doués d'activités antibactérienne (Karou *et al.*, 2005), antivirale et antiparasitaire (Aron and Kennedy, 2008).

II. 3. 3. 1. Activité antioxydante

Ces dernières années, plusieurs études sont focalisées sur l'extraction et la détermination des composés phénoliques de divers plantes (Jang *et al.*, 2007) dans le but d'étudier la relation entre ces composés et leur activité antioxydante (Tabart *et al*., 2009), d'élucider le mécanisme d'action de ces composés (Yang *et al*., 2008) et de les faire introduire par la suite comme additifs dans l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Chira *et al*., 2008).

❖ **Les acides phénoliques**

Les acides phénoliques possèdent un caractère antioxydant pour la plupart des dérivés cinnamiques ou benzoïques (Berset, 2006). Parmi les plus actifs : les acides rosmarinique, gallique, caféique, dihydrocaféique et chlorogénique (Berset, 2006). L'activité antioxydante des acides phénoliques augmente avec le nombre de groupements hydroxyles (Balasundram *et al.*, 2006).

Plusieurs éléments sont en faveur de la relation structure-activité des acides phénoliques. Ainsi, les acides hydroxycinnamiques ont toujours une activité antioxydante plus élevée que celle des acides hydroxybenzoïques. Ceci peut être dû au groupement CH=CH-COOH, qui assure une plus grande capacité de donation d'atome d'hydrogène et de stabilisation du radical que le groupement COOH des acides hydroxybenzoïques (Balasundram *et al.*, 2006).

D'autres part, l'addition d'un second OH sur le cycle aromatique augmente fortement l'activité des acides phénoliques et la position également des hydroxyles joue un rôle dans leur efficacité : *para* > *ortho* > *méta* ou *para* = *ortho* > *méta*. Un troisième hydroxyle renforce le caractère antioxydant de ces composés (Berset, 2006).

D'après Terao et ses collaborateurs (1993) (cités par Berset (2006)), les groupements methoxy jouent, dans une moindre mesure, le même rôle que les groupements hydroxyles. Le groupement O-CH_3 augmente la réactivité envers les radicaux peroxydiques. Ainsi, l'efficacité des acides hydroxybenzoïques est classée comme suit : acide syringique > acide vanillique > acide *p*- hydroxybenzoïque et pour la famille des cinnamiques, l'efficacité suit l'ordre décroissant suivant : acide sinapique > acide férulique > acide *p*-coumarique (Berset, 2006).

La condensation de deux acides phénoliques peut renforcer aussi l'activité antioxydante d'un composé; la curcumine formée par la dimérisation de deux acides férulique, l'acide rosmarinique par condensation de deux unités d'acide caféique, et de l'acide éllagique est obtenu par cyclisation de deux acides galliques (Berset, 2006).

❖ **Les flavonoïdes**

Beaucoup d'études se sont focalisées sur l'impact de la consommation du thé, boissons riches en flavonoïdes et surtout en quercétine sur la santé (Derbel et Ghedira, 2005). En effet, les flavonoïdes sont connus pour leurs propriétés scavenger des espèces oxygénées *in vivo* et *in vitro* (Yang, 2008).

Les flavonoïdes peuvent exercer leur activité antioxydante par divers moyens :

* La plupart des flavonoïdes possèdent la capacité de piéger les radicaux libres en agissant comme donneurs d'hydrogène et d'électrons;

* Certains peuvent aussi agir comme antioxydants par réaction directe avec les radicaux libres pour former des produits moins réactifs ;

* Quelques flavonoïdes aussi sont des inhibiteurs puissants de certaines enzymes qui génèrent les radicaux libres telles que: la cyclooxygènase, la lipooxygènase et la xanthine oxydase (Le *et al*., 2007);

* La chélation des métaux de transition est aussi un effet antioxydant exercé par certains flavonoïdes (Tripoli *et al*., 2007). Le complexe flavonoïde-métal formé exerce à son tour un rôle préventif en piégeant les superoxydes. De plus, ces complexes sont plus actifs que les flavonoïdes seuls dans le piégeage des radicaux libres superoxydes (Aron and Kennedy, 2008).

En général, l'activité de piégeage des radicaux libres par les flavonoïdes dépend de leur structure chimique, substitution, conjugaison et leur degré d'hydroxylation (Tripoli *et al*., 2007).

Selon des études basées sur la relation structure-activité des flavonoïdes trois éléments structuraux importants sont décrits pour l'évaluation de l'activité antioxydante (figure 15) :

a- La structure *ortho*-dihydroxy (catéchol) sur le cycle B qui confère une grande stabilité au radical aroxyl et elle participe à la délocalisation des électrons (Tripoli *et al*., 2007);

b- La présence de la double liaison 2, 3 conjuguée avec le groupement 4-oxo, favorise la délocalisation des électrons du cycle B (Heim *et al*., 2002; Pietta, 2000);

c- La présence des groupements hydroxyles libres au niveau du carbone 3 de l'hétérocycle et du carbone 5 du noyau A augmentent aussi l'activité antioxydante des flavonoïdes (Berset, 2006; Shi *et al*., 2001).

La quercétine qui présente toutes ces caractéristiques structurales est plus active que le kaempférol (Berset, 2006; Le *et al*., 2007; Shi *et al*., 2001). Cependant, la glycosilation du groupement hydroxyle du carbone 3 du cycle C entraine une baisse de l'activité antioxydante (Heim *et al*., 2002), elle est plus marquée lorsque le sucre est un diholoside, cas de la rutine (Pietta, 2000). Egalement, la substitution des groupes hydroxyles du noyau B par des groupes méthoxyles altère le potentiel redox qui affecte la capacité antioxydante des flavonoïdes (Balasundram *et al.*, 2006).

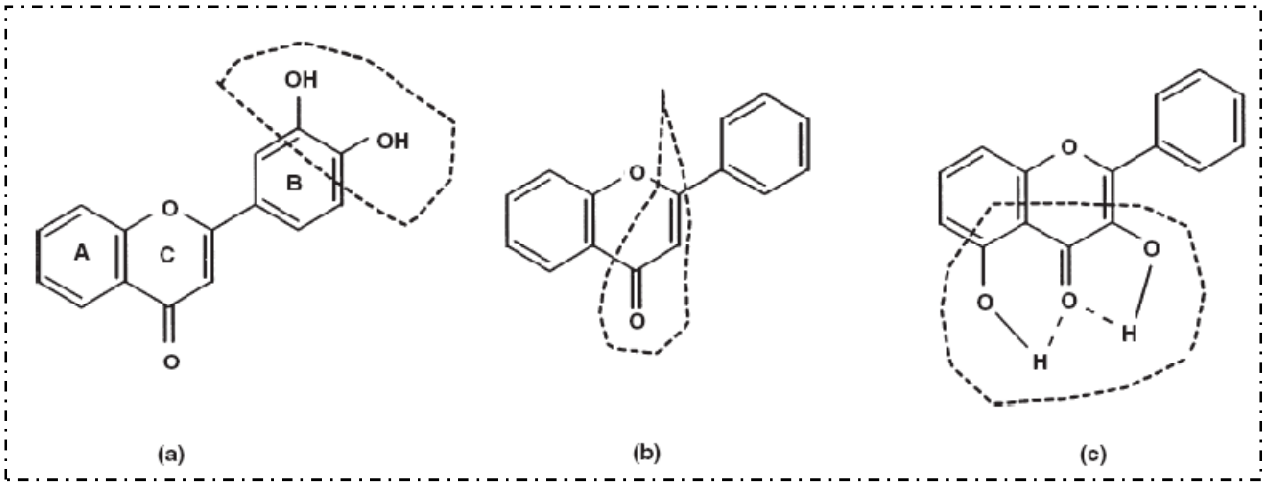


Figure 15 : Les groupes fonctionnels des flavonoïdes à haute capacité antioxydante (Shi *et al*., 2001).

Les flavonols sont les antioxydants les plus efficaces de tous les flavonoïdes. Leur pouvoir antioxydant est supérieur à celui des flavones, flavanols, flavanones et des acides phénoliques, grâce à leur groupe céto et leur groupement hydroxyle libre en position 3 du cycle C (Berset, 2006).

❖ **Les tannins**

Ces composés sont également doués d'un pouvoir antioxydant. C'est ainsi que les tannins hydrolysables inhibent la peroxydation des lipides et que les tannins condensés inhibent la formation des superoxydes (Derbel et Ghedira, 2005).

Selon les résultats d'une étude faite par Nakagawa and Yokozawa (2002), un mélange préparé à base de tannins purifiés du thé vert a montré une activité de piégeage de monoxyde d'azote et du superoxyde, plus importante que celle de l'extrait issu du thé vert. Les catéchols du thé piègent les radicaux libres, chélatent les ions métalliques et préservent d'autres antioxydants comme la vitamine E (Derbel et Ghedira, 2005).

L'activité antioxydante des tannins est conditionnée par plusieurs facteurs :

*La vitesse de la réaction;

*La stabilité du radical formé;

*La formation de liaisons hydrogène intramoléculaires;

* Les réarrangements structuraux possibles (Berset, 2006). En effet, la présence d'un groupe pyrogallol sur le cycle B tel que l'epigallocatéchine ou l'acylation du groupement OH porté par le carbone 3 des flavanols par l'acide gallique tels que l'épicatéchine- gallate, l'épigallocatéchine- gallate, renforce l'activité (Pietta, 2000) en portant des fonctions hydroxyles supplémentaires (Berset, 2006).

*La capacité antioxydante des tannins dépend également de l'ouverture du cycle pyranique (cycle C) (Rahim *et al*., 2008).

II. 3. 3. 2. Activité antibactérienne

Les polyphénols sont connus aussi pour leurs propriétés inhibitrices de la croissance bactérienne (Karou *et al*., 2005). Cependant, les mécanismes d'actions de ces composés sur les microorganismes ne sont pas totalement élucidés. D'après ces auteurs Cowan (1999),

Daciana Ciocan and Băra (2007) et Rodríguez Vaquero *et al.* (2007), les effets inhibiteurs des composés phénoliques pourraient être expliqués par leur adsorption sur les membranes cellulaires, par leurs interactions avec les enzymes et par privation des substrats et des métaux.

❖ Les acides phénoliques

Il a été rapporté que les acides phénoliques peuvent exercer des effets antibactériens sur plusieurs souches. Puupponen-Pimiä et ses collaborateurs (2001) ont rapporté que les acides hydroxycinnamiques (*p*-coumarique, caféique et férulique) inhibent la croissance de *Escherichia coli* et *Salmonella enterica*. Landete *et al*. (2007) (cités par Rodríguez *et al.*, 2009) ont testé les effets antibactériens de neuf composés phénoliques du vin parmi eux les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques sur *Lactobacillus plantarum*, ces auteurs ont constaté que les acides hydroxycinnamiques ont une forte activité antibactérienne que les acides hydroxybenzoïques. La présence de la chaîne aliphatique confère aux acides hydroxycinnamiques un caractère moins polaire que celui des acides benzoïques. Cette propriété peut être à l'origine de leur activité antibactérienne considérable par rapport aux acides hydroxybenzoïques, ce qui facilite d'une part la pénétration de ces acides à l'intérieur de la cellule et d'autre part leur réarrangement entre les lipides membranaires ce qui engendre la perturbation du métabolisme énergétique de la cellule bactérienne (Rodríguez Vaquero *et al.*, 2007).

La toxicité des acides phénoliques *vis-à-vis* des bactéries peut être également liée au nombre de groupements hydroxyles (Cowan, 1999). D'après les résultats d'une étude réalisée par Rodríguez Vaquero et ses collaborateurs (2007), l'acide gallique, avec ses trois groupes hydroxyles, exerce une forte activité antibactérienne sur les souches testées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus)* comparativement à l'acide protocatéchique qui présente deux groupements hydroxyle.

❖ Les flavonoïdes

L'activité antibactérienne des flavonoïdes est largement documentée, la propolis est l'un des produits les plus étudiés pour sa richesse en flavonoïdes (Cushnie and Lamb, 2005). Kosalec *et al.* (2005) ont montré que les extraits de propolis à une concentration de 1% en flavonoïdes exerçaient une forte activité antibactérienne sur plusieurs souches: *Bacillus subtilis*, *Sataphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus pyogenes*.

D'après Cushnie and Lamb (2005), l'action des flavonoïdes sur la cellule bactérienne peut s'exercer à différents niveaux : ils peuvent affecter la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, ou inhiber la synthèse de l'ADN, comme ils peuvent également perturber les voies métaboliques des bactéries.

Les études de relation structure-activité antibactérienne ont montré que la présence de groupements hydroxyles en position 2',4' ou 2',6' sur le noyau B des flavonoïdes ainsi que les substitutions au niveau du carbone 8 ou 6 du cycle A par une chaîne aliphatique longue, augmentent l'activité antibactérienne de ces composés (Cushnie and Lamb, 2005).

❖ **Les tannins**

Des études récentes ont révélé que les tannins condensés et hydrolysables apportés par les aliments empêchent l'adhésion de *Helicobacter pylori* aux parois cellulaires et par conséquent ils inhibent le développement de l'ulcère de l'estomac (Vattem *et al.*, 2005).

Une étude réalisée *in vitro* sur l'évaluation de l'effet de 36 polyphénols et de 4 terpenoides isolés à partir de plusieurs plantes médicinales, sur le développement de *Helicobacter pylori*, a montré que tous les tannins hydrolysables testés ont présenté une activité bactéricide sur *Helicobacter pylori*, comparativement au reste des polyphénols testés. Cette action peut être due à l'altération de la membrane cytoplasmique de la bactérie par les ces composés (Funatogawa *et al.*, 2004).

D'après, Cowan (1999), Rodríguez *et al.* (2009) et Zimmer et Cordesse (1996) l'activité antibactérienne des tannins condensés est plus marquée que celle des tannins hydrolysables. Les mécanismes avec lesquels ces composés inhibent les microorganismes ne sont pas clairement définis (Galão Rodrigues *et al*., 2008; Zimmer et Cordesse, 1996). Par ailleurs, ces effets inhibiteurs peuvent être liés aux propriétés astringentes des tannins qui se lient avec les enzymes bactériennes et les polysaccharides, à leur capacité d'interagir avec la membrane cytoplasmique en modifiant sa perméabilité et à la chélation des différents ions, ce qui rend ces composés inaccessibles aux bactéries (Akiyama *et al*., 2001; Cowan, 1999; Galvão Rodrigues *et al*., 2008; Zimmer et Cordesse, 1996).

Galvão Rodrigues et ses collaborateurs (2008) ont rapporté que l'activité antibactérienne des tannins peut être déterminée par deux facteurs essentiels; leur poids moléculaire élevé ainsi que la configuration *ortho* de leurs groupements hydroxyles.

III. Les plantes médicinales-Eucalyptus globulus

L'Homme, depuis l'Antiquité, utilise des plantes pour se soigner sans qu'il ne cherchait à savoir pourquoi ou comment elles agissaient (Schauenbeg et Paris, 1977). Environ 250 000 à 500 000 espèces de plantes ont été répertoriées dans le monde, un pourcentage faible (1 et 10%) est utilisé comme nourriture pour l'Homme et les autres espèces animales alors qu'un taux plus élevé est utilisé pour des besoins médicinaux (Cowan, 1999).

La science moderne, en analysant et étudiant les effets thérapeutiques des plantes, n'a pas pour but de diminuer la confiance que l'Homme avait envers les plantes, mais plutôt de préciser, comparer et classer les diverses propriétés des plantes afin de mieux les connaitre (Encyclopédie des plantes médicinales, 2001; Schauenberg et Paris, 1977).

La plante médicinale se définit comme "toute plante renfermant un ou plusieurs principes actifs capables de prévenir, de soulager ou de guérir certaines maladies" (Encyclopédie des plantes médicinales, 2001; Schauenberg et Paris, 1977).

III. 1. Les Myrtacées et l'espèce *Eucalyptus globulus*

La famille des Myrtacées est l'une des familles les plus importantes dans le règne végétal renfermant divers genres reconnus pour leurs effets thérapeutiques remarquables. Parmi ces genres, le *Eucalyptus* précisément l'espèce : *Eucalyptus globulus*.

III. 1. 1. La famille des Myrtacées

III. 1. 1. 1. Description botanique

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).

III. 1. 1. 2. Distribution 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).

III. 1. 1. 3. Genres principaux

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

III. 1. 1. 4. Intérêts de certaines espèces de Myrtacées

Les fruits de certaines espèces de cette famille comme *Psidium guajava* (goyave), *Eugenia uniflora* (cerisier de Cayenne), *syzygium jambos* (pommier rose) sont comestibles (Ozenda, 1982; Spichiger *et al.*, 2002). Les boutons floraux de *Eugenia caryophyllata* (clous de girofle) et les fruits de *Pimenta clioïca* sont utilisés eux aussi comme épices (Judd *et al.*, 2002; Ozenda, 1982; Spichiger et *al.*, 2002).

Certains genres de cette famille sont utilisés comme plantes ornementales appréciées notamment pour leurs pétales, sépales ou étamines parmi ces genres: le *Myrtus* (myrte) et le *Eucalyptus* (Judd *et al.*, 2002; Ozenda, 1982; Spichiger et *al.*, 2002).

D'autres genres sont une source importante d'huiles essentielles extraites essentiellement de leurs feuilles. Ces composés exercent plusieurs effets thérapeutiques (antiseptique, balsamique..) et rentrent dans la préparation des produits pharmaceutiques. Le tableau I illustre les effets thérapeutiques des huiles essentielles extraites de certaines espèces de la famille des Myrtacées.

En plus des effets thérapeutiques des espèces de *Eucalyptus* qui sont liés principalement aux huiles essentielles, l'eucalyptus est utilisé à grande échelle comme arbre de reboisement en zone tropicale et semi-aride. Son bois intervient dans des utilisations très diversifiées comme source d'énergie, dans la construction, il est également utilisé dans les industries papetières,… etc (Bigendako, 2004; Forrest and Moore, 2008; Ozenda, 1982; Spichiger *et al.*, 2002).

Tableau I: Effets thérapeutiques des huiles essentielles de certaines espèces de la famille des Myrtacées.

Espèce	Partie utilisée	Effets thérapeutiques	Références
Eucalyptus globulus	Feuilles	Balsamique, antiviral, antibactérien, et antimalarique, antibactérien et pesticide.	Bachir Raho et Bendali (2008) ; Batish *et al*. (2008) ; Ghedira *et al*., (2008) ; Wichtl et Anton(2003).
Eucalyptus camaldulensis	Feuilles	Antibactérien.	Bachir Raho et Bendali (2008).
Melaleucu cajupuli (Cajeput)	Feuilles	Effets antirhumatismal, antidermatique et insecticide.	Judd *et al*. (2002); Ozenda (1982); Spichiger *et al.* (2002).
Malaleuca quinquenervia (Niaouli)	Feuilles	Antiseptique, fébrifuge, anti-diarrhéique et antirhumatismal.	
Myrtus communis (Myrte)	Feuilles	Contre les affections pulmonaires et les hémorroïdes.	
Eugenia caryophyllata (Clous de girofle)	Bouton floral	Analgésique dentaire, bactéricide et insecticide.	

III. 1. 2. Le genre *Eucalyptus*

III. 1. 2. 1. Origine et définition

Le genre *Eucalyptus* fût décrit et baptisé en 1788 par le botaniste Français Heritier, après qu'il eut examiné des échantillons de *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).

III. 1. 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 soudées 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).

III. 1. 2. 3. Distribution géographique

Le 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).

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).

III. 1. 2. 4. Historique des eucalyptus en Algérie

Les espèces du genre *Eucalyptus* ont été introduites massivement en Algérie dés le XIXe siècle (dés 1856), en particulier le *E. globulus* qui est planté aux bordures des routes dans le nord de l'Algérie. Les premiers planteurs étaient des missionnaires d'origine Européenne, ils l'ont exploité dans le but d'assainir les terrains marécageux où pullulaient les anophèles et les moustiques qui sont vecteurs d'une maladie parasitaire endémique: le paludisme (Aït Youssef, 2006).

Les espèces présentes en Algérie, d'après ces auteurs Aït Youssef (2006) et Baba Aïssa (1999) sont :

*****_Eucalyptus globulus_ Labill ou gommier bleu;

**Eucalyptus citriodora* son huile essentielle lui procure odeur citronnelle et verveine;

**Eucalyptus camaldulensis* ou gommier rouge.

III. 1. 3. L'espèce *Eucalyptus globulus*

III. 1. 3. 1. Classification

La systématique de *E. globulus* selon Deysson (1979) est la suivante :

Règne: Végétal

Embranchement: Spermaphyte

Sous embranchement: Angiosperme

Classe: Dicotylédones

Ordre: Myrtales

Famille: Myrtaceae (Myrtacée)

Genre: *Eucalyptus*

Espèce: *Eucalyptus globulus.*

III. 1. 3. 2. Noms vernaculaires

Les différents noms vernaculaires de *E. globulus* sont représentés dans le tableau II.

Tableau II: Noms vernaculaires de *E. globulus*.

	Noms vernaculaires	**Références**
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.

III. 1. 3. 3. Description botanique

Le *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 16 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).

***La fleur** (Figure 16 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 soudées (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 16 e) est une capsule ligneuse dure et anguleuse, en forme de pyramide quadrangulaire renversée (Aït Youssef, 2006), prenant une teinte marron 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).

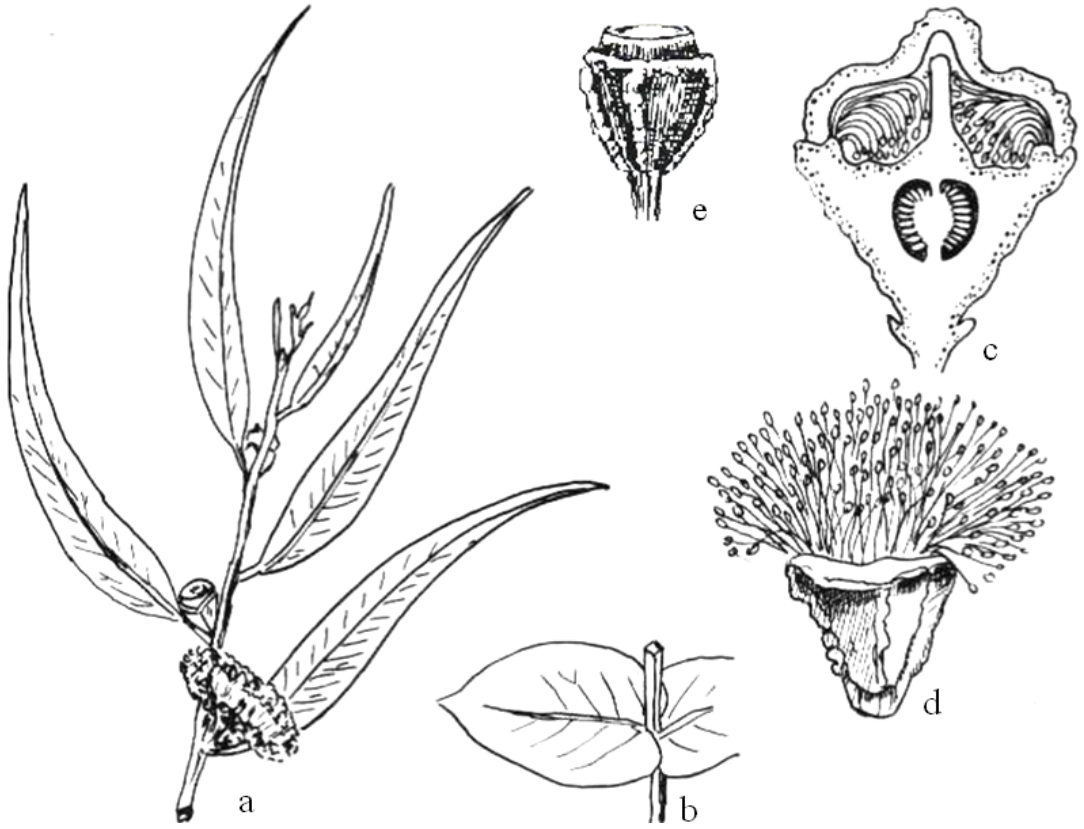


Figure 16: *Eucalyptus globulus* (Balmey et Wilson, 2000; Deysson, 1979).

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

III. 1. 3. 4. Composition chimique

L'ensemble (écorce, fruits et feuilles) de l'eucalyptus renferme des principes aromatiques localisés dans des poches sécrétrices volumineuses (Wichtl et Anton, 2003). L'espèce *E. globulus* contient plusieurs constituants parmi eux : les huiles essentielles, les tannins, les flavonoïdes et les résines (Tableau III) (Wichtl et Anton, 2003).

Tableau III : Composés identifiés dans les différentes parties de *E. globulus.*

Partie de la plante	Constituants		Références
Feuilles	Huiles essentielles (1 à 3,5 % de poids feuilles)	De 70 à 85 %: 1,8cinéole (eucalyptol). Terpènes: α terpène, β pinène, α –limonène, para- cymène, camphrène, α –phellandrène, α –frenchène, β-terpinène, aromadendrène..etc. Alcools: endesmol, α -terpinéol, globulol, pinocarvèol, euglobal… etc. Aldéhydes: citral, myrténal. Cétones: carvone, pinocarvone, verbénone acétate de géranyl.	Cadahía *et al.* (1997); Conde *et al*. (1997); Egwaikhide *et al.* (2008); Ghedira *et al.* (2008); Kim *et al*. (2001); Poletti (1982); Vankar *et al*. (2006); Wichtl et Anton (2003).
	Composés phénoliques	*Acides phénoliques*: caféique, gallique, ferulique, protocatéchique, gentisique. *Flavonoïdes* : Flavones: eucalyptine, 8 déméthyeucalyptine, sidéxylique,8-déméthylsidéroxyline. Rutine et essentiellement des dérivés de la quercetine; anthocyanosides, *Tannins* : Tannins condensés, proanthocyanidines et gallotannins.	
	Divers	Cires, stérols, saponines, polysaccharides, dicétone (n-triacontane 16,18-dione) dérivés du phloroglucinol, stéroïdes, macrocarpals, acides aminés et acides organiques.	
Ecorce	Composés phénoliques	*Acides phénoliques* : Acides benzoïques: gallique, vanillique. Acides cinnamiques : ferulique. Acide éllagique et ses dérivés glycosilés et méthylés. *Tannins*: Ellagitannins, proanthocyanidines, gallotannins et tannins condensés. *Flavonoïdes* : quercétine, naringénine. *lignines*.	Cruz *et al*.(2005); González *et al*.(2004); Vázquez *et al*.(2008).
	Divers	Lignocellulose, hémicellulose, xylose et rhamnose...etc.	
Fruits	Huiles essentielles	1,8-cinéole, camphene, α-pinène, globulol, *p*-cymène, limonène, aromodendrène, myrcène, γ-terpinène et α-terpinéol.	Guo and Yang (2006); Yang *et al*. (2007).
	Composés phénoliques	Acide gallique, acide éllagique et phénols glycosilés estérifiés avec l'acide oleuropéique.	
	Divers	Acide bétulinique, β-sitostérol, β-sitostérol-3-*O*-glycopyranosyl, macrocarpals A, B et cypellocarpin C.	

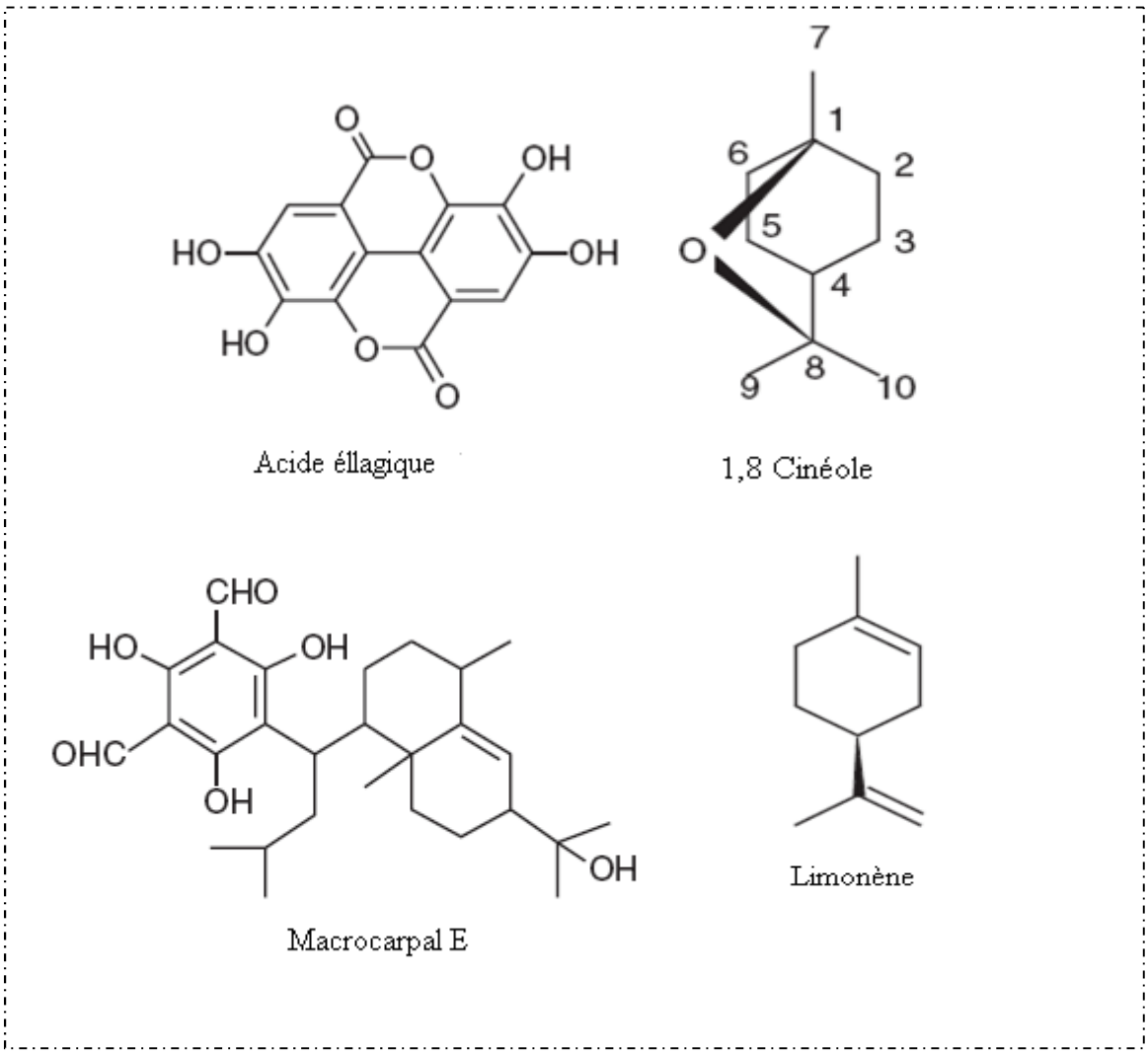


Figure 17: Structures de quelques composés identifiés des feuilles de *E .globulus* (Jacovelli, 2002).

III. 1. 3. 5. Usages traditionnels de *E. globulus*

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 IV résume les usages traditionnels des différentes parties de *E. globulus.*

Tableau IV: Quelques usages traditionnels de *E. globulus.*

Parties utilisées	Mode	Usage	Références
Feuilles	Tisanes des feuilles sèchées ou fraîches	Usage interne: traitement des affections des voies respératoires; balsamique; tonique; astringeant; 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 sèchées 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 *et al*.(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 inhilation: traitement de l'asthme (au Maroc).	Aït Youssef (2006) .
Ecorce		Pour adultérer la poudre de canelle ; 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 Compaghie (Italie), en Sicile en Sardaigne et au lac Fezara en Algérie.	Ghedira *et al*.(2008).
Bois		Fabrication du papier, poteaux et source d'énégie.	Aït Youssef (2006); Batish *et al*. (2008).

Partie pratique

IV. Matériels et méthodes

IV. 1. Matériel végétal

*Echantillonnage

Les feuilles, l'écorce ainsi que les fruits de *E. globulus* ont été récoltés au mois d'Avril de l'année 2009, d'une manière aléatoire, au sein de l'arboretum de la commune de Derguinah willaya de Bejaïa et loin de tout impact de pollution. L'identification de la plante a été effectuée, au niveau du laboratoire d'Ecologie de l'Université de Bejaïa.

Figure 18: Photographies du matériel végétal. A) Feuilles, B) Ecorce, C) Fruits.

*Séchage, broyage et tamisage

**Le séchage : Après la récolte, tous les échantillons ont été nettoyés avec l'eau courante afin de les débarrasser de la poussière et autres particules, puis séchés à l'étuve à 40°C (Kablan *et al*., 2008), jusqu'a la stabilisation du poids.

**Le broyage des échantillons est effectué à l'aide d'un broyeur électrique (IKA-WORKS, TYPE A11.basic) afin d'obtenir une poudre de granulométrie plus ou moins fine (Awika *et al*., 2004).

** Le tamisage est réalisé avec une série de tamis « RETCHE » dont le diamètre des mailles est compris entre 500 µm et 63µm. Les poudres ont été conservées dans des flacons en verre fumé pour éviter l'oxydation de leurs différents composés.

IV. 2. Détermination du taux d'humidité

Ce teste a été réalisé sur des échantillons fraîchement récoltés qui ont subi un séchage à 105°C pendant 3 heures (Nwinuka, 2005). La teneur en eau exprimée en pourcentage est déterminée selon la formule suivante :

$$La \text{ teneur en eau } (\%) = \frac{(P_o - P_f)}{Po} \times 100$$

Où :

P_f : Poids de l'échantillon après le séchage ;

P_o : Poids de l'échantillon avant le séchage.

IV. 3. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des polyphénols à partir des trois échantillons étudiés a été réalisée par une méthode solide-liquide selon la procédure de Owen and Johns (1999) légèrement modifiée. Dix grammes de poudre (diamètre inférieur à 63µm) sont extraits au moyen d'un litre d'acétone aqueux (70 %) à température ambiante pendant une semaine sous agitation mécanique. Le mélange a été centrifugé à 3060 g pendant 15 min ensuite le surnageant a été filtré sous vide en utilisant du papier Wattman N°1 (11µm). L'extrait organique aqueux obtenu est concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif (K-IKA Labortechnik), à une température de 40ºC (Nack *et al*., 2006).

Les phases aqueuses ainsi obtenues ont subi une délipidation à l'hexane en se référant à la procédure de Yu *et al*. (2005) avec quelques modifications.

La phase aqueuse est introduite dans une ampoule à décanter où 30 ml d'hexane sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement puis laissé se décanter. La phase aqueuse récupérée subit un 2^{éme} et un 3^{éme} lavage avec le même solvant (30 ml à chaque fois) afin d'éliminer la totalité des substances liposolubles.

A l'issue du 3^{éme} lavage, la phase aqueuse est récupérée, puis soumise à une évaporation à 40°C jusqu'a la stabilisation de son poids.

Les extraits secs obtenus (extraits bruts) ont été pesés pour estimer le rendement d'extraction par l'expression suivante :

$$\text{Rendement d'extraction (g / 100 g de poudre)} = \frac{p_f}{p_0} \times 100$$

(Stanojević *et al*., 2009)

Où :

P_f **:** Poids d'extrait après l'évaporation du solvant (g) ;

P_0 : Poids de la prise d'essai (g).

Les extraits secs obtenus (extraits bruts) ont été mis dans des bouteilles en verre fumé et conservés dans un dessicateur.

Le protocole de l'extraction détaillé est schématisé sur la figure (19).

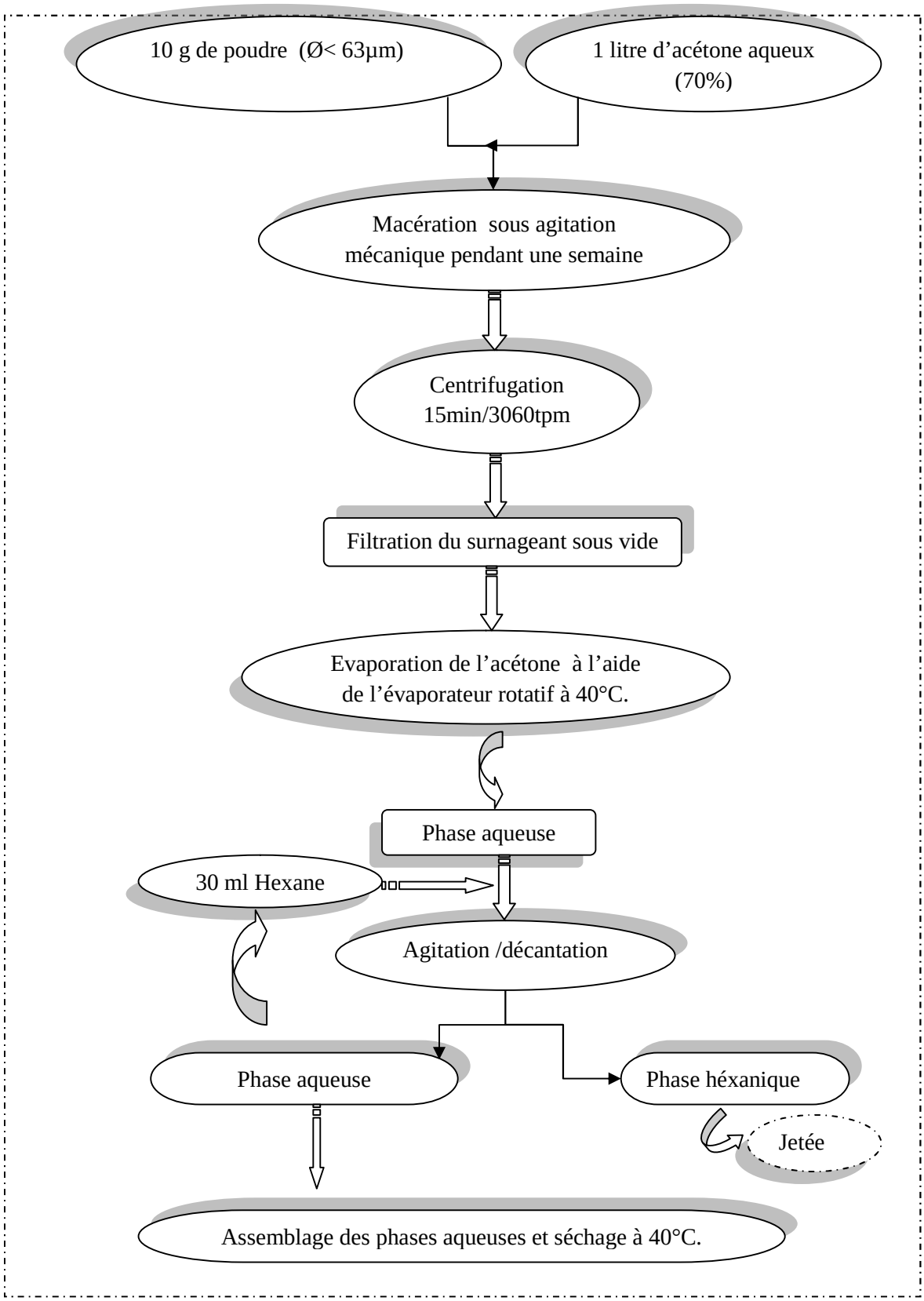


Figure 19: Protocole d'extraction des polyphénols.

IV. 4. Fractionnement des extraits bruts par chromatographie sur colonne

Le Sephadex G-25 est un dextrane, polymère linéaire, constitué d'unités de glucose liées par des liaisons α (1-6). Le Sephadex LH-20 est formé par la fixation de groupements propyliques aux hydroxyles de Sephadex G-25. La présence de groupements fonctionnels isopropyles confère au gel un caractère lipophile alors que les hydroxyles lui donnent un caractère hydrophile (Borel et Randoux, 1997; Lagnika, 2005; Perrot, 2004). En raison de cette nature, le Sephadex LH-20 se gonfle non seulement dans les solvants de faible et moyenne polarité mais également dans les solvants très polaires. A ces deux propriétés s'ajoute la récupération presque totale des échantillons au cours des expériences de séparation (Lagnika, 2005).

Selon la nature des composés à séparer et la nature de l'éluant utilisé, différents mécanismes sont susceptibles d'intervenir en même temps tout au long du processus de séparation.

• *séparation selon le poids moléculaire*

Ce gel permet la séparation de molécules de taille comprise entre 200 et 4000 Dalton. Les substances sont éluées par ordre décroissant par rapport à leur poids moléculaire (Lagnika, 2005; Perrot, 2004).

• *Séparation par adsorption*

Le Sephadex LH-20 présente une affinité pour les substances aromatiques et cycliques. La séparation de ces composés est effectuée généralement par le méthanol ou l'éthanol (Lagnika, 2005).

• *Séparation par partition*

Lorsque l'éluent est composé de deux solvants organiques de polarités différentes, le Sephadex retient spécifiquement le solvant polaire provoquant ainsi une différence nette entre les deux phases. Ce phénomène permet la séparation par partition de composés de polarité différente. Les composés plus polaires sont retenus par la phase stationnaire (Lagnika, 2005).

***** Conditions opératoires

Le gel de Sephadex LH-20 est gonflé au préalable dans une solution d'éthanol (96 %) sous une légère agitation pendant une nuit. Le gel est ensuite dégazé sous vide, puis coulé dans la colonne.

Adsorbant: Sephadex LH-20, 25 – 100 µm;
Hauteur de l'adsorbant: 30 cm;
Diamètre de la colonne: 1,6 cm;
Eluent1: Ethanol 96%;
Eluent2: Méthanol 96%;
Eluent 3: Acétone 60 %;
Débit: 1,7 ml/min.

La procédure de fractionnement est réalisée selon la méthode Kosar *et al.* (2007) modifiée, environ 400 mg de poudre de chacun des extraits (feuilles, écorce et fruits) ont été reconstitués dans de l'éthanol 75 % (v/v). La première élution a été faite par l'éthanol ; la seconde avec du méthanol et la dernière élution a été réalisée avec l'acétone 60 %. L'absorbance de chaque fraction éluée est déterminée à 280 nm. Les extraits lyophilisés ainsi obtenus après évaporation des solvants ont été mis dans des bouteilles en verre fumé et conservés dans un dessicateur.

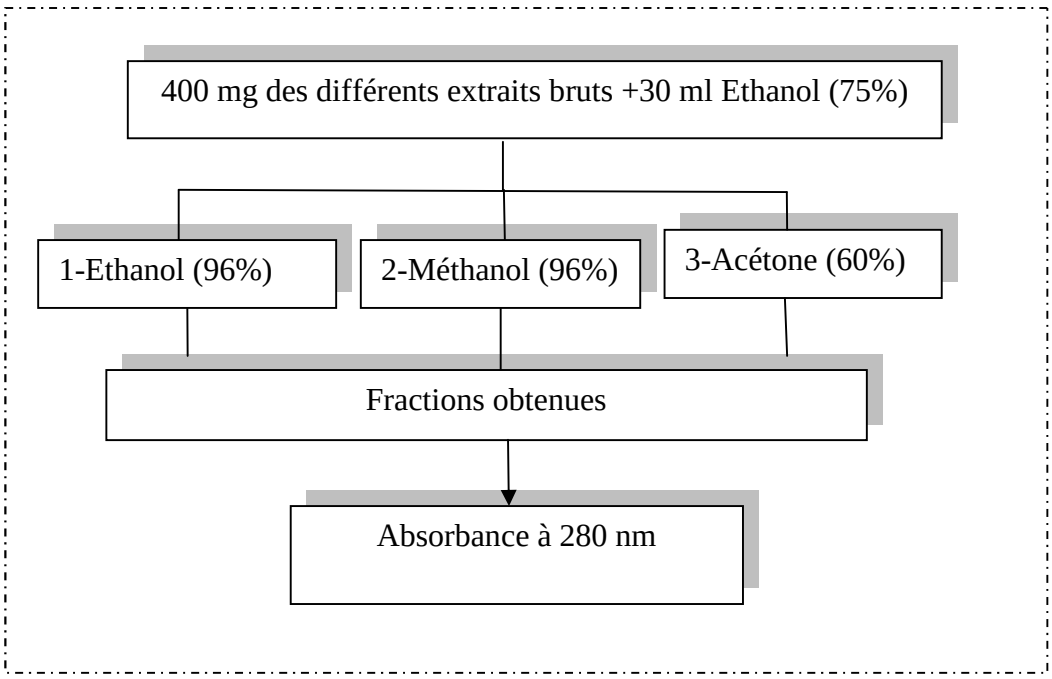


Figure 20: Schéma du fractionnement des extraits bruts par chromatographie sur colonne.

IV. 5. Dosage des composés phénoliques

Dans le but d'évaluer qualitativement et quantitativement le contenu en composés phénoliques des différents extraits (feuilles, écorce et fruits) de *E. globulus*, quatre protocoles ont été suivis afin de doser les teneurs en phénols à savoir: les phénols totaux, les flavonoïdes totaux, les flavonols et les tannins. Tous les extraits ont été reconstitués dans l'éthanol aqueux (75%).

IV. 5. 1. Dosage des composés phénoliques totaux

Le taux de composés phénoliques des extraits a été estimé par le réactif de Folin–Ciocalteu selon la procédure de Othman *et al.* (2007), avec quelques modifications. Le mode opératoire est schématisé sur la figure suivante.

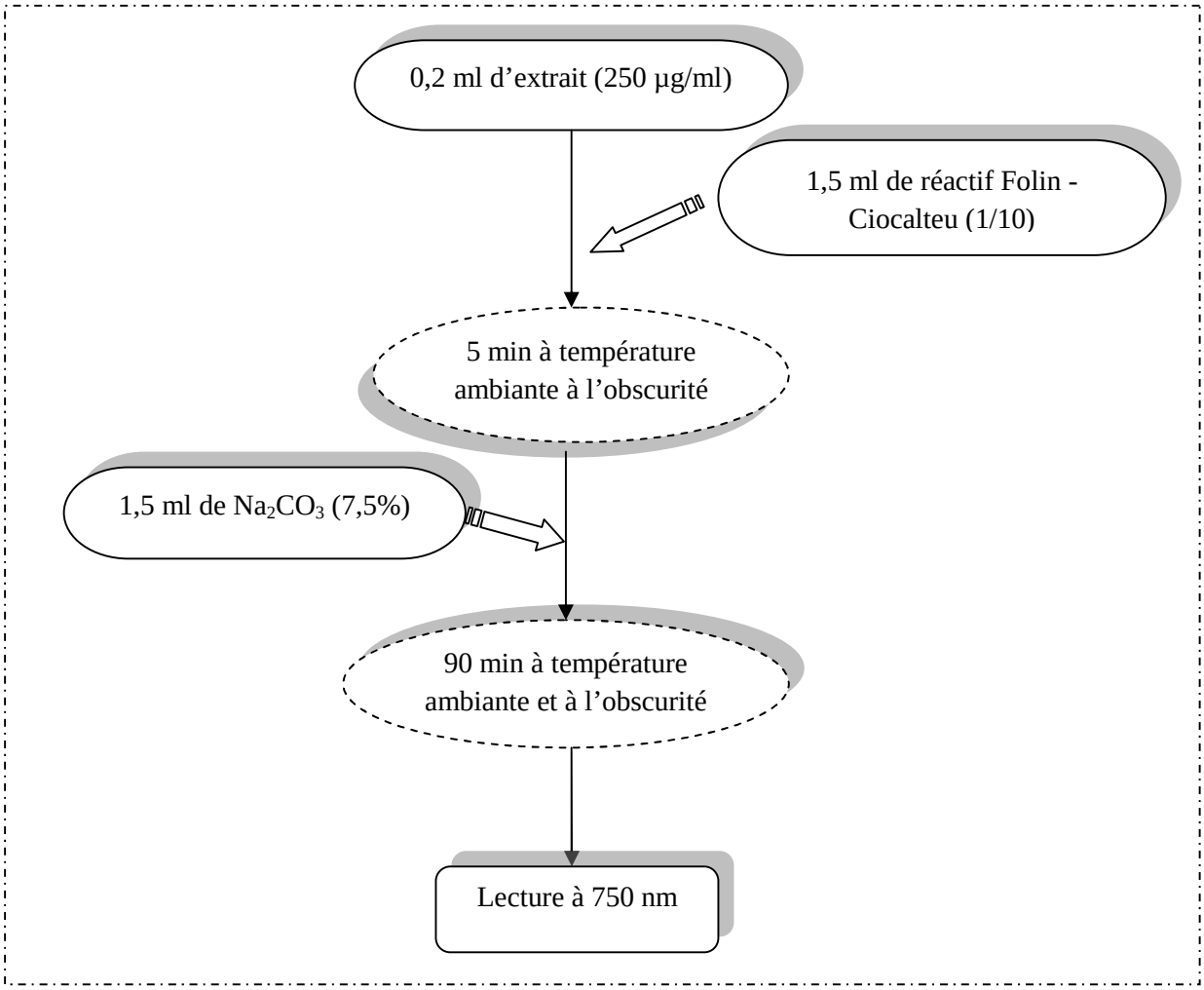


Figure 21: Protocole de dosage des composés phénoliques totaux.

**La concentration en composés phénoliques des différents extraits a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec de l'acide gallique (Figure 1, annexe II).
*La teneur moyenne en polyphénols est exprimée en mg équivalent acide gallique par gramme d'extrait brut (mg EAG/ g EB).

IV. 5. 2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les flavonoïdes des différents extraits sont déterminés par spectrophotométrie selon la méthode décrite par Djeridane et ses collaborateurs (2006) avec quelques modifications. Le protocole est présenté dans la figure (22).

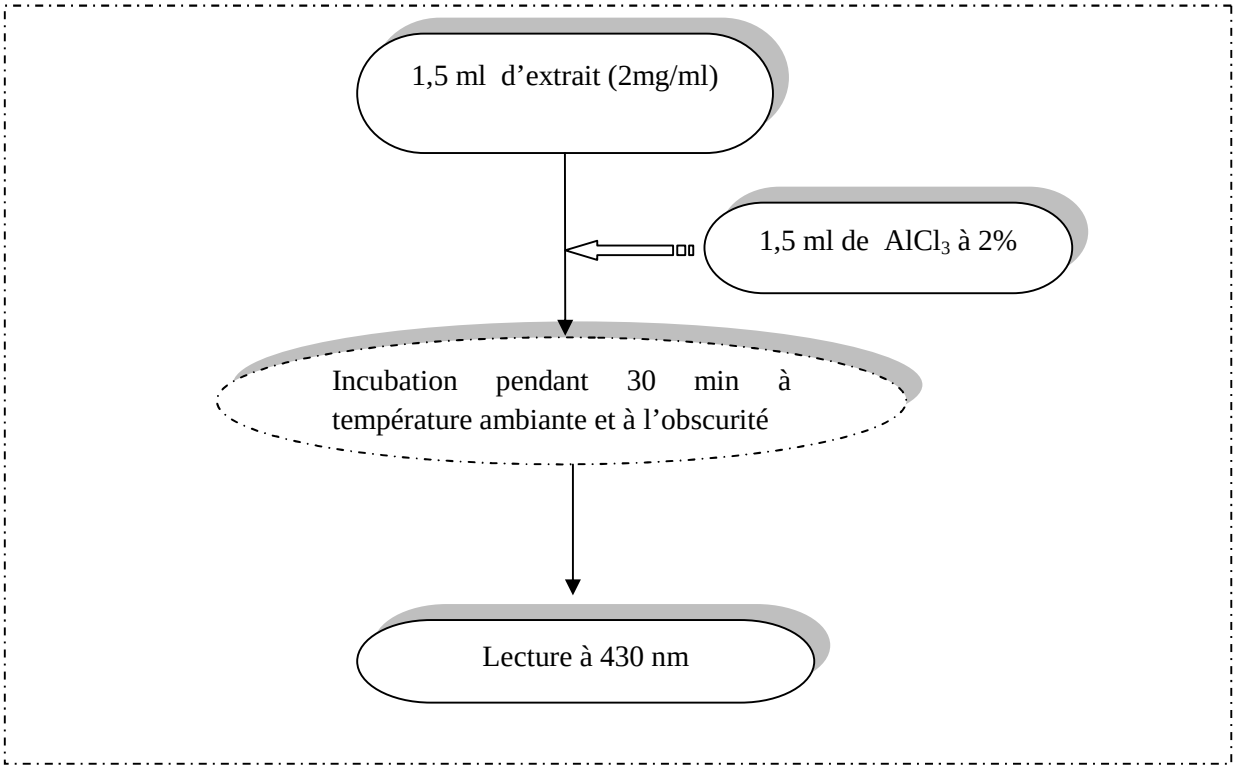


Figure 22: Procédure de dosage des flavonoïdes totaux.

*La concentration en flavonoïdes des extraits bruts est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec de la quercétine comme standard (Figure 2, annexe II).
*La teneur moyenne en flavonoïdes est exprimée en mg équivalent quercétine par gramme d'extrait brut (mg EQ/ g EB).

IV. 5. 2. 1. Dosage des flavonols

La teneur en flavonols des différents extraits a été déterminée par la méthode colorimétrique modifiée (Figure 23) décrite par Abdel –Hameed (2009).

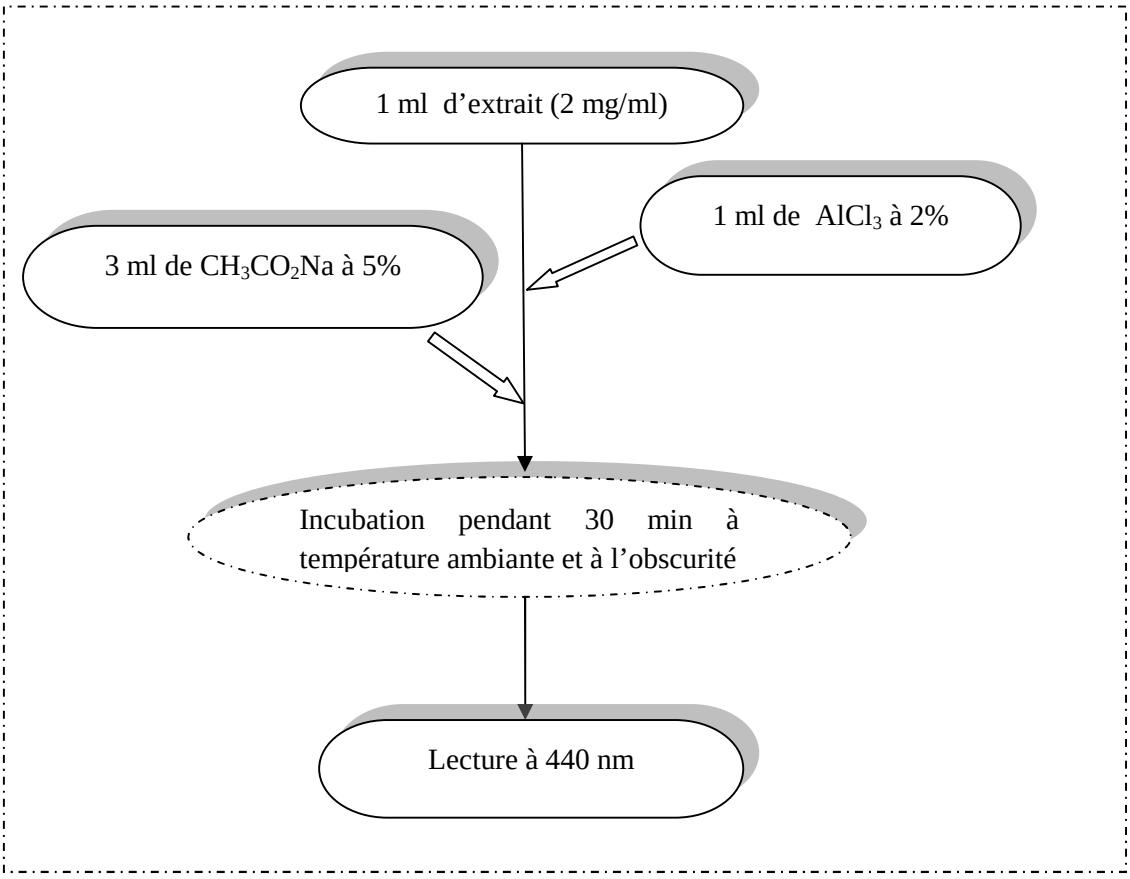


Figure 23: Procédure de dosage des flavonols.

*La concentration en flavonols des extraits bruts a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage établie avec la quercétine comme standard (figure 3, annexe II).

*La teneur moyenne en flavonols est exprimée en mg équivalent quercétine par gramme d'extrait brut (mg EQ/ g EB).

IV. 5. 3. Dosage des tannins

Les teneurs en tannins ont été déterminées selon le protocole de Hagerman and Butler (1978). Le protocole détaillé du dosage est schématisé sur la figure (24).

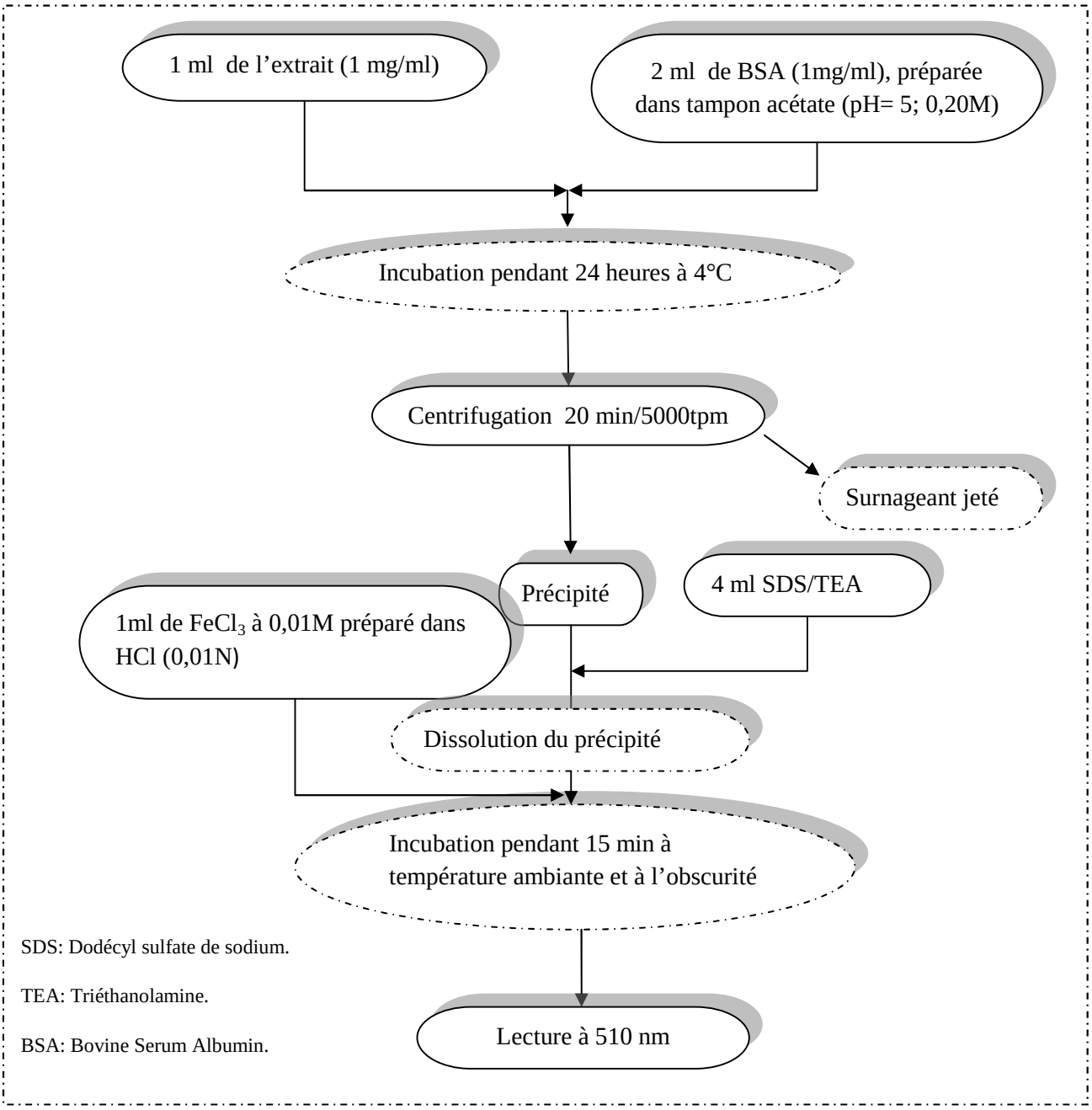


Figure 24: Procédure du dosage des tannins.

*La concentration en tannins des différents extraits a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage préparée avec de l'acide tannique (figure 4, annexe II).

*La teneur moyenne en tannins est exprimée en mg équivalent de l'acide tannique par gramme d'extrait brut (mg EAT/ g EB).

IV. 6. Evaluation des activités biologiques des différents extraits

IV. 6. 1. Activité antioxydante

Les méthodes évaluant l'activité antioxydante ont connu un intérêt important vue la recherche des substances antioxydantes naturelles. Les activités étudiées dans le présent travail sont le pouvoir réducteur, le pouvoir antiradicalaire de $DPPH^{\bullet}$ et l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène.

IV. 6. 1. 1. Pouvoir réducteur

La détermination du pouvoir réducteur a été réalisée selon la méthode de Oyaizu (1986) décrite par Hseu et ses collaborateurs 2008 avec une légère modification. Le protocole d'évaluation du pouvoir réducteur des différents extraits ainsi que celui des standards (BHA et l' α-tocophérol) est illustré par la figure (25).

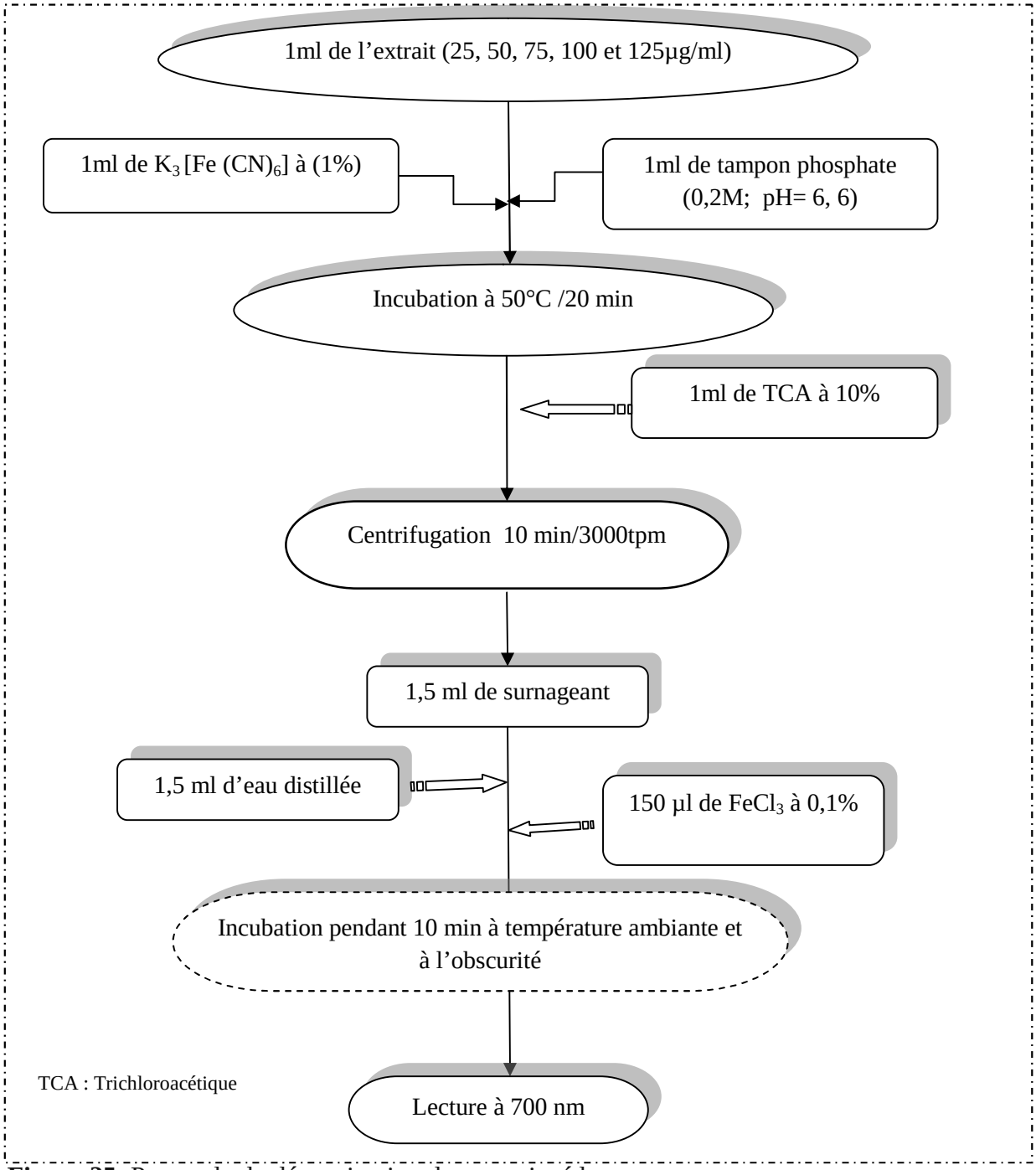


Figure 25: Protocole de détermination du pouvoir réducteur.

IV. 6. 1. 2. Effet scavenger du radical DPPH•

L'effet scavenger du radical DPPH• des extraits, ainsi que les standards (BHA et α-tocophérol) est estimé selon la méthode de Brand Williams *et al.* (1995) décrite par Suja et ses collaborateurs 2005. Le protocole d'évaluation du pouvoir antiradicalaire est illustré par la figure (26).

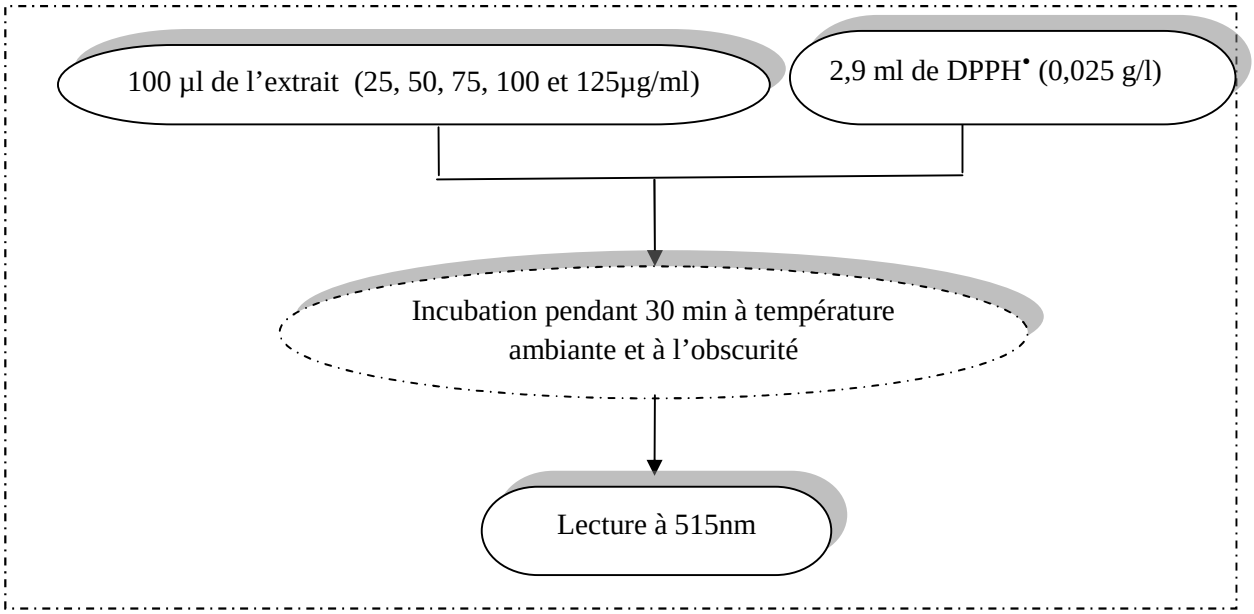


Figure 26: Protocole d'étude de l'activité antiradicalaire.

**Le pourcentage de réduction du radical DPPH• est donné par l'expression suivante:

$$\text{Activité antiradicalaire}\,(\%) = \frac{(A_T - A_E)}{A_T} \times 100$$

(Gülçin *et al.*, 2003).

Où :

A_T : Absorbance du témoin après 30 min d'incubation ;

A_E : Absorbance de l'échantillon après 30 min d'incubation

IV. 6. 1. 3. Activité réductrice du peroxyde d'hydrogène

L'activité réductrice du peroxyde d'hydrogène par les différents extraits, et les standards (BHA et l'α-tocophérol) est déterminée selon la méthode décrite par Ruch *et al*. (1989) in Sfahlan et ses collaborateurs (2009) avec certaines modifications. Le protocole est illustré par la figure suivante :

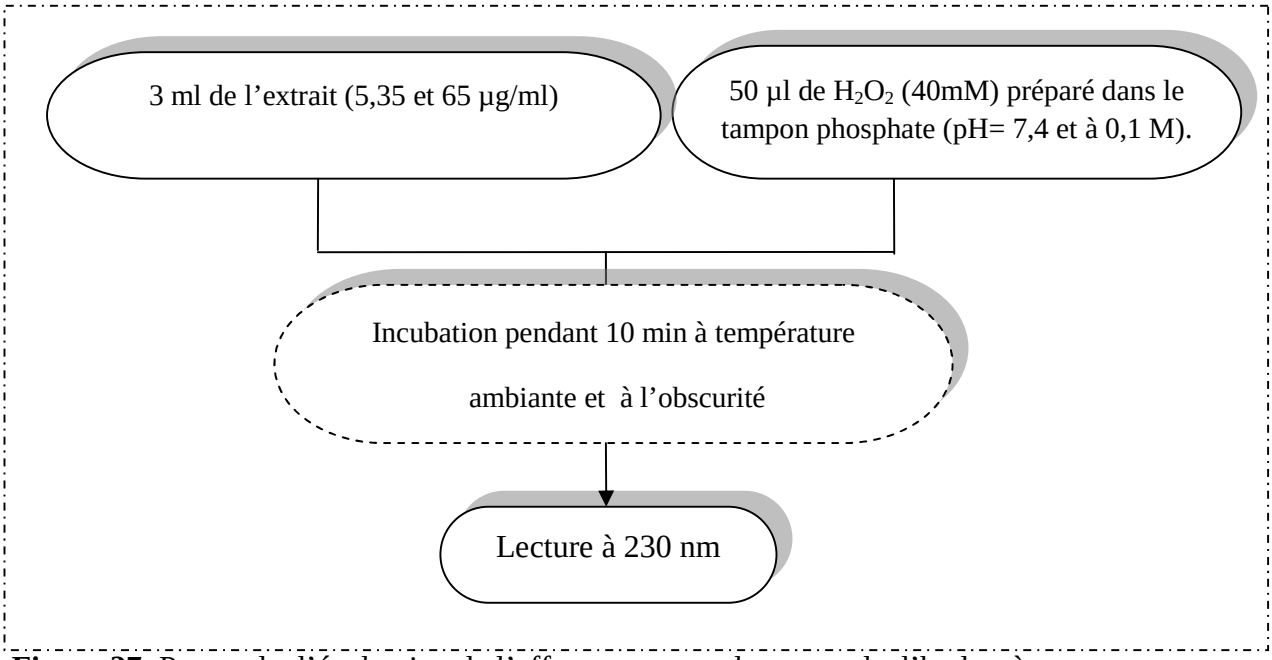


Figure 27: Protocole d'évaluation de l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène.

**Le pourcentage de réduction de peroxyde d'hydrogène est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ Scavenger du } H_2O_2 = \frac{(A_T - A_E)}{A_T} \times 100$$

Où :

A_T : Absorbance de témoin après 10 min d'incubation;

A_E : Absorbance de l'échantillon après 10 min d'incubation.

IV. 6. 2. Activité antibactérienne

Seuls les extraits bruts des différents échantillons ont subi le test de l'activité antibactérienne.

➢ **Les souches bactériennes testées**

Trois souches de référence ont servi à l'étude de l'activité antibactérienne des extraits. Ces bactéries ont été sélectionnées en fonction de leur pouvoir pathogène pour l'Homme.

Bactéries à Gram positif

-*Staphylococcus aureus* ; ATCC 6538 (SAIDAL- Antibiotical);

-*Bacillus subtilis*; ATCC 6633 (SAIDAL Antibiotical);

Bactéries à Gram négatif

-*Klebsiella pneumoniae* ; E47 (Laboratoire de Microbiologie Alimentaire de l'Université de Bejaia).

*** 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:

✓ Préparation d'une suspension bactérienne à partir d'une culture jeune (18 à 24 heures) préparée dans de l'eau physiologique (8,5% de NaCl);

✓ 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),

✓ Ensemencement en surface de 0,1 ml de chaque dilution à l'aide d'un râteau étaleur sur la PCA (Plate Count Agar);

✓ Dénombrements, après incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures.

IV. 6. 2. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits

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).

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 Petri 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 (6 mm de diamètre) sont déposés dans des boîtes de Petri stériles (vides) puis imprégnés avec un volume de 20 µl des différents extraits de plante (préparés dans du méthanol 80%) à différentes concentrations (25, 50, 75 et 100 mg/ml). Le témoin négatif est préparé avec du méthanol (80%). Des disques d'acide gallique et d'acide tannique préparés aux mêmes concentrations que les extraits ont été également testés;
- ✓ 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.

IV. 6. 2. 2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu solide

Le principe de cette procédure consiste à introduire des solutions d'antibiotique dans un milieu gélosé maintenu à 45°C puis coulé en boîte de Petri. Après solidification et séchage, les suspensions bactériennes sont ensuite déposées à l'aide d'une anse calibrée (Chevalier *et al*., 2003; Meyer *et al.*, 1999). La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la plus faible concentration d'antibiotique qui inhibe toute croissance visible à l'œil nu après 18 à 24 heures d'incubation (Chevalier *et al*., 2003; Kablan *et al*., 2008).

Les CMI sont déterminées uniquement pour les extraits qui ont montré une activité *vis-à-vis* des souches testées (Biyiti *et al*., 2004; More *et al*., 2008). Les CMI de la présente étude sont déterminées selon la procédure de Zampini *et al*., (2005). Un millilitre de chaque extrait ou composé de synthèse phénolique préparé dans le méthanol 80 % est mélangé avec neuf millilitres de milieu Mueller-Hinton en surfusion et l'ensemble est coulé en boîte de Petri stériles. 10 µl d'inoculum de 10^6 UFC/ml sont déposés en spot après solidification du milieu. La gamme de concentrations testée varie de 10 à 2000 µg/ml. Par la suite, les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. La première boîte dans laquelle il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice.

IV. 6. 2. 3. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB)

La CMB est définie comme la plus faible concentration d'antibiotique permettant une destruction notable de l'inoculum bactérien initial (0,01% ou 0,1 % de survivants) (Kablan *et al*., 2008; Meyer *et al.*, 1999).

Afin de déterminer la concentration minimale bactéricide des extraits de *E. globulus* et des composés phénoliques purs, des tubes de bouillon nutritif ont été ensemencés par un prélèvement effectué au niveau du spot en commençant de la boîte qui a déterminé la CMI de la série de concentration testée. La CMB est déterminée après une incubation de 18 à 24 heures. Le premier tube dans lequel il n'ya plus de trouble dû à la croissance détermine la concentration minimale bactéricide.

IV. 7. Analyse statistique

Trois essais ont été effectués pour chaque test à l'exception des CMI. Les moyennes et les écarts types ont été calculés par le logiciel Excel. Une analyse statistique est faite par l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur pour le test d'humidité et les différents dosages. Quant à l'analyse statistique des résultats de l'activité antioxydante et antibactérienne a été réalisée par l'analyse de la variance à deux facteurs par le logiciel STATISTICA 5.5 Fr. Le degré de signification des résultats est pris à la probabilité $p < 0,05$. Les coefficients de corrélation ont été déterminés par le même logiciel.

V. Résultats et discussions

La présente étude s'articule sur trois parties, la première concerne les résultats du rendement de l'extraction, du fractionnement et des différents dosages. La deuxième partie est relative à l'analyse des résultats des différentes activités antioxydantes quant à la dernière, elle concerne les résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts.

V. 1. Taux d'humidité des différents échantillons

Le test d'humidité est réalisé dans le but d'estimer la teneur en eau des différentes parties de la plante médicinale *Eucalyptus globulus*.

Les résultats de ce test sont présentés dans le tableau V, des différences significatives sont constatées (p<0,05) entre les différents échantillons, le taux d'humidité le plus faible (18,80 %) est noté pour l'écorce et les taux les plus élevés sont enregistrés pour les fruits et les feuilles avec des teneurs de (57,14 %) et (51,47 %), respectivement.

Tableau V: Taux d'humidité des différentes parties de *E. globulus*.

Echantillons	Feuilles	Ecorce	Fruits
Taux d'humidité (%)	51,47 ± 0,59	18,80 ± 0,93	57,14 ± 0,10

La teneur en eau dépend de la partie de la plante : feuilles, fruits ou écorce. Le taux d'humidité pour les fruits et les feuilles varie de 80 à 91 %. Tandis que, celui de l'écorce est assez faible, il oscille entre 11 et16 % (Maisuthisakul *et al*., 2007).

La faible teneur en eau enregistrée pour l'écorce peut être due à la nature des tissus constituants cet échantillon. Lűttge et collaborateurs (2002) rapportent qu'au cours de la croissance des arbres, l'écorce s'isole des autres tissus de la plante, et se trouve ainsi privée des éléments nutritifs et de l'eau, ce qui conduit à la mort des cellules qui la constitue, par conséquent l'écorce se déchire et se détache en plaques, en lanières ou en écailles selon les espèces. L'écorce ainsi éliminée est continuellement renouvelée.

Le séchage des échantillons aussitôt après leur récolte est une étape très importante qui sert à éliminer l'eau libre afin d'assurer leur conservation dans des conditions favorables. En effet, le séchage immédiat du matériel végétal permet de garantir une bonne conservation des échantillons pendant un certain temps sans modification de leur paramètres physicochimiques, car le séchage inhibe d'une part les enzymes responsables de la dégradation des polyphénols telles que: les polyphénoloxydases et d'autre part il empêche la prolifération bactérienne (Adrian *et al.*, 1998; Nicolas et Billaud, 2006; Ribérau-Gayon, 1968; Wichtl et Anton, 2003).

Le choix de la température 40 °C pour le séchage dans la présente étude est tiré de la littérature (Kablan *et al*., 2008). En effet, les températures très élevées peuvent engendrer la dégradation de substances thermolabiles telles que les polyphénols et les vitamines (Wichtl et Anton, 2003). Le temps de séchage des échantillons étudiés est de deux jours pour l'écorce, quatre et cinq jours pour les feuilles et les fruits, respectivement.

V. 2. Extraction des polyphénols

L'extraction des composés phénoliques à partir du matériel végétal est influencée par leur structure chimique, la méthode d'extraction, la taille des particules formant l'échantillon, le temps et les conditions de stockage ainsi que la présence d'interférents (Naczk and Shahidi, 2004). De plus, il est difficile de développer une procédure d'extraction souhaitable pour ces métabolites secondaires ou pour une classe spécifique de ces composés (Naczk and Shahidi, 2006; Robbins, 2003).

Le solvant est l'un des paramètres qui peut affecter l'extraction des polyphénols (Troszyńska *et al*., 2002). L'extraction peut s'effectuer par plusieurs solvants tels que : l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone (Ribérau-Gayon, 1968; Spignon *et al*., 2007). Par ailleurs, les solvants aqueux donnent les meilleurs rendements d'extraction que les solvants absolus (Ribérau-Gayon, 1968; Spignon *et al*., 2007). Le système acétone-eau (70 : 30, v/v) est l'un des systèmes les plus utilisés pour l'extraction des polyphénols car d'une part il permet d'extraire des teneurs considérables en polyphénols comparé à l'éthanol et au méthanol aqueux (Troszyńska *et al*., 2002) et d'autre part ce système limite l'extraction d'autres composés comme les polysaccharides et les peptides (Awika *et al*., 2004; Wang *et al*., 2009). Dans cette étude, l'acétone aqueux (70 %) a été choisi comme solvant d'extraction en se basant sur des travaux antérieurs réalisés sur la composition phénolique de *E. globulus* ainsi que ceux réalisés sur l'optimisation du solvant qui extrait la classe de polyphénols rencontrée dans la plante étudiée. Toutes les études menées sur cette dernière ont révélé sa richesse en tannins hydrolysables (Conde *et al*., 1997; Cruz *et al*., 2005; González *et al*., 2004; Kim *et al*., 2001; Wichtl et Anton, 2003), et le meilleur solvant qui extrait cette classe de polyphénols à partir du matériel végétal est l'acétone aqueux (70%) comparé au méthanol aqueux (70%) (Lei, 2002; Peng *et al*, 1991).

La délipidation est une étape souhaitable, effectuée par un solvant apolaire comme l'hexane ou l'éther de pétrole, afin d'éliminer les cires, les lipides, les terpènes, les différents

pigments à savoir les chlorophylles et les caroténoïdes qui peuvent interférer avec les étapes ultérieures (Naczk and Shahidi, 2004; Naczk and Shahidi, 2006; Naczk *et al*., 2006 ; Yu *et al.*, 2005).

V. 3. Taux d'extraction

Les rendements de l'extraction des différentes parties de la plante étudiée sont regroupés dans le tableau VI.

Tableau VI: Taux d'extraction des polyphénols des différentes parties de *E. globulus*

Echantillons	Feuilles	Ecorce	Fruits
Taux d'extraction (g/100g de poudre)	24,73	10,09	30,83

D'après les chiffres obtenus, le rendement d'extraction varie d'une partie de la plante à une autre. Le rendement le plus élevé est noté pour les fruits (30,83 %) suivi des feuilles avec un taux de 24,73 % tandis que le taux le plus faible est observé pour l'écorce (10,09 %).

Les données bibliographiques ont rapporté que les fruits et les graines donnent les rendements d'extraction les plus élevés comparés aux autres parties de la plante telles que les feuilles et les fleurs. En effet, les fruits et les graines sont considérés comme des organes de réserve des végétaux (Maisuthisakul *et al*., 2008). De plus, le degré de polarité des composés antioxydants peut être à l'origine de la variabilité du rendement de l'extraction (Marinova and Yanishlieva, 1997).

Dans la présente étude, le taux d'extraction de l'écorce est dix fois supérieur à celui rapporté par Vázquez *et al*. (2008), cela est dû peut être au solvant utilisé et/ou à la méthode d'extraction en elle-même (Falleh *et al.*, 2008).

V. 4. Résultats du fractionnement des extraits bruts par chromatographie sur colonne

La colonne chromatographique Sephadex LH-20 est largement utilisée pour le fractionnement des extraits naturels des plantes (Chirinos *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2005; Kosar *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Naczk *et al*., 2006; Soong and Barlow, 2005; Troszyńska *et al*., 2002; Zin *et al.*, 2006) dans le but de purifier l'extrait brut et d'éliminer les fractions à activité antioxydante limitée avant la caractérisation par CLHP (Cruz *et al.*, 2005).

Les absorbances à 280 nm nous ont permis l'assemblage des fractions qui présentent les mêmes densités optiques et le nombre de fractions ainsi obtenu est de l'ordre de trois pour chaque extrait brut. Ces fractions sont désignées ainsi : Fraction A, Fraction B et Fraction C.

V. 5. Teneurs en composés phénoliques des différents extraits

V. 5. 1. Teneurs des différents extraits en polyphénols totaux

La méthode de Folin-Ciocalteu est l'une des méthodes adoptées dans la plupart des travaux concernant les antioxydants naturels, elle est considérée comme étant la meilleure méthode pour la quantification des polyphénols totaux (Spignon *et al*., 2007). Cette méthode repose sur la capacité d'un phénol à réduire le réactif Folin-Ciocalteu de couleur jaune constitué de l'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolipdique en milieu alcalin, en un mélange de tungstène et de molybdène de couleur bleue, dont l'absorbance maximale est comprise entre 700-760 nm (Ribérau-Gayon *et al.*, 1982; Siger *et al*., 2008).

Les teneurs en polyphénols totaux exprimées en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait brut sont représentées dans la figure 28.

D'après les résultats obtenus, les polyphénols sont présents dans les différentes parties de la plante étudiée mais avec des teneurs variables d'une partie à une autre. L'étude statistique montre des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents extraits bruts. La teneur la plus élevée est notée pour l'écorce (518 ,88 ± 4,02 mg EAG/ g EB) suivie de celle des fruits et des feuilles (464,71 ± 1,52 mg EAG/ g EB); (432, 63 ± 4,59 mg EAG/ g EB), respectivement.

Zin *et al*. (2006) ont rapporté que les polyphénols au niveau de la plante se localisent dans différentes parties telles que l'écorce, les feuilles, les tiges, les fruits, les graines de pollen, les racines, les graines et les fleurs. D'autre part, la répartition de ces composés au sein de la même plante varie d'un organe à un autre et selon les stades physiologiques de leur développement (Macheix *et al.*, 2006). La variabilité de distribution des composés phénoliques dans les trois parties de *E. globulus* peut être due également à la régulation de leur synthèse et leur accumulation qui sont influencées par des facteurs environnementaux (climats, sol, …) (Close *et al*., 2004; Silvestre *et al.*, 1997), ainsi que par l'effet de la saison (Salminen *et al*., 1999; Salminen *et al*., 2004).

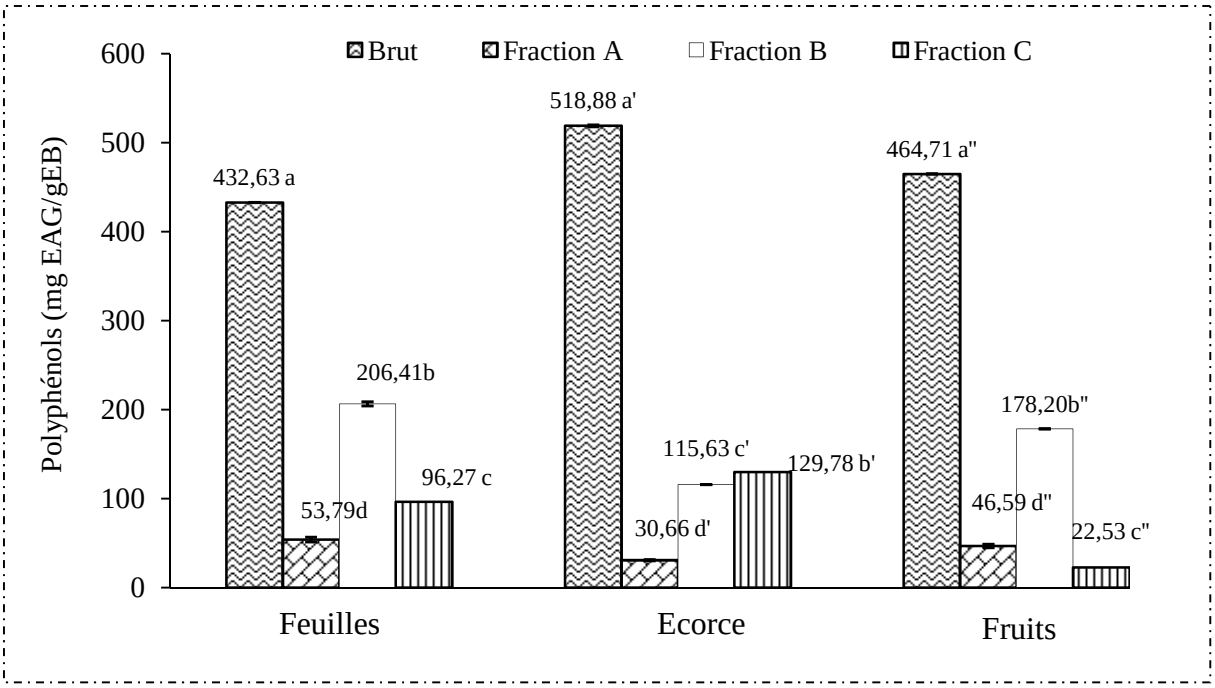


Figure 28: Teneur des différents extraits en polyphénols totaux.

- Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3).
- Les valeurs désignées par des lettres a, b, c, d présentent des différences significatives (p<0,05).
- Les valeurs désignées par des lettres a', b', c' d' présentent des différences significatives (p<0,05).
- Les valeurs désignées par des lettres a'', b'', c'', d'' présentent des différences significatives (p<0,05).
- Les barres verticales représentent les écarts-types.

Les résultats révèlent, également, que l'écorce présente la teneur la plus élevée en polyphénols néanmoins cet échantillon a montré un rendement assez faible comparé aux autres extraits. Maisuthisakul *et al*. (2008) ont rapporté que les extraits avec un rendement élevé ne présentent pas forcement des teneurs les plus importantes en polyphénols.

Les résultats illustrés par la figure 28 montrent que les teneurs en composés phénoliques de l'extrait brut des feuilles et de ses fractions correspondantes sont significativement différentes (p < 0,05), l'extrait brut possède la teneur la plus élevée (432, 63 ± 4,59 mg EAG/ g EB), suivi de la fraction B éluée avec le méthanol (206, 41 ± 2,81 mg EAG/ g EB). En revanche, la fraction C et la fraction A, ont présentées les teneurs les plus faibles (96,27 ± 2,33 mg EAG / g EB); (53, 79 ± 0,42 mg EAG / g EB), respectivement.

Atoui et ses collaborateurs (2005) ont trouvé une teneur de 113 ± 1,33 mg EAG / tasse (240 ml) d'infusion de feuilles de *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 de 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 le Eucalyptus A et Eucalyptus B, respectivement.

Les teneurs en polyphénols de l'extrait brut de l'écorce et ses fractions sont présentées dans la figure 28. Les résultats obtenus ont montré des différences significatives pour un seuil de $p < 0,05$. L'extrait brut a présenté la teneur la plus élevée (518 ,88 ± 4,02 mg EAG/ g EB), suivi de la fraction C (129, 78 ± 0,15 mg EAG/ g EB) éluée avec l'acétone (60 %) et de la fraction B (115,63 ± 0,79 mg EAG/ g EB) éluée avec le méthanol. Tandis que, la fraction A, éluée avec l'éthanol, révèle la teneur la plus faible (30,66 ± 1,14 mg EAG/ g EB).

Plusieurs auteurs ont déterminé la teneur en polyphénols des extraits de l'écorce de *E. globulus*. En utilisant le réactif Folin-Denis, González *et al*. (2004) ont détecté une quantité de 0,43 g EAG /100 g d'extrait sec. Par ailleurs, Cruz *et al*. (2005) ont retrouvé avec le même réactif une teneur de 10,1g EAG /100 g d'extrait obtenu après une hydrolyse acide. Vankar et ses collaborateurs (2006), en utilisant le réactif Folin –Ciocalteu, ont quantifié également la teneur en polyphénols totaux de l'écorce en utilisant trois méthodes d'extractions différentes: l'extraction avec le méthanol, avec l'eau et l'extraction avec un fluide supercritique. Ces auteurs ont enregistré une teneur de 0,038 µg équivalent catéchine / g d'extrait sec, pour l'extrait aqueux; des teneurs de 1,7 µg équivalent catéchine / g d'extrait sec et de 4,44 µg équivalent catéchine / g d'extrait sec, sont déterminées pour l'extrait méthanolique et celui issu de l'extraction par le fluide supercritique, respectivement.

Les différences observées entre les résultats des différents travaux et ceux obtenus dans cette étude peuvent être liées à la méthode d'extraction, au réactif adopté pour le dosage ou également au standard.

Les valeurs enregistrées pour le dosage des polyphénols totaux pour l'extrait brut des fruits et de ses fractions (figure 28) montrent des différences significatives ($p < 0,05$) d'un extrait à un autre.

Une quantité de 464, 71 ± 1,52 mg EAG/ g EB est déterminée pour l'extrait brut et un taux de 178,20 ± 2,14 mg EAG/ g EB pour la fraction B. Les teneurs les plus faibles sont notées pour la fraction A (46, 59 ± 0,23 mg EAG/ g EB) et pour la fraction C (22,53 ± 0,29 mg EAG/ g EB).

A ce jour, aucun travail n'a été rapporté dans la littérature sur la quantification des composés phénoliques des fruits de la plante *E. globulus*.

V. 5. 2. Teneurs en flavonoïdes totaux et en flavonols des différents extraits bruts

Les flavonoïdes constituent la classe la plus abondante des polyphénols dans la nature (Kumaran and Karunakaran, 2007). Le principe de leur dosage repose sur la propriété de ces composés à chélater les ions aluminium. En présence du chlorure d'aluminium, le complexe flavonoïdes-Al peut se former entre les ions Al et les atomes d'oxygène portés par les carbones 4 et 5 des flavonoïdes. La couleur jaune ainsi obtenue est proportionnelle à la quantité de flavonoïdes dans l'extrait (Berset, 2006; Djeridane *et al*., 2006; Lagnika, 2005; Ribérau-Gayon, 1968).

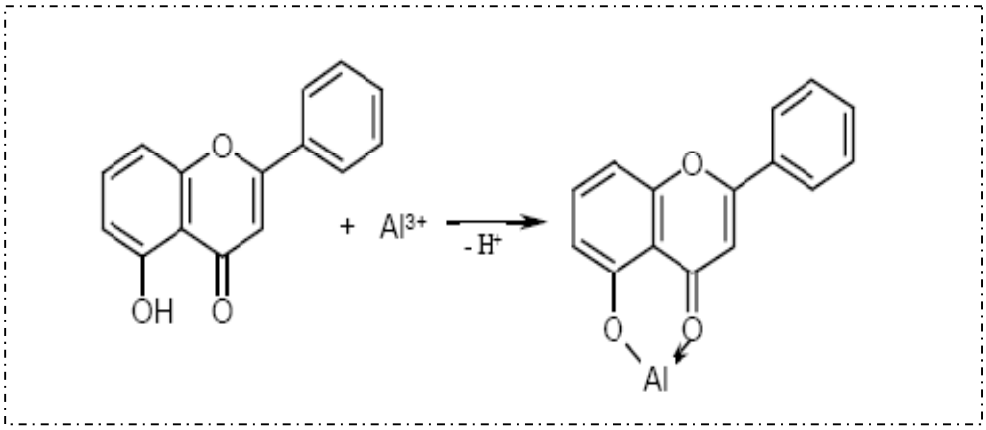


Figure 29 : Chélation de l'ion aluminium par les flavonoïdes (Lagnika, 2005).

Les teneurs en flavonoïdes totaux et en flavonols de différentes parties de la plante sont exprimées en mg EQ/ g EB. Les résultats obtenus sont élucidés sur la figure 30.

D'après les résultats obtenus, les flavonoïdes sont présents dans les trois parties de la plante. L'étude statistique a révélé des différences significatives ($p<0,05$) entre les différentes parties. Comme pour le dosage des polyphénols totaux, l'écorce dévoile la teneur la plus élevée (4,76 ± 0,02 mg EQ/ g EB) suivie des feuilles (3,65 ± 0,02 mg EQ/ g EB) et des fruits (2,99 ± 0,01 mg EQ/ g EB). Ces résultats indiquent également que la répartition des flavonoïdes au sein de la plante n'est pas uniforme.

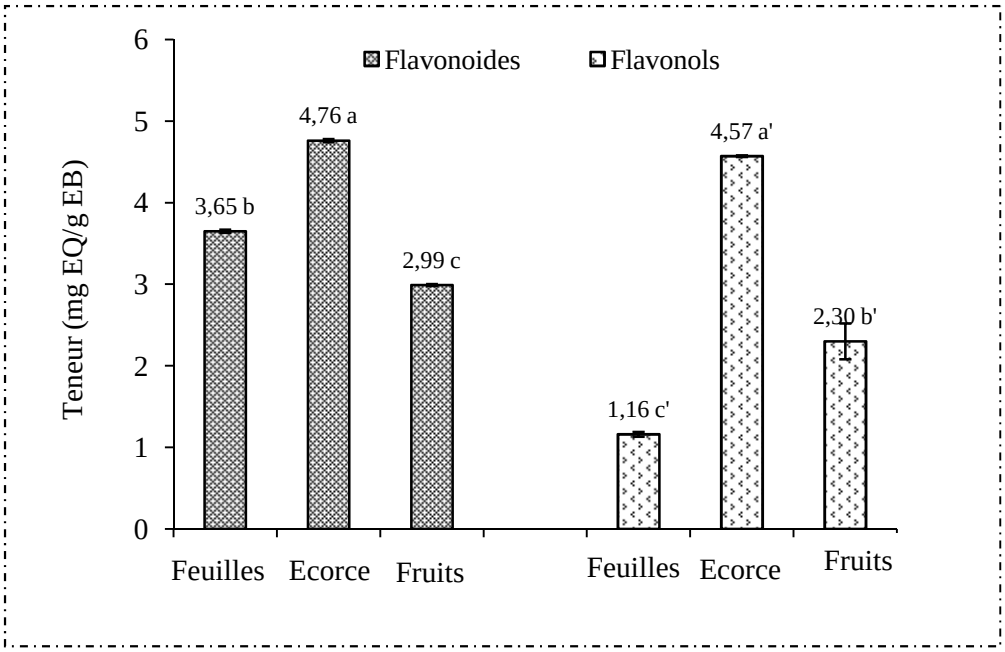


Figure 30: Teneur des différents extraits bruts en flavonoïdes totaux et en flavonols.

- Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3).
- Les valeurs désignées par des lettres a, b, c, d présentent des différences significatives (p<0,05).
- Les valeurs désignées par des lettres a', b', c' d' présentent des différences significatives (p<0,05).
- Les barres verticales représentent les écarts-types.

Les flavonoïdes sont présents chez les angiospermes et chez beaucoup de gymnospermes (Arct and Pytkowska, 2008; Hadi, 2004). De plus, ces composés se localisent dans les différentes parties de la plante: les parties aériennes jeunes (jeunes feuilles, boutons floraux), fruits, graines, écorce et les racines (Hadi, 2004; Heim *et al.*, 2002). Au niveau des cellules, les flavonoïdes sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux (Hadi, 2004).

D'autre part, tous les extraits bruts contiennent des flavonols (figure 30), la teneur la plus élevée est enregistrée pour l'extrait de l'écorce (4,57 ± 0,01 mg EQ/ g EB) environ 96 % de flavonoïdes totaux, suivie de celle de l'extrait des fruits (2,30 ± 0,22 mg EQ/ g EB) avec un taux de 76 % de flavonoïdes totaux. Or, l'extrait des feuilles possède la teneur la plus faible (1,16 ± 0,03 mg EQ/ g EB) qui correspond à un taux de 31 % de flavonoïdes totaux.

Les flavonols est l'une des classes de flavonoïdes la plus répandue dans le règne végétal (Chira *et al.*, 2008), la quercétine et le kaempférol sont les prédominants dans les fruits et légumes, et sont généralement rencontrés sous la forme *O*-glucosidique (Chira *et al.*, 2008; Pietta, 2000).

Aucun des travaux sont publiés sur l'aspect quantitatif des flavonoïdes de la plante *E. globulus*, néanmoins, plusieurs investigations se sont basées sur la caractérisation de ces composés à partir des extraits de feuilles et de l'écorce. Vankar et ses collaborateurs (2006) ont identifié à partir de l'écorce 3 flavonoïdes qui sont le kaempférol, la quercétine, et la rutine. La naringénine a été détectée dans l'extraits de l'écorce obtenu suite à une hydrolyse acide (Cruz *et al*., 2005). Les flavonoïdes les plus abondants dans les feuilles sont essentiellement des flavonols aglycone (quercétine, myricétine et kaempférol) et glycosides tels que les dérivés de la quercétine (quercétine-3-glucoside, quercétine-3-rhamnoside); du kaempférol (kaempférol-3-rhamnoside, kaempférol-3-rutinoside) et de la myricétine: (myricétine -3-glucoside, myricétine-3-rutinoside) (Conde *et al*., 1997).Cependant, les flavonoides n'ont pas été détectés dans les fruits (Guo and Yang, 2006; Yang *et al*., 2007).

V. 5. 3. Teneurs en tannins des différents extraits

Les tannins est une autre classe de composés phénoliques, le dosage de cette catégorie de composés repose sur leur aptitude à se combiner avec les protéines telle que la BSA (Bovine Serum Albumin). Le chlorure ferrique ajouté réagit avec les tannins en milieu alcalin en formant un complexe de couleur violette dont le maximum d'absorbance est à 510 nm (Hagerman and Butler, 1978).

Les quantités en tannins des différents extraits sont exprimées en mg EAT /g d'extrait brut. Les résultats du dosage sont schématisés sur la figure 31.

Les résultats obtenus pour les extraits bruts montrent clairement que l'écorce possède la teneur la plus élevée (332,05 ± 9,31 mg EAT/g EB) suivie de celle des fruits (210, 15 ± 3,55 mg EAT/g EB). Les feuilles présentent la teneur la plus faible (105, 63 ± 3,65 mg EAT/g EB). Ces valeurs sont significatives différentes ($p<0,05$).

Des données bibliographiques rapportent la présence de tannins galliques, de proanthocyanidines, de tannins condensés et d'ellagitannins dans les feuilles et dans l'écorce de *E. globulus* (Conde *et al*., 1997; Wichtl et Anton, 2003).

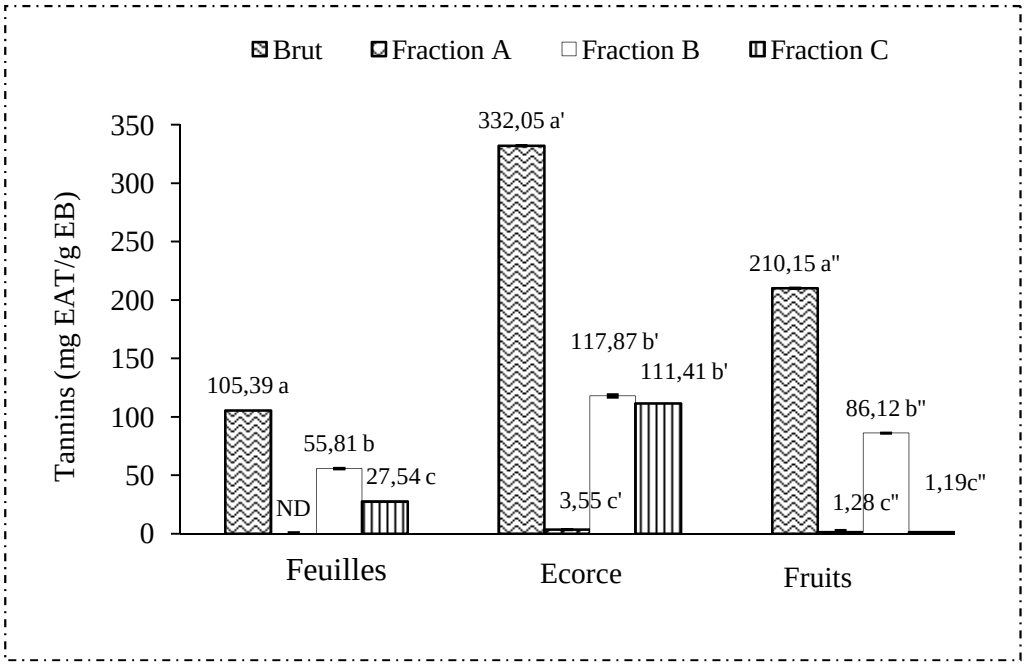


Figure 31: Teneur des différents extraits en tannins.

- Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais.
- Les valeurs désignées par des lettres a, b, c présentent des différences significatives (p<0,05).
- Les valeurs désignées par des lettres a', b', c' présentent des différences significatives (p<0,05).
- Les valeurs désignées par des lettres a", b", c" présentent des différences significatives (p<0,05).
- ND : non détecter.
- Les barres verticales représentent les écarts-types.

La fraction B et la fraction C des feuilles montrent des teneurs faibles par rapport à leur extrait brut correspondant avec des teneurs de 55,81 ± 0,96 mg EAT/g EB ; 27,54 ± 0,41 mg EAT/g EB; et 105,63 ± 3,65 mg EAT/g EB, respectivement. Ces teneurs sont statistiquement différentes (p<0,05) d'un extrait à un autre. Cependant, la méthode de dosage employée dans la présente étude n'a pas révélé de tannins dans la fraction A.

En ce qui concerne les teneurs détectées pour l'extrait brut de l'écorce et ses fractions, l'étude statistique n'a montré aucune différence significative (p<0,05) entre la fraction B et C. Toutefois, ces différences deviennent significatives (p<0,05) entre ces dernières et les autres extraits à savoir la fraction A et l'extrait brut. L'extrait brut est le plus riche en tannins (332,05 ± 9,31 mg EAT/g EB) suivi de la fraction B (117,87 ± 0,33 mg EAT/g EB), de la fraction C (111,41 ± 1,19 mg EAT/g EB) et en fin de la fraction A (3,54 ± 0,22 mg EAT/g EB).

Nack *et al.* (2006) ont obtenu une teneur importante en tannins condensés dans la fraction éluée avec l'acétone (50%) comparée à celle obtenue dans la fraction éluée avec l'éthanol dans les feuilles et les fruits d'airelle. Ces mêmes auteurs ont rapporté que l'acétone est le meilleur solvant pour l'extraction de tannins.

Des différences significatives ($p < 0,05$) sont notées entre l'extrait brut des fruits et ses différentes fractions et entre la fraction B et les deux autres fractions (A et C). Par contre, aucune différence significative ($p < 0,05$) n'est constatée entre la fraction A et la fraction C (figure 30). Les teneurs les plus faibles en tannins sont enregistrées pour la fraction C (1,19 ± 0,09 mg EAT/g EB) et la fraction A (1,28 ± 0,13 mg EAT/g EB), tandis que les teneurs les plus élevées sont obtenues pour la fraction B (86, 12 ± 1,51 mg EAT/g EB) et l'extrait brut (210,15 ± 3,55 mg EAT/g EB). Les deux travaux publiés sur la composition phénoliques de *E. globulus* n'ont pas rapporté l'existence de cette classe de polyphénols dans son fruit (Guo and Yang, 2006; Yang *et al*., 2007).

V. 6. Activités biologiques des différents extraits

V. 6. 1. Activité antioxydante

Il est important de sélectionner et d'employer des méthodes stables et rapides dans le but d'évaluer l'activité antioxydante. Plusieurs méthodes ont été développées afin d'estimer l'activité antioxydante. Les méthodes adoptées dans ce travail sont le pouvoir réducteur, l'activité antiradicalaire de $DPPH^{\bullet}$ et l'effet scavenger de H_2O_2.

V. 6. 1. 1. Pouvoir réducteur

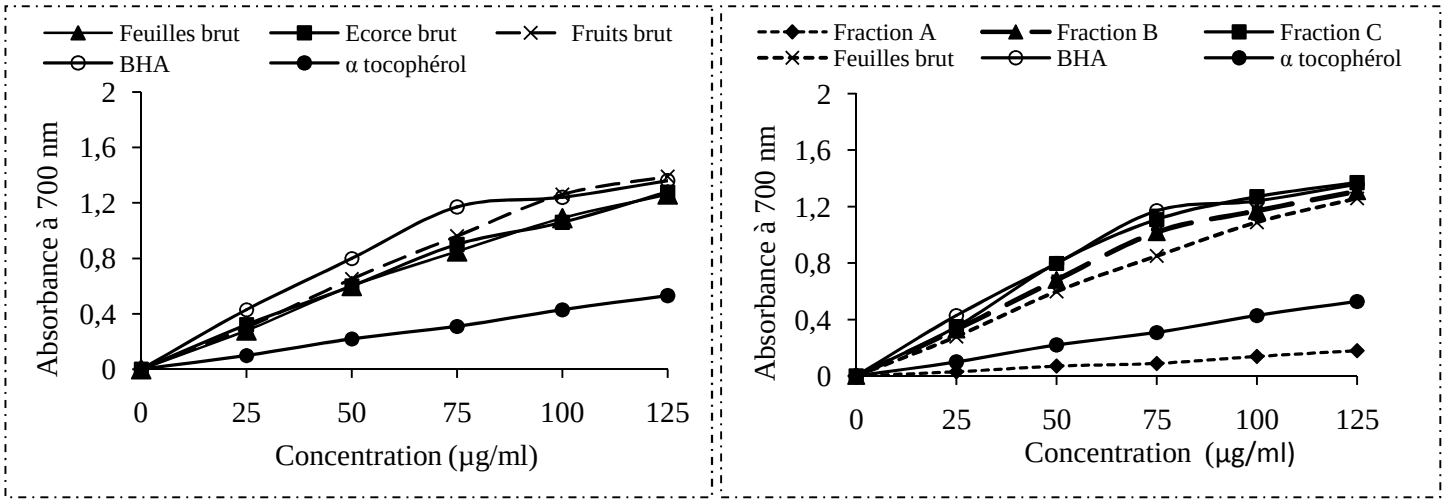
Le pouvoir réducteur est l'une des méthodes utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des plantes médicinales (Liu *et al*., 2008). Elle repose sur la capacité d'un extrait ou d'un composé à réduire le $Fe^{3+}(CN^-)_6$ en $Fe^{2+}(CN^-)_6$. L'addition de Fe^{3+} libre à $Fe^{2+}(CN)_6$ conduit à la formation du complexe $Fe_4[\ Fe(CN)_6]_3$ de couleur bleue qui présente un maximum d'absorbance à 700 nm. L'absorbance du mélange est proportionnelle à l'intensité de la couleur (Le *et al*., 2007; Rahim *et al*., 2008).

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits et des standards (α-tocophérol et BHA) à différentes concertations (25 à 125 µg /ml) sont schématisés sur les figures (32) et (33). Les courbes tracées montrent que le pouvoir réducteur est significativement ($p < 0,05$) proportionnel à la concentration de l'extrait. De ce fait, les extraits bruts, les fractions ainsi que les standards contribuent à la réduction du fer ferrique en fer ferreux; ce qui est en accord avec les résultats obtenus dans la littérature (Gűlçin *et al*., 2003; Le *et al*., 2007; Othman *et al*., 2007).

La figure (32A) montre le pouvoir réducteur des extraits bruts et des standards. Les absorbances obtenues oscillent entre 0,43 et 1,36 pour le BHA, entre 0,28 et 1,26 pour l'extrait brut des feuilles, entre 0,32 et 1,28 pour l'écorce et entre 0,30 et 1,39 pour l'extrait brut des fruits. L'α-tocophérol a relevé les absorbances les plus faibles (0,10 à 0,53).

L'analyse statistique ($p < 0,05$) a permis de classer leur pouvoir réducteur selon l'ordre décroissant suivant : BHA > fruits brut > écorce brut = feuilles brut > α-tocophérol.

Gűlçin et ses collaborateurs (2004) ont noté également une capacité réductrice très élevée du BHA comparée aux extraits aqueux et éthanoliques de la lavande et des clous de girofle étudiés, par contre l'α-tocophérol avait un pouvoir faible par rapport à l'extrait éthanolique des clous de girofle et de l'extrait aqueux de la lavande.



(A) Pouvoir réducteur des extraits bruts et des standards.

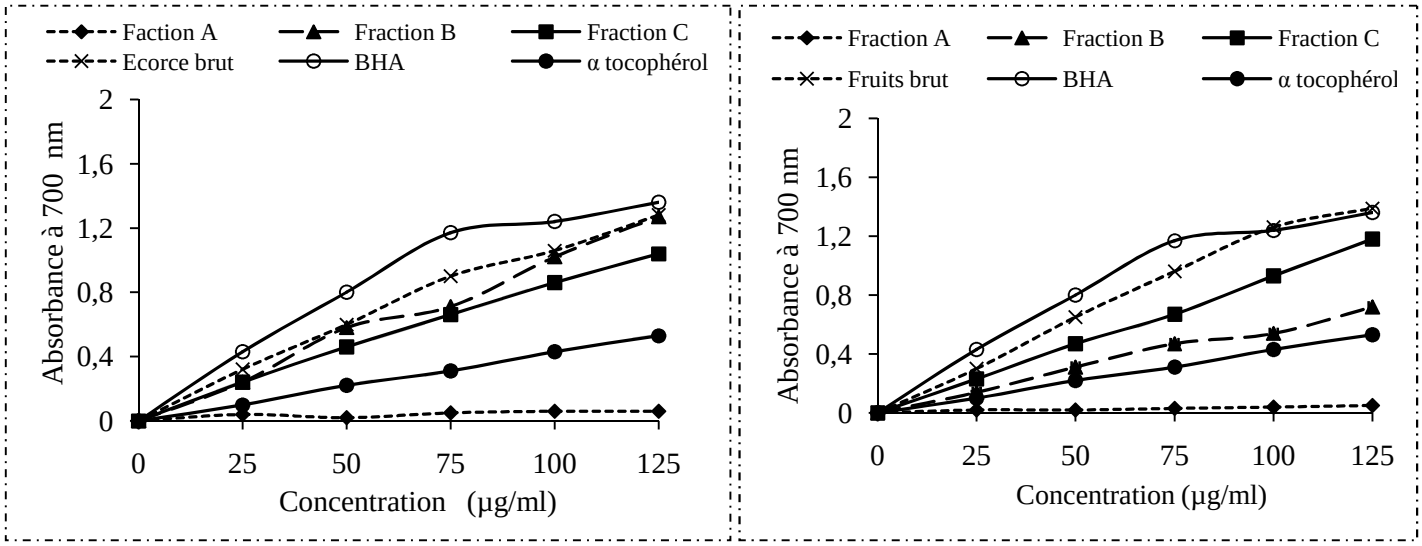
(B) Pouvoir réducteur des différents extraits des feuilles et des standards.

Figure 32 : Pouvoir réducteur des extraits bruts, des feuilles et des standards.

Le pouvoir réducteur des fractions des feuilles (figure 32 B) varie d'une fraction à une autre. Le potentiel le plus faible a été enregistré pour la fraction A où de très faibles absorbances ont été notées (0,03 à 0,18). Tandis que la fraction C présente approximativement les mêmes absorbances que le BHA. Le brut et la fraction B révèlent un pouvoir réducteur significativement supérieur ($p < 0,05$) à celui de la fraction A et du standard α-tocophérol.
Le pouvoir réducteur de l'extrait brut des feuilles et de ses fractions est classé comme suit : BHA > fraction C > fraction B > feuilles brut > α-tocophérol > fraction A.

La figure (33 A) illustre les capacités réductrices de l'extrait issu de l'écorce et de ses fractions. La fraction A a exprimé le pouvoir le plus faible dont l'absorbance varie de 0,04 à 0,06: même si la concentration de l'extrait augmente, les absorbances demeurent très faibles ne dépassant pas 0,1. La fraction C et la fraction B présentent des effets supérieurs ($p < 0,05$) par rapport à l'α-tocophérol. L'extrait brut de l'écorce a montré un pouvoir de réduction du fer ferrique en fer ferreux supérieur à celui de ses fractions correspondantes.

Les potentiels réducteurs des différents extraits et des standards sont comme suit : BHA > écorce brut > fraction B > fraction C > α-tocophérol > fraction A.



(A) Pouvoir réducteur des différents extraits de l'écorce et des standards.

(B) Pouvoir réducteur des différents extraits des fruits et des standards.

Figure 33 : Pouvoir réducteur des extraits de l'écorce, des fruits et des standards.

Les valeurs obtenues pour les extraits issus des fruits (figure 33 B) montrent une fois de plus que la fraction A éluée avec l'éthanol, est la moins active (les absorbances oscillent entre 0,02 et 0,05) comparée aux autres extraits et aux standards. La fraction B et la fraction C ont exprimé des potentiels réducteurs significativement ($p < 0,05$) supérieurs à ceux de α-tocophérol et inférieurs à ceux de l'extrait brut et du BHA.

Les potentiels réducteurs des différents extraits et des standards sont comme suit : BHA > fruits brut > fraction C > fraction B > α-tocophérol > fraction A.

Ces résultats montrent que tous les extraits testés exercent un pouvoir réducteur supérieur à celui de l'α-tocophérol et inférieur au potentiel réducteur du BHA à l'exception de la fraction A des différents extraits bruts qui a montré un pouvoir assez faible.

***Détermination de $CR_{0,5}$**

La capacité réductrice ($CR_{0,5}$) est définie arbitrairement comme étant la concentration du substrat qui donne une absorbance de 0,5 à 700 nm. Elle est obtenue à partir d'une courbe de régression linéaire (Bourgou *et al*., 2008; Le *et al*, 2007). Les valeurs des $CR_{0,5}$ exprimées en (µg/ml) des différents extraits sont regroupées dans le tableau (VII). Le BHA a montré la valeur la plus faible (29,89 ± 1,14 µg/ml) quant à la fraction A de l'écorce, elle a présenté la valeur la plus importante (2337,50 ± 12,50 µg/ml).

Tableau VII: Les $CR_{0,5}$ du pouvoir réducteur des différents extraits et des standards.

Extraits	**$CR_{0,5}$ (µg/ml)**
Extrait brut feuilles, ses fractions et standards	
Feuilles brut	$43,17 \pm 0,71^{d}$
Fraction A	$363,57 \pm 2,14^{f}$
Fraction B	$37,19 \pm 0,67^{c}$
Fraction C	$33,41 \pm 0,47^{b}$
BHA	$29,89 \pm 1,14^{a}$
α -tocophérol	$117,76 \pm 2,36^{e}$
Extrait brut écorce, ses fractions et standards	
Ecorce brut	$40,74 \pm 1,45^{b'}$
Fraction A	$2337,50 \pm 12,50^{e'}$
Fraction B	$49,27 \pm 0,67^{b',c'}$
Fraction C	$55,82 \pm 0,95^{c'}$
BHA	$29,89 \pm 1,14^{a'}$
α -tocophérol	$117,76 \pm 2,36^{d'}$
Extrait brut des fruits, ses fractions et standards	
Fruits brut	$39,52 \pm 1,76^{b''}$
Fraction A	$1242,50 \pm 2,50^{f''}$
Fraction B	$86,42 \pm 0,56^{d''}$
Fraction C	$54,02 \pm 0,07^{c''}$
BHA	$29,89 \pm 1,14^{a''}$
α -tocophérol	$117,76 \pm 2,36^{e''}$
Extraits bruts et standards	
Feuilles brut	$43,17 \pm 0,71^{c'''}$
Ecorce brut	$40,74 \pm 1,45^{b''',c'''}$
Fruits brut	$39,52 \pm 1,76^{b'''}$
BHA	$29,89 \pm 1,14^{a'''}$
α -tocophérol	$117,76 \pm 2,36^{d'''}$

- Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3).
- Les valeurs désignées par des lettres a, b, c, d, e, f présentent des différences significatives ($p<0,05$).
- Les valeurs désignées par des lettres a', b´, c´, d´, e´, f´ présentent des différences significatives ($p<0,05$).
- Les valeurs désignées par des lettres a", b", c", d", e", f" présentent des différences significatives ($p<0,05$).
- Les valeurs désignées par des lettres a'", b'", c'", d'" présentent des différences significatives ($p<0,05$).

V. 6. 1. 2. Activité antiradicalaire des extraits

La méthode du DPPH$^{\bullet}$ est très utilisée pour évaluer l'activité antioxydante des extraits de plantes (Hseu *et al*., 2008). Le DPPH$^{\bullet}$ (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyle) est un radical libre stable capable de capter un proton ou un élection (Gordon, 2001; Hseu *et al*., 2008; Wang *et al.*, 2007), afin de revenir à une molécule diamagnétiquement stable (Gűlçin *et al*., 2003; Kumaran and Karunakaran, 2007). L'activité scavenger du radical DPPH$^{\bullet}$ est déterminée avec la diminution de l'absorbance à 517 nm suite à la réduction du radical en présence d'un antioxydant (AH) ou d'une espèce radicalaire (R$^{\bullet}$) (Maisuthisakul *et al*., 2007; Villaño *et al*., 2007) selon les réactions suivantes :

$$DPPH^{\bullet} + AH \longrightarrow DPPH\text{-}H + A^{\bullet}$$

$$DPPH^{\bullet} + R^{\bullet} \longrightarrow DPPH\text{-}R$$

La diminution de l'absorbance se traduit par une décoloration de la solution méthanolique de DPPH$^{\bullet}$ du violet au jaune (Gűlçin *et al*., 2003; Magalhães *et al.*, 2008).

Les résultats de l'activité antiradicalaire des différents extraits et des standards exprimés en pourcentage sont illustrés par la figure (34) et figure (35). Les courbes tracées montrent que le pourcentage de l'activité antiradicalaire des extraits augmente en fonction de la concentration d'extrait. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de composés qui contribuent à la réduction du radical DPPH$^{\bullet}$.

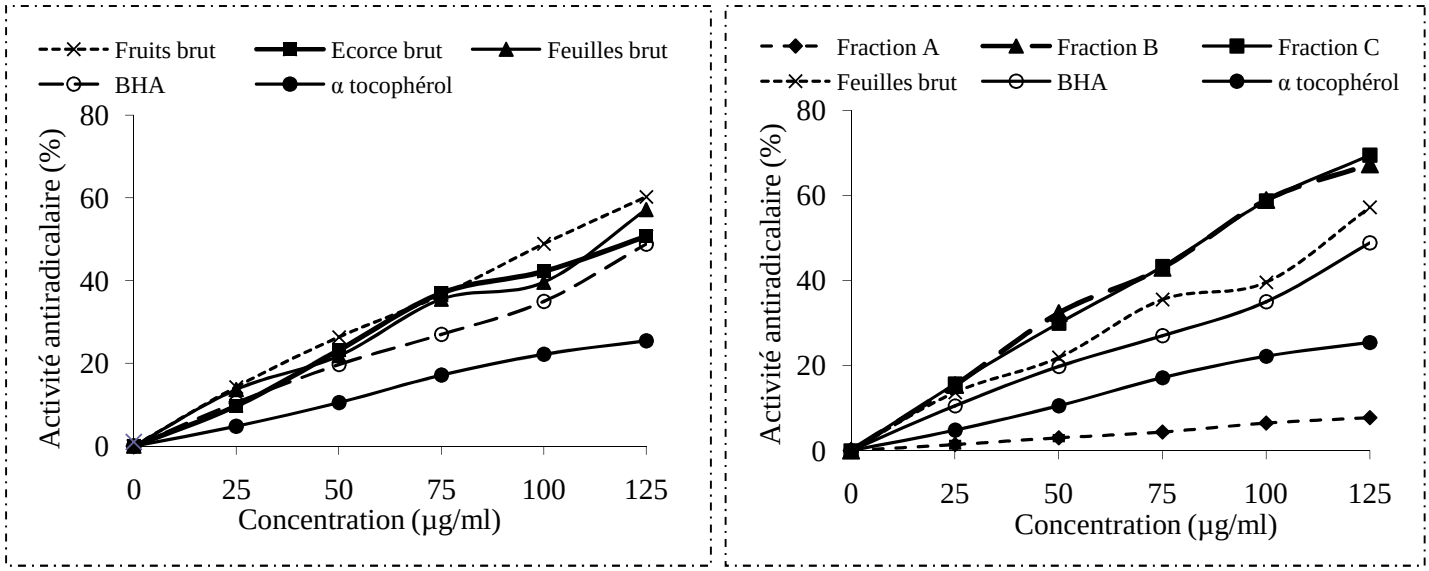
Plusieurs auteurs ont constaté que l'activité antiradicalaire est proportionnelle à la concentration des extraits de plantes (Gűlçin *et al*., 2003; Kumaran and Karunakaran, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Les résultats du pouvoir antiradicalaire des extraits bruts ainsi que ceux des standards (figure 34 A) indiquent que ces derniers contribuent à la diminution de l'absorbance de la solution méthanolique du radical DPPH$^{\bullet}$. L'étude statistique n'a révélé aucune différence significative ($p < 0,05$) entre l'extrait brut de l'écorce et celui des feuilles. Toutefois, des différences significatives ($p < 0,05$) ont été constatées entre ces deux extraits et l'extrait des fruits et les standards.

Les pourcentages obtenus varient de 10,54 % à 48,80 % pour le BHA et de 13,69 à 57,17 % pour les feuilles; ces valeurs sont de 9,78 % à 50,72 % pour l'écorce et de 14,34 à 60,30 % pour l'extrait brut des fruits. Les taux les plus faibles sont enregistrés pour l'α-tocophérol dont le pourcentage de réduction varie de 4,79 à 25,44 %.

L'analyse statistique ($p<0,05$) a permis de classer le pouvoir antiradicalaire des différents extraits selon l'ordre décroissant suivant: fruits brut > écorce brut = feuilles brut >BHA > α-tocophérol.

D'après ces résultats, les extraits bruts ont gardé le même ordre que celui du pouvoir réducteur. Cependant, le BHA a montré une activité plus faible par rapport aux extraits bruts contrairement à ce qui a été enregistré dans le test précédent.



(A) Activité antiradicalaire des extraits bruts et des standards.

(B) Activité antiradicalaire des extraits des feuilles et des standards.

Figure 34 : Activité antiradicalaire des extraits bruts, des feuilles et des standards.

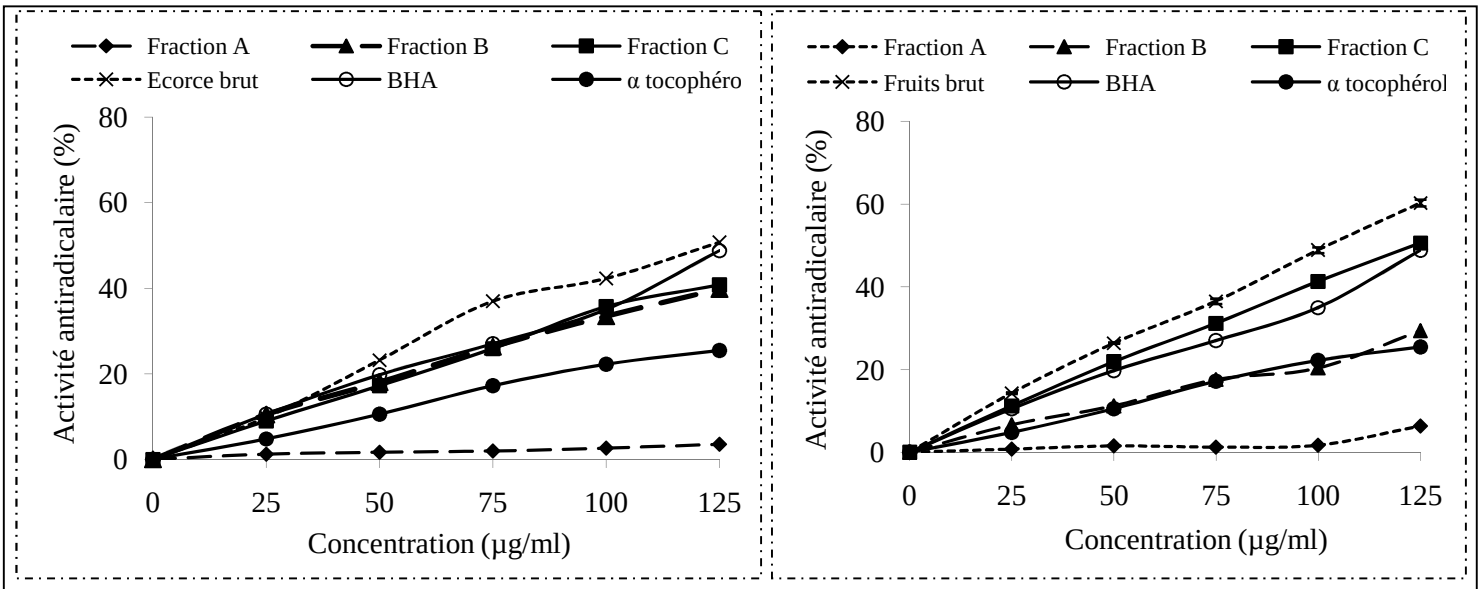
Comme pour les résultats du pouvoir réducteur, les pourcentages obtenus pour l'extrait brut des feuilles et de ses fractions correspondantes (Figure 34 B) montrent aussi que la fraction A a une très faible activité qui varie entre 1,40 et 7,70 % à différentes concentrations testées, comparée aux activités des autres fractions et des standards (BHA et de l'α-tocophérol).

La fraction C et la fraction B ont exprimé des effets significativement (p <0,05) élevés comparés à ceux de l'extrait brut, ces pourcentages oscillent entre 15,40 et 67,27 % pour la fraction B et entre 15,63 et 69,47 % pour la fraction C, toutefois ces fractions ont des faibles teneurs en polyphénols et en tannins en les comparant à celles de l'extrait brut.

Le pouvoir antiradicalaire de l'extrait brut des feuilles, de ses fractions et des standards sont classés comme suit : fraction C = fraction B > feuilles brut > BHA > α -tocophérol > fraction A.

Les résultats de l'activité antiradicalaire de l'écorce et ses fractions sont représentés dans la figure (35A). La fraction A a montré une faible activité qui varie de 1,16 à 3,25 %. La fraction B et la fraction C éluées respectivement avec le méthanol et l'acétone (60%) ont exercé une activité supérieure (10, 42 à 39 ,80 % et 8,96 à 40,76 %, respectivement) à celle de α-tocophérol. De même l'extrait brut de l'écorce a donné un pouvoir scavenger du DPPH$^{\bullet}$ plus élevé comparé à celui de ses fractions correspondantes.

L'analyse statistique (p< 0,05) a permis de classer l'effet antiradicalaire selon l'ordre décroissant suivant : écorce brut > BHA > fraction B = fraction C > α-tocophérol > fractionA.



(A) Activité antiradicalaire des extraits de l'écorce et des standards.

(B) Activité antiradicalaire des extraits des fruits et des standards

Figure 35: Activité antiradicalaire des extraits de l'écorce, des fruits et des standards.

Les résultats enregistrés pour l'extrait brut des fruits et ses fractions (figure 35 B) dévoilent que la fraction C et l'extrait brut ont exprimé des effets antiradicalaires importants, avec des différences statistiquement significatives ($p < 0,05$), par rapport à ceux du BHA, de la fraction B, de l'α-tocophérol et de la fraction A.

La fraction A éluée avec de l'éthanol pur a révélé une activité assez faible comparée aux autres extraits et standards avec des absorbances qui oscillent entre 0,78 et 6,36 % pour des concentrations d'extrait variant de 25 à 125 µg/ml.

Les activités antiradicalaires des différents extraits et des standards sont classées comme suit : fruits brut > fraction C > BHA > fraction B = α-tocophérol > fraction A.

La fraction C a présenté un effet scavenger assez fort qui varie de 11,24 à 50,62%, mais les dosages quantitatifs ont montré des teneurs assez faibles en tannins et en polyphénols totaux comparées à celles détectées pour la fraction A et la fraction B.

Ces résultats révèlent clairement que les extraits de *E. globulus* ont une activité antiradicalaire remarquable à l'exception de la fraction A des différents extraits qui a exprimé un pouvoir assez faible. Les polyphénols de ces extraits peuvent être impliqués dans la diminution de l'absorbance de la solution méthanolique de $DPPH^{\bullet}$.

***Détermination de CI_{50}**

La valeur CI_{50} (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 $DPPH^{\bullet}$. Les CI_{50} sont inversement proportionnelles à l'effet scavenger dont les valeurs faibles reflètent un effet anti-radicalaire important (Dasgupta and De, 2007; Maisuthisakul *et al*., 2007).

Les valeurs des CI_{50} exprimées en (µg/ml) sont regroupées dans le tableau (VIII). La fraction B et la fraction C des feuilles ont présenté les CI_{50} les plus faibles (87,77± 0,35 µg/ml) et (87,12 ± 0,51 µg/ml), respectivement. En revanche, la fraction A de l'écorce a montré la valeur la plus faible qui est de l'ordre de 2403,09 ± 0,31µg/ml.

Tableau VIII : Les CI_{50} du pouvoir antiradicalaire des différents extraits et des standards.

Extraits	CI_{50} (µg/ml)
Extrait brut feuilles, ses fractions et standards	
Feuilles brut	$114,25 \pm 0,58^{b}$
Fraction A	$754,06 \pm 9,02^{d}$
Fraction B	$87,77 \pm 0,35^{a}$
Fraction C	$87,12 \pm 0,51^{a}$
BHA	$134,26 \pm 1,55^{c}$
α -tocophérol	$233,78 \pm 1,00^{e}$
Extrait brut écorce, ses fractions et standards	
Ecorce brut	$115, 40 \pm 1,38^{a'}$
Fraction A	$2403,09 \pm 0,31^{f'}$
Fraction B	$158, 61 \pm 1,68^{d'}$
Fraction C	$148, 26 \pm 0,95^{c'}$
BHA	$134, 26 \pm 1,55^{b'}$
α -tocophérol	$233,78 \pm 1,00^{e'}$
Extrait brut des fruits, ses fractions et standards	
Fruits brut	$102, 78 \pm 1,39^{a''}$
Fraction A	$1067,07 \pm 3,07^{f''}$
Fraction B	$227,97 \pm 0,15^{d''}$
Fraction C	$123,04 \pm 0,50^{b''}$
BHA	$134,26 \pm 1,55^{c''}$
α-tocophérol	$233,78 \pm 1,00^{e''}$
Extraits bruts et standards	
Feuilles brut	$114,25 \pm 0,58^{b'''}$
Ecorce brut	$115, 40 \pm 1,38^{b'''}$
Fruits brut	$102, 78 \pm 1,39^{a'''}$
BHA	$134,26 \pm 1,55^{c'''}$
α-tocophérol	$233,78 \pm 1,00^{d'''}$

- Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3).
- Les valeurs désignées par des lettres a, b, c, d, e présentent des différences significatives ($p<0,05$).
- Les valeurs désignées par des lettres a', b', c' d, e', f' présentent des différences significatives ($p<0,05$).
- Les valeurs désignées par des lettres a", b", c", d", e", f " présentent des différences significatives ($p<0,05$).
- Les valeurs désignées par des lettres a'", b'", c'", d'" présentent des différences significatives ($p<0,05$).

V. 6. 1. 3. Activité scavenger du peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce réactive de l'oxygène non radicalaire formée *in vivo* sous des conditions physiologiques par les peroxysomes, par plusieurs systèmes enzymatiques oxydants (glucose oxydase) et par la dismutation de l'ion superoxyde catalysée par la superoxyde dismutase (Magalhães *et al.*, 2008). Le H_2O_2 seul n'est pas réactif mais il peut se transformer en radical hydroxyle très toxique pour la cellule (Gűlçin *et al.*, 2003; Kumaran and Karunakaran, 2007).

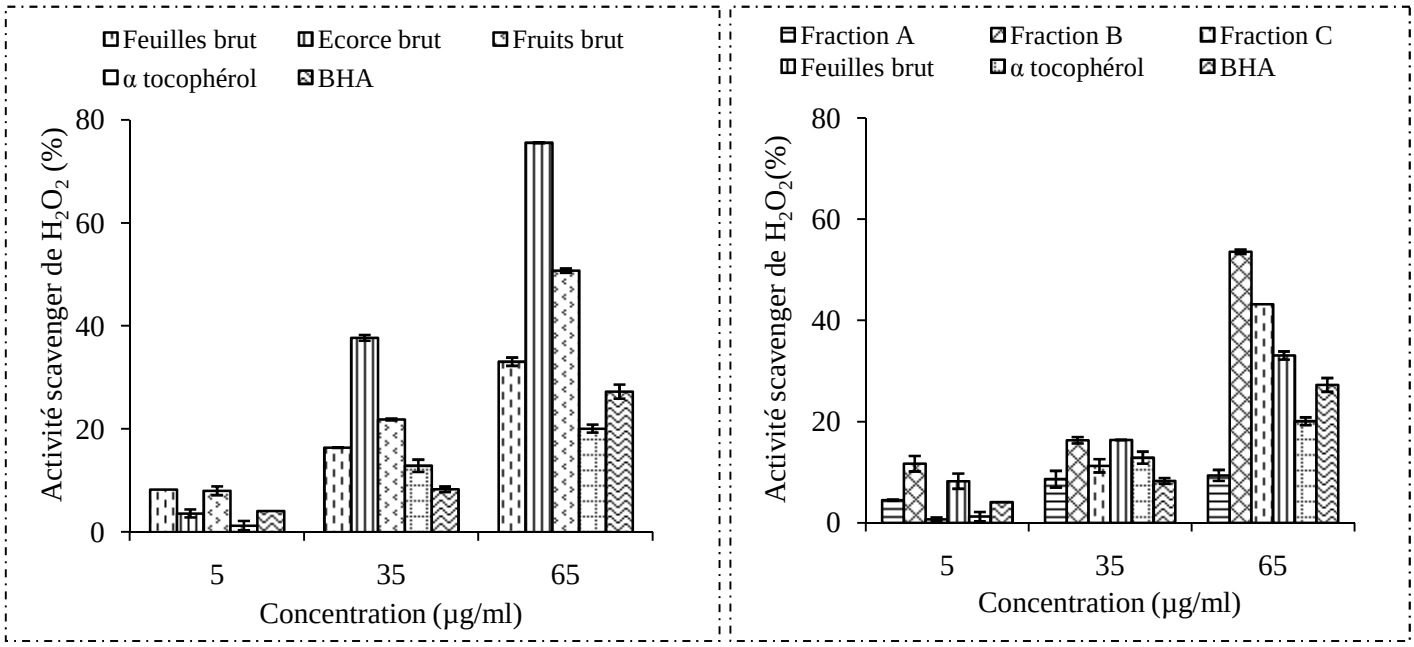
Le principe de la méthode adoptée dans ce travail est basé sur la mesure de l'absorbance de H_2O_2 dans l'ultraviolet (230 nm). La concentration peroxyde d'hydrogène diminue en présence de l'extrait et par conséquent l'absorbance diminue (Magalhães *et al.*, 2008).

Les pourcentages d'inhibition du peroxyde d'hydrogène des différents extraits et des standards à différentes concentrations testées (5 à 65 µg/ml) sont présentés dans la figure (36) et figure (37). D'après les courbes tracées le pourcentage scavenger de H_2O_2 augmente avec la concentration de l'extrait (Kumaran and Karunakaran, 2007, Wang *et al.*, 2007).

Les résultats de la figure (36 A) indiquent que les extraits bruts ainsi que les standards possèdent la capacité de diminuer la concentration de H_2O_2. A une concentration de 65 µg/ml, cette activité diffère significativement ($p < 0,05$) d'un échantillon à un autre. Contrairement aux résultats du pouvoir réducteur et de l'activité antiradicalaire où l'extrait brut des fruits présentait la meilleure activité, dans ce test c'est l'extrait issu de l'écorce qui montre la meilleure activité (75,55 %) suivie de celle de l'extrait des fruits (50,74%) puis celle d'extrait des feuilles (33,06 %) à 65 µg/ml. Les taux les plus faibles enregistrés sont ceux du BHA (27,25 %) et de l'α-tocophérol (20,07%).

L'analyse statistique ($p<0,05$) a permis de classer l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène selon l'ordre décroissant suivant : écorce brut > fruits brut > feuilles brut > BHA > α-tocophérol.

L'effet important enregistré pour l'écorce peut être lié à sa teneur élevée en tannins et en flavonoïdes par rapport aux autres extraits bruts. Il a été rapporté que la quercétine, la catéchine, les esters de l'acide gallique et caféique interviennent dans la réduction du peroxyde d'hydrogène (Kumaran and Karunakaran, 2007).



(A) Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par les extraits bruts et des standards.

(B) Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par les extraits des feuilles et des standards.

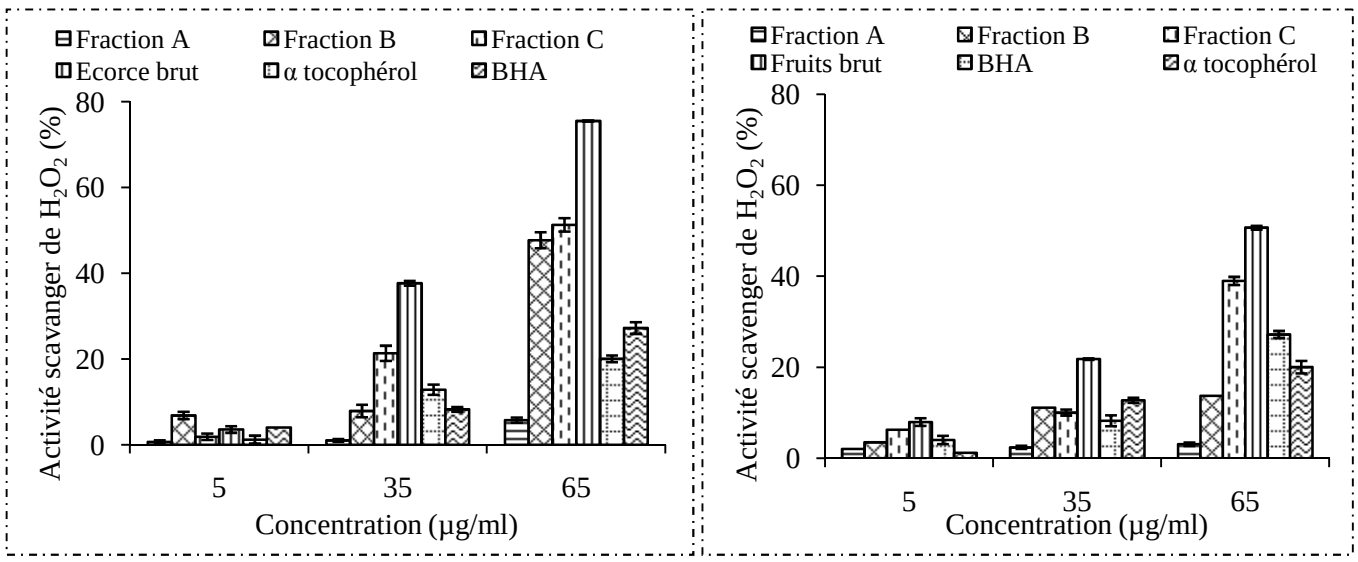
Figure 36: Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par les extraits bruts, des feuilles et des standards.

Les activités réductrices enregistrées pour l'extrait brut des feuilles et ses fractions (figure 36 B) à 65 µg/ml dévoilent des différences significatives (p< 0,05) d'un extrait à un autre. La fraction B (53, 58%) et la fraction C (43, 20 %) ont exprimé des effets supérieurs à ceux du brut, du BHA, et de l'α-tocophérol. En revanche, la fraction A éluée avec l'éthanol a révélé également une activité assez faible comme dans le cas des autres tests (pouvoir réducteur et activité antiradicalaire) comparée aux autres extraits et standards avec un pourcentage de (9,36 %) à 65 µg/ml.

L'analyse statistique (p<0,05) a permis de classer l'effet scavenger de peroxyde d'hydrogène selon l'ordre décroissant suivant : fraction B > fraction C > feuilles brut > BHA > α-tocophérol > fraction A.

Les résultats obtenus pour l'extrait de l'écorce et ses fractions sont illustrés par la figure (37 A). La fraction A a donné un pourcentage de 5,79 % à 65 µg/ml. La fraction C et la fraction B éluées respectivement avec le méthanol et l'acétone (60%) ont présenté des effets supérieurs (p< 0,05) à ceux de l'α-tocophérol avec des taux de 51, 33% ; 47,74% et 20,07 %, respectivement. L'extrait brut a exprimé un effet plus élevé (75,55%) comparé à ses fractions.

Dans la présente étude, l'effet scavenger du H_2O_2 par les extraits de l'écorce et des standards est classé selon l'ordre décroissant suivant: écorce brut > fraction C > fraction B > BHA > α -tocophérol > fraction A.



(A) Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par les extraits de l'écorce et des standards.

(B) Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par les extraits des fruits et des standards.

Figure 37 : Effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par les extraits d'écorce, des fruits et des standards.

Les résultats obtenus pour l'extrait brut des fruits et ses fractions (figure 37B) à 65 µg/ml révèlent des différences significatives ($p < 0,05$) entre les différents extraits. Le brut a montré l'effet le plus élevé (50,74 %) suivi de la fraction C (39,02 %). Tandis que, la fraction B et la fraction A ont montré des effets inférieurs à ceux des standards avec des taux de 13,78 % et de 3,14 %, respectivement.

L'analyse statistique ($p < 0,05$) a permis de classer l'effet scavenger de H_2O_2 par l'extrait brut des feuilles, de ses fractions et des standards selon l'ordre décroissant suivant : fruits brut >fraction C > BHA > fraction B > α -tocophérol > fraction A.

L'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène par les différents extraits peut être attribué à leurs composés phénoliques qui peuvent réduire le peroxyde d'hydrogène en eau selon la réaction suivante :

$$H_2O_2 + 2\,H^+ + 2\,e^- \longrightarrow 2\,H_2O$$ Wang *et al*. (2007)

Discussion générale

Les résultats issus des différents tests utilisés pour évaluer l'activité antioxydante ont révélé que les extraits bruts des fruits et de l'écorce ont exprimé une forte activité antioxydante comparée à leurs fractions. Cependant, la fraction C et la fraction B des feuilles ont montré des effets antioxydants supérieurs à l'extrait brut dont elles sont issues.
Cruz et ses collaborateurs (2005) ont rapporté que les fractions ou les extraits purifiés peuvent avoir des pouvoirs antioxydants plus élevés que l'extrait brut dont ils sont issus. De plus, ces résultats ont dévoilé que certaines fractions ont présenté des teneurs faibles en polyphénols et en tannins mais elles ont montré une forte activité c'est le cas de la fraction C des fruits où les quantités des polyphénols et de tannins sont respectivement (22,53 mg EAG/ g EB) et (1,19 mg EAT/g EB). Zin et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que c'est la fraction III des fruits (*Morinda citrifolia* L.) à faible teneur en polyphénols qui a exercé la plus forte activité antioxydante. De même, Maisuthisakul *et al*. (2008) ont noté que ce sont les extraits à teneur élevée en polyphénols qui ont montré la plus faible activité antioxydante.

Le faible potentiel antioxydant de la fraction A des différents extraits bruts peut être dû soit à la faible concentration en composés exerçant un pouvoir antioxydant soit à leur faible activité. 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'acide vanillique, acide *p*-coumarique, tyrosol, vanilline, syringaldéhyde et l'acide *p*-hydroxybenzaldehyde n'interviennent pas dans la réduction du radical $DPPH^{\bullet}$. Conde et ses collaborateurs (1997) ont noté la présence de la vanilline dans les extraits des feuilles de *E.globulus* obtenus avec le méthanol aqueux (80 %). D'autre part, Cruz *et al*. (2005) et González *et al*. (2004) ont rapporté la présence de la vanilline, syringaldéhyde et l'acide vanilique dans les extraits issus de l'écorce obtenus suite à une hydrolyse acide.

La fraction B et la fraction C issues des différents extraits bruts peuvent contenir des classes de polyphénols avec une activité antioxydante très importante, telles que les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins. Plusieurs travaux ont rapporté la présence de ces classes dans les feuilles et l'écorce de la plante *E. globulus*, tandis que peu de travaux sont réalisés sur la composition phénolique des fruits et les seuls polyphénols de cet organe sont des acides phénoliques tels que l'acide gallique, l'acide éllagique et ses dérivés (Guo and Yang, 2006; Yang *et al*., 2007).

Il a été rapporté que l'élution avec les alcools aqueux à partir du gel de Sephadex LH-20 permet de séparer les monomères, les dimères et les trimères. En revanche l'acétone aqueux est employé pour l'élution des polymères tels que les tannins (Nack *et al*., 2006).
Kosar *et al*. (2007) ont identifié, en utilisant CLHP couplée à la spectrométrie de masse, des anthocyanines et dérivés de l'acide gallique (comme l'acide di-gallique) dans la fraction éluée par l'éthanol, alors que la fraction éluée par l'acétone (50%) a révélé principalement la présence de tannins hydrolysables (gallotannins) et le pentagalloyl-glucose. Ces auteurs ont constaté également que les fractions éluées avec l'éthanol et l'acétone (50%) ont montré des activités antioxydantes remarquables dans le cas de l'inhibition de la peroxydation lipidique ainsi qu'une bonne activité antiradicalaire du $DPPH^{\bullet}$. En utilisant le gel Sephadex LH-20 pour le fractionnement de l'extrait de la capucine tubéreuse (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) suivi d'une identification des différentes fractions par CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes, Chirinos *et al*, (2008) ont identifié principalement, dans la fraction éluée par le méthanol aqueux (20%) ,l'épicatéchine et des dérivés des acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïques, tandis que la fraction éluée par le méthanol aqueux (60%) est constituée essentiellement d'anthocyanines alors que celle éluée par l'acétone aqueux (60%) contient des proanthocyanidines. L'hydrolyse acide et alcaline des différentes fractions révèlent la présence de l'épicatéchine, la gallo-catéchine, l'acide *p*-coumarique, l'acide *o*-cinnamique, l'acide cinnamique, la rutine et de la quercétine.

Suite à ces différents résultats, l'activité antioxydante de la fraction B peut être attribuée aux anthocyanines, aux flavonols et aux acides phénoliques principalement l'acide éllagique étant donné qu'il est l'acide prédominant dans les feuilles, l'écorce et les fruits de *E. globulus*.

L'activité antioxydante de la fraction C peut être liée à la présence de composés de haut poids moléculaire tels que les tannins hydrolysables (gallotannins), proanthocyanidines et les tannins condensés. La présence de ces différents composés dans les feuilles et l'écorce de la plante *E. globulus*, a été rapportée par plusieurs auteurs (Cruz *et al*., 2005; Vázquez *et al*., 2008 ; Wilth et Anton, 2003); ces composés sont connus par leurs capacités antioxydantes puissantes (Nakagawa and Yokozawa 2002; Siddhuraju, 2007; Spranger *et al*., 2008; Troskyńska *et al*., 2002). Alors que la fraction A des différents extraits peut contenir des composés tels que l'acide vanillique, l'acide *p*-coumarique et la vanilline vue leur pouvoir antioxydant assez faible rapporté par la bibliographie par rapport aux autres polyphénols.

V. 6. 1. 4. Corrélations entre les polyphénols et l'activité antioxydante

Il est intéressant d'établir des corrélations entre la teneur en polyphénols et l'activité antioxydante des différents extraits étudiés (Figure 5, annexe III). Dans la présente étude des corrélations positives ($p < 0,05$) ont été observées entre le taux de polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire (r = 0,58) ainsi que le pouvoir réducteur (r = 0,61) des différents extraits. Des corrélations positives ont été aussi retrouvées ($p < 0,05$) entre l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène et les polyphénols totaux (r = 0,65) de tous les extraits de *E. globulus*, ce qui est en accord avec les résultats rapportés par Abdel-Hameed (2009) et Kumaran and Karunakaran (2007).

Des corrélations positives ($p < 0,05$) ont été notées entre les tannins et l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène (r = 0,74) de tous les extraits étudiés. Cependant, des corrélations moyennes ont été révélées entre les tannins et l'activité antiradicalaire (r = 0,42) et entre les tannins et le pouvoir réducteur (r = 0,52) de tous les extraits de *E. globulus*. Les corrélations entre les tannins et les différents tests antioxydants montrent que les tannins contribuent plus à la réduction de H_2O_2 qu'à l'activité antiradicalaire de $DPPH^{\bullet}$ et du pouvoir réducteur. Des données bibliographiques rapportent que les tannins sont des inhibiteurs puissants de la peroxydation lipidique et des piégeurs de divers radicaux libres tels que ($NO^{\bullet}$, OH^- et O_2^-) (Berset, 2006; Nakagawa and Yokozawa, 2002).

L'activité antioxydante des polyphénols est principalement liée à leur propriété redox qui peut jouer un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène singulet ou la décomposition des peroxydes (Kumaran and Karunakaran, 2007).

V.6. 2. Activité antibactérienne

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).

Cette partie est consacrée aux résultats de l'activité antibactérienne des extraits bruts des fruits, de l'écorce et des feuilles de *E. globulus* sur trois bactéries qui sont *K. pneumoniae*, *S. aureus* et *B. subtilis*. Ces bactéries sont responsables de diverses pathologies chez l'Homme et elles sont aussi des agents des intoxications alimentaires :

* *K. pneumoniae* est une espèce responsable des infections opportunistes chez les malades fragilisés, elle cause des infections broncho-pulmonaires, urinaires, hépato-biliaires, d'angines, d'otites et des septicémies où le taux de mortalité par ces dernières est assez élevé. Cette espèce est également un agent d'intoxications alimentaires (Avril *et al*., 2000; Delarras, 2001; Fauchère et Avril, 2002; Guiraud, 2003).

* *S. aureus* est une espèce responsable de plusieurs infections nosocomiales telles que: les infections cutanées, viscérales, osseuses et d'otites. En plus de ces infections, *S. aureus* est aussi un agent de toxi-infections alimentaires (Fauchère et Avril, 2002).

* *B. subtilis* est une espèce responsable essentiellement des toxi-infections alimentaires. Cependant, plusieurs auteurs ont insisté sur la progression de cette bactérie dans l'apparition de plusieurs manifestations cliniques telles que l'otite, les infections urinaires, les septicémies et autres (Avril *et al*., 2000; Guiraud, 2003).

Les méthodes décrites dans la littérature pour l'évaluation de l'activité antibactérienne incluent:

1- La mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des disques imprégnés (où des puits contenant) d'un composé antibactérien;
2- L'inhibition du développement bactérien sur milieu gélosé contenant le composé antibactérien;
3- La méthode des concentrations minimales inhibitrices (CMI) en milieu liquide;
4- La variation de la densité optique du bouillon nutritif en présence d'une substance antibactérienne (Proestos *et al.*, 2006).

L'étude de l'activité antibactérienne dans la présente étude est portée sur la mesure du diamètre des zones d'inhibition suivie de la détermination des paramètres de la croissance bactérienne (CMI, CMB) des extraits actifs.

V. 6. 2. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de diffusion en milieu solide (méthode des disques)

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) ont classé l'activité antibactérienne des extraits testés ainsi que les composés purs comme suit :

- ✓ Diamètre de la zone d'inhibition < 1 mm: 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 (++++).

Le méthanol aqueux à 80 % (80 : 20, v/v) utilisé pour la dissolution des extraits bruts n'a pas montré un effet antibactérien sur les souches testées ce qui est en accord avec la constatation de Al-Zoreky (2009).

V. 6. 2. 1. 1. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts

Effet des extraits bruts sur *S. aureus

Les diamètres des zones d'inhibition sont rapportés dans le tableau IX, les aspects des colonies sont élucidés dans la figure 6 de l'annexe IV.

Tous les extraits testés ont un effet inhibiteur sur la croissance de l'espèce *Staphylococcus aureus.* Les diamètres des zones d'inhibition enregistrés oscillent entre (2,67 à 9 mm). Ces diamètres augmentent significativement ($p < 0,05$) avec la concentration de l'extrait.

Les diamètres des zones d'inhibition enregistrées varient de 2,67 à 5 mm pour l'extrait de l'écorce, de 5 à 8,67 mm pour l'extrait des fruits et de 5 à 9 mm pour les feuilles. L'étude statistique ($p < 0,05$) n'a révélé aucune différence significative entre l'effet antibactérien des feuilles et celui des fruits. Cependant, une différence significative est apparue entre ces extraits et celui de l'écorce. L'effet antibactérien le plus important est observé pour l'extrait des feuilles et des fruits qui sont caractérisés par une inhibition très forte pour la charge 2000 µg d'extrait brut par disque. Cependant, l'extrait de l'écorce a révélé une inhibition modérée à la même charge du disque.

Tableau IX: Effets des différents extraits bruts sur *S. aureus.*

	Extraits	Charge µg EB /disque	*Zone d'inhibition (mm)*
E. globulus	Feuilles	500	5,00 ± 0,00 (++)
		1000	6,33 ± 0,58 (+++)
		1500	8,00 ± 0,00 (+++)
		2000	9,00 ± 0,00 (++++)
	Ecorce	500	2,67 ± 0,58 (+)
		1000	3,33 ± 0,58 (+)
		1500	4,33 ± 0,58 (++)
		2000	5,00 ± 1,00 (++)
	Fruits		
		500	5,00 ± 0,00 (++)
		1000	6,00 ± 0,00 (+++)
		1500	7,67 ± 0,24 (+++)
		2000	8,67 ± 0,58 (+++)

Absence d'activité (-), DZI <1. Activité très faible (f), DZI=1. Activité faible (+), DZI (2-3 mm). Activité modérée (++),D ZI (4-5 mm). Activité forte (+++), DZI (6-9 mm). Activité très forte (++++),D ZI > 9 mm.

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux extraits de *E. globulus* est en accord avec plusieurs travaux. Takahashi *et al*. (2004) ont constaté un effet antibactérien remarquable des extraits issus des feuilles *E. maculata et E. viminalis* sur *S. aureus*, comparés aux extraits des autres espèces de *Eucalyptus*. Khan et ses collaborateurs (2009) ont obtenu une activité assez forte de l'extrait des feuilles de *E. globulus* (diamètre des zones d'inhibition varie de 16 à 25 mm) par rapport aux résultats de la présente étude. Egwaikhide et ses collaborateurs (2008) ont constaté un effet inhibiteur des extraits, méthanolique, héxanique et d'acétate d'éthyle, issus des feuilles *E. globulus* sur *S. aureus*. Les extraits de l'écorce obtenus après une hydrolyse acide ont présenté également un effet antibactérien sur cette souche (Cruz *et al*., 2001).

D'autres travaux ont révélé aussi la sensibilité de *S. aureus* à l'égard d'autres genres de la même famille que le *Eucalyptus* (Myrtaceae). Les extraits des feuilles de la goyave (*Psidium guajava)* et des clous de girofle (*Syzgium aromatica*) ont montré des effets inhibiteurs sur la croissance de *Staphylococcus aureus*, dont les diamètres des zones d'inhibition varient de 10 à 20 mm pour la goyave et de 21 à 30 mm pour les clous de girofle (Ahmad and Beg, 2001).

Effets des différents extraits bruts sur *B.s subtilis

Les diamètres des zones d'inhibition sont rapportés dans le tableau X. Les aspects des colonies sont regroupés dans la figure 7 l'annexe IV.

Tableau X: Effets des différents extraits bruts sur *B. subtilis.*

	Extraits	Charge µg EB /disque	*Zone d'inhibition (mm)*
E. globulus	Feuilles	500	-
		1000	-
		1500	-
		2000	-
	Ecorce	500	2,67 ± 0,58 (+)
		1000	3,67 ± 0,58 (++)
		1500	4,67 ± 1,15 (++)
		2000	5 ,33 ± 0,58 (++)
	Fruits		
		500	2,67 ±0,58 (+)
		1000	3,50 ± 0,50 (++)
		1500	4,33 ± 0,58 (++)
		2000	5,50 ± 0,50 (++)

Absence d'activité (-) , DZI <1. Activité très faible (f), DZI=1. Activité faible (+),D ZI (2-3 mm). Activité modérée (++), DZI (4-5 mm). Activité forte (+++), DZI (6-9 mm).Activité très forte (++++),D ZI > 9 mm.

Le diamètre des zones d'inhibition varient de 2,67 à 5,50 mm pour l'extrait des fruits et entre 2,67 à 5,33 mm pour l'extrait de l'écorce. L'étude statistique n'a révélé aucune différence significative ($p < 0,05$) entre l'effet antibactérien d'extrait de l'écorce et celui des fruits avec des diamètres des zones d'inhibition modérées à 2000 µg EB/disque. Le diamètre d'inhibition augmente significativement ($p < 0,05$) avec la concentration.

Cependant, l'extrait des feuilles n'a dévoilé aucun effet sur cette bactérie. De même, Nascimento *et al.* (2000) ont constaté la résistance de *B. subtilis* à l'extrait des feuilles de la goyave. En revanche, les extraits méthanolique, héxanique et d'acétate d'éthyle des feuilles de *E. globulus*, ont exercé une action inhibitrice sur *B. subtilis* avec des diamètres des zones d'inhibition de 18, 20 et 16 mm, respectivement (Egwaikhide *et al*., 2008).

Effet des différents extraits bruts sur *K. pneumoniae

Les résultats montrent que tous les extraits bruts n'ont aucune activité inhibitrice sur le développement de *K. pneumoniae*. Ces résultats sont en accord avec ceux de Khan et ses collaborateurs (2009).Ces derniers ont noté également la résistance de *P. aeruginosa* ainsi que de *E. coli vis-à-vis* des extraits issus des feuilles de *E. globulus*.

Plusieurs études ont mis en évidence la résistance de *K. pneumoniae* et autres bactéries à Gram négatif aux extraits des plantes médicinales (Arias *et al*., 2004; Babayi *et al.*, 2004; Hayouni *et al*., 2007; Lim *et al*., 2009; Oliveira *et al*., 2008).

***Discussion générale**

La méthode de diffusion sur gélose a révélé que l'effet antibactérien des extraits de la plante médicinale de *E. globulus* diffère d'une souche à une autre. La bactérie *K. pneumoniae* s'est avérée la plus résistante alors que *S. aureus* est la plus sensible. Ces résultats sont en accord avec plusieurs publications concernant les extraits de plantes médicinales où les bactéries à Gram négatif dévoilent une forte résistance aux extraits de plantes que les bactéries à Gram positif (Arias *et al*., 2004; Khan *et al*., 2009; Oliviera *et al*., 2008). Cette différence peut être due aux différences morphologiques entre les bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. Outre la couche peptidoglycane; la paroi des bactéries à Gram négatif présente trois structures polymériques externes ou liées au peptidoglycane: des lipoprotéines, une membrane externe et des lipopolysaccharides qui sont attachés à la membrane externe. Ces éléments rendent la paroi cellulaire imperméable au passage des solutés liposolubles. Quant aux porines situées au niveau de la membrane externe, elles permettent le passage uniquement de petites molécules hydrophiles (600 Dalton) (Arias *et al*., 2004) . Les bactéries à Gram négatif présentent également un espace périplasmique où s'effectue la fragmentation des molécules introduites (à travers les porines) par les enzymes bactérienne (Shan *et al*., 2007). Les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux agents

antibactériens car elles possèdent uniquement le peptidoglycane qui ne constitue pas une véritable barrière sélective à ces composés (Arias *et al*., 2004; Meyer *et al*., 1999; Tian *et al.*, 2009). Il est probable que la résistance de *K. pneumoniae* aux extraits testés est également due au métabolisme de certains composés à effet antibactérien. En effet, il a été prouvé que certaines souches comme *K. pneumoniae* ont la propriété de dégrader certains composés phénoliques tels que l'acide caféique (Redríguez Vaquero *et al*., 2007).

Les résultats ont révélé également que l'augmentation de la charge de disque de 500 à 2000 µg d'extrait est accompagnée d'un effet antibactérien proportionnel, ce qui est constaté pour les différents extraits testés sur *S. aureus* et pour les extraits des fruits et de l'écorce testés sur *B. subtilis*. Ksouri et ses collaborateurs (2009) et Redríguez Vaquero *et al*. (2007) ont noté, également, que le diamètre des zones d'inhibition est proportionnel à la charge du disque.

Les résultats montrent que *B. subtilis* est plus résistante que *S. aureus* pour les extraits testés. En effet, dans des conditions défavorables pour sa croissance, *B. subtilis* a la capacité de former une endospore pour s'adapter aux conditions du milieu ce qui peut être à l'origine de sa résistance aux extraits de plantes par rapport à *S. aureus* (Ahmad and Beg, 2001; Nascimento *et al*., 2000).

L'activité antibactérienne observée avec les différents extraits peut être liée à la composition chimique des parties étudiées. L'étude phytochimique des trois parties de la plante utilisée, a mis en évidence la présence de diverses classes de polyphénols telles que les tannins, flavonoïdes et les flavonols. Plusieurs recherches ont rapporté que ces composés exerçaient des effets antibactériens remarquables sur une large gamme de bactéries (Ahmad et Beg, 2001; Cowan, 1999; Shan *et al*. 2007). Musa (2008) a signalé que l'activité antibactérienne de l'extrait d'une plante tropicale *Commiphora kerstingii (*Burseraceae) sur *Bacillus subtilis* est liée essentiellement aux tannins ce qui peut expliquer la résistance de cette bactérie vers l'extrait des feuilles comparée aux autres extraits. En effet, la teneur en tannins détectée pour l'extrait des feuilles est de 105,39 mg EAT/ g EB et celle de l'écorce et des fruits sont 332,05 et 210,15 mg EAT/ g EB, respectivement. La résistance de cette souche à l'extrait des feuilles peut être ainsi liée à la qualité des flavonoïdes, Rodríguez Vaquero et collaborateurs (2007) ont signalé que les flavonols (essentiellement la quercétine et la myricétine) inhibent la croissance de plusieurs souches bactérienne *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*,..etc.

D'autres études ont montré que l'effet antibactérien est lié à la teneur des extraits en polyphénols. Rodríguez Vaquero *et al*. (2007) ont montré que l'effet antibactérien de trois types de vins est proportionnel à leur teneur en composés phénoliques ce qui est totalement différent des résultats obtenus avec *S. aureus* dans la présente étude, où l'extrait de l'écorce est plus riche en polyphénols totaux, en tannins et en flavonoïdes. Cependant, cet extrait exerçait une activité assez faible par rapport aux extraits des fruits et des feuilles; cette divergence peut être liée à la diffusion lente de cet extrait sur la gélose. En effet, la zone d'inhibition dépend de la capacité d'un composé antibactérien à diffuser rapidement et uniformément sur la gélose (Cushnie and Lamb, 2005; Hayouni *et al*., 2007).

Peu de travaux sont publiés sur l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits de l'écorce et des feuilles de *E. globulus*. Alors que, la bibliographie consultée concernant le *Eucalyptus* n'a pas rapporté des études sur l'estimation de l'activité antibactérienne des extraits des fruits de cette plante. Les divergences constatées entre les résultats des différentes études publiées sur le *Eucalyptus* et ceux de la présente étude peuvent être liées à l'échantillon, à la période de récolte, méthode d'extraction des composés antibactériens et à la technique d'évaluation de l'activité antibactérienne (Ahmad and Beg, 2001; Al-Zorek, 2009; MacCarell *et al*., 2008).

V. 6. 2. 1. 2. Activité antibactérienne des acides gallique et tannique

Les diamètres des zones d'inhibition sont rapportés dans le tableau XI. Les aspects des zones pour *S. aureus* et *B. subtilis* sont illustrés dans l'annexe V (Figure 8 et 9).

Les résultats montrent que l'activité antibactérienne de l'acide tannique et l'acide gallique varie d'une bactérie à une autre. Comme les extraits bruts, ces acides n'exercent aucun effet antibactérien sur *K. pneumoniae*. Rodríguez Vaquero *et al*. (2007) ont constaté un effet inhibiteur de l'acide gallique sur cette souche à différentes concentrations qui varient de 50 à 1000 mg/ml. Ces différences peuvent être dues à la méthode d'évaluation de l'activité antibactérienne ou liée à la souche qui est plus sensible que celle de la présente étude. En effet, des souches différentes appartenant à la même espèce peuvent montrer des effets totalement différents *vis-à-vis* du même composé phénolique ou de l'extrait (Khan *et al.*, 2009; Nascimento *et al*., 2000; Rodríguez Vaquero *et al*., 2007).

L'acide gallique et l'acide tannique exercent des effets inhibiteurs sur le développement de *S. aureus.* L'étude statistique a révélé des différences significatives ($p < 0,05$) entre ces composés purs. L'acide gallique a montré l'effet inhibiteur le plus important avec une activité très forte aux différentes concentrations testées avec un diamètre de zone d'inhibition de 13,67 mm à 2000 µg/disque et les diamètres d'inhibition enregistrés pour l'acide tannique oscillent entre 6,67 à 10 mm. Akiyama et ses collaborateurs (2001) ont constaté également des effets antibactériens de ces acides phénoliques sur *S. aureus*.

Tableau XI: Effets des acides phénoliques sur *K. pneumoniae*, *B. subtilis* et *S. aureus.*

Acides phénoliques	Charge µg /disque	*Diamètre d'inhibition (mm)*	Microorganismes
Acide tannique	500	6,67 ± 0,58 (+++)	*S. aureus*
	1000	8,33 ± 0,58 (+++)	
	1500	9,33 ± 0,33 (++++)	
	2000	10,00 ± 0,00 (++++)	
Acide gallique			
	500	9,33 ± 0,58 (++++)	
	1000	12,00 ± 1,00 (++++)	
	1500	12,67 ± 0,58 (++++)	
	2000	13,67 ± 0,58 (++++)	
Acide tannique	500	3,33 ± 0,58 (++)	*B.subtilis*
	1000	4,33 ± 0,58 (++)	
	1500	5,00 ± 0,00 (++)	
	2000	5,33 ± 1,15 (++)	
		-	
Acide gallique	500	-	
	1000	-	
	1500	-	
	2000	1,00 ± 0,00 (f)	
Acide tannique	500	-	*K. pneumoniae*
	1000	-	
	1500	-	
	2000	-	
Acide gallique	500	-	
	1000	-	
	1500	-	
	2000	-	

Absence d'activité (-),DZI <1. Activité très faible (f), DZI=1. Activité faible (+), DZI (2-3 mm). Activité modérée (++), DZI (4-5 mm). Activité forte (+++), DZI (6-9 mm).Activité très forte (++++), DZI > 9 mm.

La souche *B. subtilis* a montré une certaine résistance à l'acide gallique aux charge 500 à 1500 µg/disque; à la charge de 2000 µg d'acide gallique/disque, l'effet antibactérien de l'acide gallique commence à apparaître avec une très faible activité (1 mm). Cette souche s'est avérée plus sensible à l'acide tannique dont les diamètres mesurés varient de 3,33 à 5,33 mm. Taguri et ses collègues (2006) ont révélé que cette bactérie est sensible à l'acide gallique et l'acide tannique. Les résultats ont montré que *Bacillus subtilis* est plus résistante aux acides phénoliques testés que *S. aureus.*

V.6. 2. 2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides

Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus pour les CMI et CMB des extraits et des composés phénoliques actifs.

Tableau XII: Concentrations minimales inhibitrices et bactéricides des extraits et des composés phénoliques purs.

		ZI à (2000 µg/ disque) (mm)	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	Microorganismes
E. globulus	Feuilles	9,00 ± 0,00	500	500	*S. aureus*
	Ecorce	5,00 ± 1,00	90	100	
	Fruits	8,67 ± 0,58	80	80	
Acides phénoliques					
	Acide tannique	10,00 ± 0,00	90	300	
	Acide gallique	13,67 ± 0,58	50	70	
E. globulus	Feuilles	0,00 ± 0,00	NT	NT	*B. subtilis*
	Ecorce	5,33 ± 0,58	60	900	
	Fruits	5,50 ± 0,50	30	400	
Acides phénoliques					
	Acide tannique	5,33 ± 1,15	50	> 2000	
	Acide gallique	1,00 ± 0,00	600	800	

NT : Non tester

Les résultats des CMI obtenues montrent que la valeur la plus faible est observée pour l'extrait des fruits sur *B. subtilis* et la valeur la plus importante est constatée pour le l'acide gallique sur la même souche. Ces valeurs sont inversement proportionnelles aux diamètres des zones d'inhibition révélés avec la méthode de diffusion en milieu solide: méthode des disques (Bekhechi *et al*., 2008). Cependant, les CMI notées pour les autres extraits d'une manière générale ne concordent pas avec les diamètres d'inhibition obtenus à la charge de 2000 µg / disque. Ces résultats sont en accord avec ceux de More *et al*.(2008).

More et ses collègues (2008) ont rapporté que les résultats de la technique de diffusion en milieu solide ne peuvent pas être souvent comparés avec les données des CMI. En effet, la méthode des disques n'est pas une techniqαue assez fiable pour l'estimation de l'activité antibactérienne vue le facteur de diffusion de l'extrait qui influe sur le diamètre de la zone d'inhibition et par conséquent l'estimation de l'effet antibactérien (Proestos *et al.*, 2006). Pour cette raison, il est indispensable de compléter ce test par la détermination des CMI (Biyiti *et al*., 2004).

Aligiannis et ses collègues (2001) (cités par Fabri *et al*. (2009)) ont proposé une classification du matériel végétal sur la base des CMI :

- Forte inhibition: CMI inférieure à 500 µg/ml ;
- Inhibition modérée: CMI varie de 600 µg/ml à 1500 µg/ml ;
- Faible inhibition: CMI supérieure à 1600 µg/ml.

Il en ressort des résultats de la présente étude que:

*Les extraits des feuilles, des fruits, de l'écorce, de l'acide gallique et de l'acide tannique exercent une forte activité sur *S. aureus* (CMI = 500, 80, 90, 50 et 90 µg/ml), respectivement.

*Les extraits des fruits, de l'écorce et de l'acide tannique ont également une forte activité sur *B. subtilis* (CMI= 30, 60, 50 µg/ml), respectivement. Toutefois, l'acide gallique exerce une activité modérée sur la même souche avec une CMI égale à 600 µg/ml.

Les CMI des extraits de l'écorce et des fruits sur *S. aureus* sont plus faibles que celles de l'extrait des feuilles. Ces différences peuvent être liées à leur teneur élevée en tannins comparée aux feuilles. Plusieurs recherches ont montré que les éllagitannins, gallotannins, acide éllagique et proanthocyanidines ont des forts effets antibactériens sur plusieurs bactéries *B. subtilis*, *S. aureus*, *H. pylori*, *P. aeruginosa* et autres (Cowan, 1999; Funatogawa *et al.*, 2004; Galvão Rodrigues *et al*., 2008; Musa, 2008).

Les CMI obtenues par Cruz *et al*. (2001) et Khan *et al*. (2009) pour les extraits de l'écorce et des feuilles (CMI=100, 6250 µg/ml), respectivement sur *S.aureus* sont supérieures à celles de la présente étude. Ces différences peuvent être liées à la méthode de détermination des CMI, la taille de l'inoculum ainsi que la souche.

La CMI obtenue dans la présente étude sur *B. subtilis* pour l'acide tannique (50 µg/ml) est très inférieure à celle de l'acide gallique (600 µg/ml) ce qui est en accord avec les CMI de Taguri *et al*. (2006) qui sont de 667 µg/ml pour l'acide tannique et de1600 µg/ml pour l'acide gallique. Akiyama et ses collègues (2001), ont rapporté que les bactéries aérobies sont plus sensibles à l'acide tannique qu'a l'acide gallique. D'après ces mêmes auteurs l'acide tannique a la capacité de fixer le fer et par conséquent la perturbation des fonctions physiologiques de ces bactéries. Le pouvoir antibactérien de l'acide tannique peut être attribué à son poids moléculaire élevé (C_{76} H_{52} O_{46}) étant donné qu'il est formé par combinaison de l'acide gallique et de glucose. Le pouvoir antibactérien de ce composé peut être dû également aux nombres de groupements hydroxyles qu'il possède comparé à l'acide gallique. Cowan (1999) et Falleh *et al*. (2008) ont signalé que la position et le nombre de groupement hydroxyles d'un composé phénolique augmentent sa toxicité *vis-à-vis* les microorganismes.

Les concentrations minimales bactéricides (CMB) (Tableau XII) obtenues diffèrent d'une souche à une autre. Les CMB des extraits sur *S.aureus* varient de 70 à 500 ug /ml et celles enregistrées sur *B .subtilis* oscillent entre 400 et 900 µg /ml. Ces valeurs révèlent que *B. subtilis* est plus résistante que *S. aureus* ce qui confirme les résultats obtenus par la méthode de diffusion sur milieu solide. Les valeurs des CMB sont souvent égales ou supérieures aux CMI (Arias *et al*., 2004; Evan *et al*.,2002; Karou *et al.*, 2005; Zampini *et al.*, 2005).

Il est souhaitable de comparer les CMI et CMB d'un extrait sur un microorganisme donné afin de mieux connaître l'effet antibactérien de l'extrait ou de l'antibiotique. Ces valeurs sont proches pour les antibactériens dits bactéricides et éloignées pour les antibactériens bactériostatiques (Meyer *et al*., 1999). La classification des extraits dans ce travail est faite selon la méthode de Biyiti et ses collègues (2004); une substance est dite bactéricide lorsque le rapport CMB/CMI ≤ 2 et bactériostatique si le rapport CMB/CMI > 2.

Il en ressort aussi des CMI et des CMB obtenues que :

-Les extraits des feuilles, de l'écorce, des fruits et de l'acide gallique exercent des effets bactéricides sur *S. aureus* à 500, 100, 80 et 70 µg /ml, respectivement, et par contre l'acide tannique exerce un effet bactériostatique sur la même bactérie.L'aide gallique exerce un effet bactéricidé à 800 µg /ml sur *B. subtilis*.

-Les extraits des fruits, de l'écorce et de l'acide tannique révèlent des effets bactériostatiques (CMB/CMI > 2) sur *B. subtilis*.

D'après l'ensemble des résultats, l'activité antibactérienne des extraits de *Eucalyptus globulus* peut être liée aux composés phénoliques. Cependant le mécanisme d'action des polyphénols sur les bactéries n'est pas assez clair. De ce fait, plusieurs hypothèses ont été établies pour expliquer le mode d'action de ces composés. Ces métabolites peuvent agir au niveau de la paroi en inhibant les fonctions physiologiques de la cellule, ou ils peuvent intervenir dans la fixation des ions métalliques, des substrats comme ils peuvent être impliqués dans l'inhibition des activités enzymatiques comme ils peuvent aussi régénérer le peroxyde d'hydrogène en provoquant ainsi un stress oxydant à la cellule bactérienne (Galvão Rodrigues *et al*., 2008; Karou *et al*., 2005; Taguri *et al*., 2006). L'effet bactéricide des polyphénols est lié essentiellement aux altérations structurales à deux niveaux différents: la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire (Rodriguez *et al*., 2009).

Cette partie a permis de mettre en évidence les propriétés antibactériennes des extraits bruts des différentes parties (feuilles, fruits et l'écorce) de la plante médicinale *E. globulus.* Les résultats obtenus révèlent la présence des principes actifs antibactériens qui exercent des effets bactéricides *vis-à-vis S. aureus* ce qui justifie l'usage traditionnel de cette plante essentiellement les feuilles dans le traitement des diarrhées et des affections pulmonaires (Aït Youssef, 2006).

Conclusion et perspectives

Les différentes parties de *Eucalyptus globulus* à savoir les feuilles, l'écorce et les fruits ont fait l'objet de la présente étude. Différentes analyses sont appliquées à ces différentes parties : extraction des polyphénols, fractionnement des extraits bruts par la colonne chromatographique Sephadex LH-20, évaluation des effets antioxydants des extraits bruts ainsi que leurs fractions par trois moyens (activité antiradicalaire à l'egard du $DPPH^{\bullet}$, le pouvoir réducteur et l'activité scavenger de peroxyde d'hydrogène) et enfin l'étude des effets antibactériens des extraits bruts sur *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Klebsiella pneumoniae* (E47) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Il en ressort de l'analyse des résultats obtenus pour le test d'humidité que les teneurs en eau obtenues sont différentes d'une partie à une autre. L'écorce a montré le taux le plus faible (18 %) contrairement aux fruits et feuilles.Ces derniers sont très riches en eau avec des teneurs de 57,14 % et de 51,47 %, respectivement. L'extraction à l'acétone aqueux 70 % a permis d'obtenir des rendements qui oscillent entre 10 et 30 %. Le fruit a révélé le taux d'extraction le plus élevé (30, 83%) suivi des feuilles 24,73 % et enfin de l'écorce avec le taux le plus faible 10,09 %.

L'analyse quantitative des polyphénols par la méthode spectrophotométrique a montré des différences significatives ($p < 0,05$) entre les parties de la plante. La teneur la plus élevée est constatée pour l'extrait de l'écorce (518,88 mg EAG/ g EB) suivie de l'extrait issu des fruits (464,71 mg EAG/ g EB) puis de celui des feuilles (432,63 mg EAG /g EB). Les teneurs en tannins différent significativement ($p < 0, 05$) d'un extrait brut à un autre. La teneur la plus élevée est constatée pour l'extrait de l'écorce (332,05 mg EAT/g EB) suivie de l'extrait des fruits (210,15 mg EAT/g) et enfin de celui des feuilles avec une teneur de 105,39 mg EAT/g EB. Le dosage des flavonoïdes a révélé encore une fois que l'extrait de l'écorce dévoile la teneur la plus élevée (4,76 mg EQ/g EB).Tandis que, la teneur la plus faible est enregistrée pour l'extrait des fruits (2,99 mg EQ/g EB). La méthode de dosage adoptée dans la présente étude pour quantifier les flavonols révèle une teneur élevée pour l'extrait de l'écorce (4, 57 mg EQ/ g EB) environ 96 % de flavonoïdes totaux, suivie des fruits (2, 30 mg EQ/ g EB) avec un taux de 76 % de flavonoïdes totaux. En revanche, les feuilles possèdent la teneur la plus faible (1,16 mg EQ/ g EB) qui correspond à un taux de 31 % de flavonoïdes totaux.

Le fractionnement des différents extraits bruts par la colonne chromatographique Sephadex LH-20 a donné trois fractions pour chaque extrait, désignées ainsi : Fraction A,

Fraction B et Fraction C. L'étude phytochimique de ces différentes fractions a montré la présence des polyphénols et des tannins avec des teneurs inférieures à celles enregistrées pour les extraits bruts dont elles sont issues.

Tous les résultats de l'activité antioxydante ont montré que le potentiel antioxydant pour chaque test est proportionnel à la concentration. Les résultats des extraits bruts montrent des différences significatives (p<0,05) entre l'extrait des fruits et les autres extraits; toutefois aucune différence significative n'est observée entre l'extrait de l'écorce et des feuilles pour le test du pouvoir réducteur ainsi que l'activité antiradicalaire. L'ordre ainsi révélé par l'étude statistique pour ces tests est comme suit: fruits brut > écorce brut = feuilles brut. Cependant, l'extrait de l'écorce a exercé l'activité réductrice de peroxyde d'hydrogène la plus élevé avec un taux de 75,55% à la concentration 65 µg /ml suivi de l'extrait des fruits avec un taux de 50,7 % et celui des feuilles avec un taux de 33,06% à la même concentration.

La fraction B et la fraction C des extraits de l'écorce et des fruits exercent également des pouvoirs antioxydants puissants mais ils restent inférieurs à ceux des extraits bruts pour tous les trois tests. En revanche, la fraction B et la fraction C issues de l'extrait brut des feuilles montrent des pouvoirs antioxydants plus élevés que l'extrait brut et ceci pour les trois tests. Les CI_{50} du pouvoir antiradicalaire $DPPH^{\bullet}$enregistrées sont de l'ordre de 88 µg/ml pour chaque fraction et elles sont très inférieures à la CI_{50} de l'extrait brut des feuilles (114,25 µg/ml) et même à celle du BHA (CI_{50}=134,26 µg/ml). La fraction A des différents extraits a révélé les pouvoirs antioxydants les plus faibles pour tous les tests antioxydants étudiés comparés aux autres fractions. Ainsi, leurs capacités antioxydantes enregistrées sont également très inférieures au pouvoir antioxydant de l'α-tocophérol.

Des corrélations linéaires positives (p < 0,05) ont été établies entre les polyphénols totaux et les différentes activités antioxydantes des extraits étudiés à savoir: entre le taux de polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire (r = 0,58) ainsi que le pouvoir réducteur (r = 0,61) des différents extraits. Des corrélations positives ont été aussi retrouvées (p < 0,05) entre l'effet scavenger du peroxyde d'hydrogène et les polyphénols totaux (r = 0,65) et les tannins (r =0,74), témoignant la contribution des tannins et des polyphénols des extraits à la diminution de la concentration du peroxyde d'hydrogène. Cependant, des corrélations moyennes ont été notées entre les tannins et l'activité antiradicalaire à l'egard du $DPPH^{\bullet}$ (r = 0,42) et entre les tannins et le pouvoir réducteur (r = 0,52) de tous les extraits de *E. globulus*.

L'évaluation de l'effet antibactérien a révélé que la bactérie *K. pneumoniae* est très résistante aux extraits bruts testés. En revanche, ces derniers ont montré des effets inhibiteurs sur *S. aureus*. La bactérie *B. subtilis* s'est avérée sensible aux extraits des fruits et de l'écorce. Cependant, elle est très résistante à l'extrait des feuilles. Les extraits des fruits, d'écorce et des feuilles exercent des effets bactéricides sur *S. aureus* à 500, 100 et 80 µg /ml respectivement. Des effets bactériostatiques ont été notés pour les extraits des fruits et de l'écorce sur *B. subtilis*.

A travers les résultats obtenus, les extraits bruts de la plante *Eucalyptus globulus* présentent des potentiels antioxydant et antibactérien remarquables sur *S. aureus* justifiant l'usage traditionnel de cette plante dans le traitement de certaines maladies (diarrhées, affections pulmonaires). Le fractionnement des extraits bruts par la colonne chromatographique Sephadex LH-20 a révélé la présence de trois classes de composés avec des pouvoirs antioxydants différents. Ces résultats obtenus ouvrent des perspectives intéressantes à l'avenir dont il serait nécessaire de:

- ✓ Etudier la toxicité de ces extraits et d'envisager la mise au point des médicaments traditionnels améliorés à court terme;
- ✓ Etudier d'autres activités biologiques à savoir: les propriétés anti-inflammatoires, antivirales et autres;
- ✓ Identifier les différents constituants des fractions par CLHP-SM;
- ✓ Réaliser des combinaisons entre ces extraits et les antibiotiques et de les tester sur des bactéries multi-résistantes.
- ✓ Etaler l'étude phytochimique sur d'autres parties de cette plante telles que les fleurs et les boutons floraux.

Références bibliographiques

Abdel-Hameed E.-S. S. (2009). Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples. *Food Chemistry*, 114, pp: 1271-1277.

Adrian J.; Potus J.; Poiffait A. et Dauvillier P. (1998). Méthodes physicochimiques générales.In"*Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires*", Ed.: TEC & Doc, ISBN : 2-7430-0270-0, pp : 29-145.

Ahmad I. and Beg A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, pp: 113-123.

Aït youssef M. (2006). *Eucalyptus globulus* L. In " *Plante Médicinale de Kabylie* ", Ed.: Paris, pp: 126-130.

Akiyama H.; Fujii K.; Yamasaki O.; Oono T. and Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, pp: 487-491.

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.

Arct J. and Pytkowska K. (2008). Flavonoids as components of biologically active cosmeceuticals. *Clinics in Dermatology* , 26, pp: 347–357

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.

Aron P. M. and Kennedy J. A. (2008). Flavan-3ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol.Nutr.Food Res.*, 52, pp: 79-104.

Aruoma O. I.; Bahorum T. and Jen L.-S. (2003). Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research*, 544, pp: 203-215.

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.

Avril J.-L.; Darbernat H.; Denis F. et Monteil H. (2000). Généralité sur les Enterobacteriaceae, Genre *Klebsiella.* In « *Bactériologie clinique* », Ed.: Ellipses, ISBN: 2-7298-9908-1, pp: 208-211.

Awika J. M.; Rooney L. W. and Waniska R. D. (2004). Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90, pp: 293-301.

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.

Babayi H.; Kolo I.; Okogum J. I. and Ijah U. J. (2004). The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camandulensis* and *Trminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biokemistri*, 16, pp: 106-111.

Bachir Raho G. and Benali M. (2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globules and Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, pp: 211-215.

Balasundram N.; Kalyana S. and Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99, pp: 191–203.

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

Baudin B. (2006). Stress oxydant et pathologies cardiovasculaires.*mt cardio*, 2, pp : 43-52.

Beaudeux J.-L.; Delattre J.; Therond P.; Bonnefont-Rousselot D.; Legrand A. et Peynet J. (2006). Le stress oxydant, composante physiopathologique de l'athérosclérose. *Immuno-analyse & Biologie spécialisé*, 21, pp : 144-150.

Bekhechi C.; Atik-Bekkara F. et Abdelouahid (2008). Composition et activité antibactérienne des huiles essentielles d'*Origanum glandulosum*. *Phytothérapie*, 6, pp: 153-159.

Bennick A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13, pp: 184-196.

Berche P. (2003). Les staphylocoques. In « *Bactériologie systématique* », Faculté de médecine Necker-Enfants malades, pp: 12-19.

Berset C. (2006). Antioxydants phénoliques-Structures, propriétés, sources végétales. In « *Les polyphénols en agroalimentaire* ». Ed.: Lavoisier, ISBN 2-7430-0805-9, pp : 1-27.

Bigendako J. M. (2004). Identification et zonage des *Eucalyptus globulus* au Rwanda. pp : 1-2. http://pdf.usaid.gov.

Biglari F.; Alkaekhi A. F. M. and Easa A. M. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactyllifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107, pp: 1636-1641.

Biyiti L. F.; Meko D. J. L. et Amvam Zollo P. H. (2004). Recherche de l'activité antibactérienne de quatre plantes médicinales camerounaises. *Pharm. Méd.Trad. Afr*., 13, pp : 11-20.

Borel J. et Randoux A. (1997).Méthodes chromatographique. In « *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire* », Ed. : Flammarion, ISBN : 2-257-15545-9, pp : 169-171.

Bossu C. M.; Ferreira E. C.; Chaves F. S.; Menezes E. A. and Nogueira A. R. A. (2006). Flow injection system for hydrolysable tannin determination. *Microchemical Journal*, 84, pp: 88-92.

Boullard B. (1997). Dictionnaire plantes et des champignons. Ed.: Editions ESTEM, ISBN: 2909455998, pp: 309-310.

Bourgou S.; Ksouri R.; Bellila A.; Skandrani I.; Falleh H. and Marzouk B. (2008). Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and root. *C. R. Biologies*, 331, pp: 48–55.

Bruneton J. (1999). Phenolics Shikimate Acétate. In «*Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants* ». Ed.: 2nd Technique & Documentation, ISBN: 1-898298-63-7, pp: 227-459.

Cadahía E.; E. Conde E.; García-Vallejow M. C. and Fernández de Simón B. (1997). High Pressure Liquid Chromatographic Analysis of Polyphenols in Leaves of *Eucalyptus camaldulensis, E. globulus* and *E. rudis:* Proanthocyanidins, Ellagitannins and Flavonol Glycosides. *Phytochemical Analysis*, 8, pp: 78–83.

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.

Chira K.; Suh J.-H. et Teissède P.-L. (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6, pp:75-82.

Chirinos R.; Campos D.; Costa N.; Arbizu C.; Pedreschi R. and Larondelle Y. (2008). Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pavón) tubers: Identification by HPLC-DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 106, pp: 1285–1298

Cillard J. et Cillard P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations.*OCL*, 13, pp: 24-29.

Close D. C.; Mc Arthur C.; Pietrzykowski E.; Fitzgerald H. and Paterson S. (2004). Evaluating effects of nursery and post-planting nutrient regimes on leaf chemistry and browsing of eucalypt seedlings in plantations. *Forest Ecology and Management*, 200, pp: 101–112.

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 M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, pp: 564-582.

Cruz J. M.; Domínguez J. M.; Domínguez H. and Parajó J. C. (2001). Antioxidant and Antimicrobial Effects from Hydrolysates of Lignocellulosic Materials. *J.Agri.Food Chem*., 49, pp: 2459-2464.

Cruz J.M.; Domínguez H. and Parajó J.C. (2005). Anti-oxidant activity of isolates from acid hydrolysates of *Eucalyptus globulus* wood. *Food Chemistry*, 90, pp: 503-511.

Curtay J.-P. et Robin J.-M. (2000). Intérêt des complexes antioxydants. ***C****entre d'****E****tude et DE* ***d****Éveloppement de la* ***N****utrithérapie*, pp: 1-4.

Cushnie T. P. and Lamb A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, pp: 343-356.

Daciana Ciocan I. and Băra I. (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Sectiunea Geneticã şi Biologie Molecularã*, TOM VIII, pp: 151-156.

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.

Delarras C. (2007). Eterbacteriaceae (entérobactéries). In « *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire* », Ed.: Lavoisier, ISBN: 978-2-7430-0945-8, pp: 247-294.

Derbel S. et Ghedira K. (2005). Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie* 1, pp: 28-34.

Deysson G. (1979). Systématique .Tome II: Organisation et classification des plantes vasculaires. Ed.: Enseignement supérieurs, ISBN: 2-7181-3514-X, pp: 378-382.

Djeridane A.; Yousfi M.; Nadjemi B.; Boutassouna D.; Stocker P. and Vidal N. (2006). Antioxidant activity of same Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, pp: 654-660.

Djerroumi A. et Nacef M. (2004). Eucalyptus. In« *Plantes médicinales d'Algérie*», Ed.: Palais des livres, ISBN: 9961-749-25-1, pp: 75.

Dutta D.; Chaudhuri U. R. and Chakraborrty R. (2005). Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Biotechnology*, 3, pp: 1510-1520.

Egwaikhide P. A.; Okeniyi S. O.; Akporhonor E. E. and Emua S. O. (2008). Studies on bioactive metabolites constituents and antimicrobial evaluation of leaf of *Eucalyptus globulus*. *Agricultur Journal*, 3, pp: 42-45.

Encyclopédie des plantes médicinales (2001). Ed.: 2ème Larousse, ISBN : 2-03-560252-1, pp : 100.

Evans C. E.; Banso A. and Samuel O. A. (2002). Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*: an *in vitro* study. *Journal of Ethnopharmacology*, 80, pp: 21-24.

Fabri R. L.; Nogueira M. S.; Braga F. G.; Coimbra E. S. and Scio E. (2009). *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial antileishmanial, and antioxidant effects. *Bioresource Technology*, 100, pp: 428-433.

Falleh H.; Ksouri R.; Karray-Bouraoui N.; Trabelsi N.; Boulaaba N. and Abdelly C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *C.R. Biologies*, 331, pp: 372-379.

Fauchère J.-L. et Avril J.-L. (2002). Les bacilles à Gram négatif de la famille des entérobactéries. In « *Bactériologie générale et médicale* ». Ed.: Ellipses, ISBN : 2-7298-0747-0, pp : 237-257.

Favier A. (2003). Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, pp:108-115.

Forrest M. and Moore T. (2008). *Eucalyptus gunnii*: A possible source of bioenergy?. *Biomass and Bioenergy*, 32, pp: 978 – 980.

Funatogawa K.; Hayashi S.; Shimomura H.; Yoshida T.; Hatano T.; Ito H. and Hirai Y.(2004). Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol*., 48, pp:251-261.

Galão Rodrigues F. F.; do Svadesvich Carbal B.; Coutinho H. D. M.; Cardoso A. L. H.; Campos A. R. and da Costa G. M. (2008). Antiulcer and antimicrobial activities of *Stryphnodendron rtundifolium* Mart. *Pharmacognosy Magazine*, 4, ISSN: 0973-1296, pp: 193-196.

Gardès-Albert M. Bonnefont –Rousselot D.; Adedinzadeh Z. et Jore D. (2003). Espèces réactives de l'oxygène .Comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?. *L'actualité chimique*, pp: 91-96.

Ghedira K.; Goetz P. et Le Jeune R. (2008). *Eucalyptus globulus* Labill. *Phytothérapie*, pp: 197-200.

Goetz P. (2007). Phytothérapie du diabète. *Phytothérapie*, 5, pp: 212-217.

González J.; Cruz J. M.; Dominguez H. and Parajó J. C. (2004). Production of antioxidants *Eucalyptus globulus* wood by solvent extraction of hemicelluloses hydrolysates. *Food Chemistry*, 84, pp: 243-25.

Gordon M. H. (2001). Measuring antioxidant activity- Antioxidants and food stability-. In "*Antioxidants in food*". ISBN 0-8493-1222-1, Ed.: Woodhead Publishing Ltd, pp : 71-84.

Grusse J. L. (2003). Structure chimique et propriétés physicochimiques-vitamine C-. In " *Les vitamines dans les industries agroalimentaires* ", Ed. : TEC & Doc, ISBN: 2-7430-0524-6, pp: 22-23.

Guichardant M.; Bacot S.; Molière O. et Lagarde M. (2006). Les biomarqueurs de la peroxydation lipidique.*OCL*, 13, pp: 31-34.

Guiraud J. et Galzy P. (1980). Analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed.: Usine Nouvelle-Paris, ISBN : 2-7327-0000-2, pp: 203.

Guiraud J.-P. (2003). Micro-organismes intervenant dans l'industrie alimentaire.In " *Microbiologie Alimentaire* ", Ed.: Dunod, ISBN : 2 10 007259 5, pp: 79-95.

Gűlçin I.; Oktay M.; Kreçci E. and Küfrevioğ Ö. I. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83, pp: 371−382.

Gülçin I.; Güngör Şat İ.; Beydemir Ş.; Elmastaş M. and Küfrevioğlu Ö. I. (2004). Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophylata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, 87, pp: 393-400.

Guo Q.-M. and Yang X.-W. (2006). Cypellocarpin C and other compounds from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, pp: 543-545.

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.

Hadi M. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. pp: 23-36. Thèse de doctorat.

Hagerman A. E. and Butler L. G. (1978). Protein precipitation method for quantitative determination of tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26, pp: 809-812.

Hayouni E.-A.; Abedrabba M.; Bouix M. and Hamdi M. (2007). The effects of solvents and extraction on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chemistry*, 105, pp: 1126-1134.

Heim K. E.; Tagliaferro A. R. and Bobilya D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure –activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, pp: 572-584.

Houée-Levin C.; Sicard-Roselli C. et Bergès J. (2005). Introduction à la biochimie radicalaire. In « *Chimie et biochimie radicalaires* », Ed.: Échelles, ISBN 2-7011-3717-9, pp: 86-102.

Hseu Y. C.; Chang W. H.; Chen C. S.; Liao J.W. ; Huang C. J.; Lu F. J.; Hia Y. C.; Hsu H. K.; Wu J. J. and Yang H. L.(2008). Antioxidant activities of *Toona sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp: 105-114.

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.

Jang H.-D.; Chang K.-S.; Huang Y.-S.; Hsu C.-L.; Lee S.-H. and Su M.-S.(2007). Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry*, 103, pp: 749-756.

Judd W.; Campbell C.; Kellog E. et Stevens P.(2002). Botanique systématique-Une perspective phylogénétique. ISBN : 2-7445-0123-9, pp : 321-323.

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.

Karp G. (1998). La respiration aérobie et la mitochondrie. In « *Biologie cellulaire et moléculaire* », Ed.: De Boeck Université, ISBN: 2-7445-0017-8, pp: 177-184.

Khan R.; Islam B.; Akram M.; Shakil S.; Ahmad A.; Manazir Ali S.; Siddiqui M. and Khan A. U. (2009). Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MDR) strains of bacteria and fungus of clinical origin. *Molecules*, 14, pp: 586-597.

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.

Koechlin-Ramonatxo C. (2006). Oxygène, stress oxydant et supplémentations antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clique et métabolisme*, 20, pp: 165-177.

Kosalec I.; Pepeljnjak S.; Bakmaz M. and Vladimir-Kneževic S. (2005). Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta. Pharm*., 55, pp: 423-430.

Kosar M.; Bozan B.; Temelli F. and Baser K. H. C. (2007). Antioxidant activity and phenolic composition of sumac (*Rhus coriaria* L.) extracts. *Food Chemistry*, 103, pp: 952-959.

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.

Kumaran A. and Karunakaran R. J. (2007). In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT*, 40, pp: 344-352.

Lagnika l. (2005). Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. pp: 98-99. Thèse de doctorat.

Larpent J. P.; Copin M. P.; Germonville A.; Jacquet M.; Thetas J.L. (1997). Microbiologie du lait et des produits laitiers. In « *Microbiologie alimentaire .Technique de laboratoire* », Ed.: Technique et documentation, ISBN : 2-7430-0155-0, pp: 728.

Le K.; Chiu F. and Ng K. (2007). Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. *Food Chemistry*, 105, pp: 353-363.

Lee B.-C.; Lee S. Y.; Lee H. J.; Sim G.-S.; Kim J.-H.; Kim J.-H.; Cho Y.-H.; Lee D.-H.; Pyo H.-B.; Choe T.-B.; Moon D. C.; Yun Y. P. and Hong J. T.(2007). Anti-oxidative and Photo-protective Effects of Coumarins Isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch Pharm Res*, 30, pp: 1293-1301.

Lei Z. (2002). Monomeric ellagitannins in oaks and sweetgum. Doctoral Dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, VA. pp: 1-145.

Leverve X. (2006). Stress oxydant et régulation de la glycémie : implications pour le syndrome métabolique. *Obes*, 1, pp: 11-15.

Lim T. Y.; Lim Y. Y. and Yule C. M.(2009). Evaluation of antioxidant, antimicrobial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*, 114, pp: 594-599.

Lin J.-Y.; Li C.-Y. and Hwang I-F. (2008). Characterisation of the pigment components in red cabbage (*Brassica oleracea* L. var.) juice and their anti-inflammatory effects on LPS-stimulated murine splenocytes. *Food Chemistry*, 109, pp: 771–781.

Liu R. H. (2007). Whole grain phytochemicals and health. *Journal of Cereal Science*, 46, pp: 207–219.

Liu X.; Zhao M.; Wang J.; Yang B.; Jiang Y. (2008). Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, pp: 219-228.

Lűttge U.; Kluge M. et Bauer G. (2002). Axe caulinaire: Structure et fonctions. In "*Botanique* ", Ed.: 3 ème Lavoisier, ISBN: 2-7430-0412-6, pp: 349-401.

MacCarell E. M.; Gould S. W.; Fielder M. D.; Kelly A. F.; El Sankary W. and Naughton D. P. (2008). Antimicrobial activities of pomegranate rind extracts: enhancement by addition of metal salts and vitamin C. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8, 64, pp: 1-7.

Macheix J.-J.; Fleuriet A. et Sarni -Manchado P. (2006). Composés phénoliques dans la plante– Structure, biosynthèse, répartition et rôle. In "*Les polyphénols en agroalimentaire* ", Ed.: Lavoisier, ISBN 2-7430-0805-9, pp:1-27.

Magalhães L. M.; Segundo M. A. ; Reis S. and Lima J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Act*., 613, pp: 1-19.

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.

Maisuthisakul P.; Pasuk S. and Ritthiruangdej P. (2008). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *Journal of Food Composition and Analysis* ,21, pp:229-240.

Marais J. P. J.; Deavours B., Dixon R. A. and Ferreira D. (2006).The Stereochemistry of Flavonoids. In "*The Science of Flavonoids* ", ISBN-13: 978-0387-28821-5, pp: 1-46.

Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Étude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides. pp: 6-11. Thèse doctorat.

Marinova E. M. and Yanishlieva N. V. (1997). Antioxidative activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. *Food Chemistry*, 58, pp: 245-248.

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.

More G.; Tshikalange T. E.; Lall N.; Botha F. and Meyer J. J. M. (2008). Antimicrobial activity of medicinal plants against oral. *Journal of Ethnopharmacology*, 119, pp: 473-477.

Musa A. A. (2008). Antioxidant and antibacterial activity of *Commiphora kerstingii* Engl. Stem bark extract. *Research Journal of Phytochemistry*, 2, pp: 106-111.

Nack M. and Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, pp: 95–111.

Nack M. and Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, pp: 1523–1542.

Nack M.; Grant S.; Zadernowski R. and Barre E. (2006). Protein precipitating capacity of phenolics of wild blueberry leaves and fruits. *Food Chemistry*, 96, pp: 640-647.

Nakagawa T. and Yokozawa T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and chemical Toxicology* 40, pp: 1745-1750.

Nascimento G. G. F.; Locatelli J.; Freitas P. C. and Silva G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, pp: 247-256.

Negre-Salvayre A. et Salvayre R. (2005). Effet protecteur des acides gras contre le stress oxydatif : Implication en physiologie vasculaire. *OCL*, 12, pp: 433-437.

Nicol M. et Maudet M. (2000). Caroténoïdes et vitamine A. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 3, pp: 266-270.

Nicolas J. et Billaud C. (2006). Brunissement enzymatique-Prévention. In "*Les polyphénols en agroalimentaire* ", Ed.: Lavoisier, ISBN : 2-7430-0805-9, pp: 173-196.

Nwinuka N. M.; Ibeh G . and Ekeke G. I. (2005). Proximate Composition And Levels Of Some Toxicants In Four Commonly Consumed Spices. *J. Appl. Sci. Environ. Mgt*, 9, pp: 150 – 155.

Oliveira I.; Soussa A.; Morais J. S.; Ferreira I. C. F. R.; Bento A.; Estevinho L. and Pereira J. A. (2008). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of three hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* , 46, pp: 1801-1807.

Othman A.; Ismail A.; Abdul Ghani N. and Adenan I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100, pp: 1523-1530.

Owen P. L. and Johns T. (1999). Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethmopharmacology* , 64, pp:149-160.

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.

Parke D.V. (1999). Nutritional antioxidants and diseases prevention: Mechanism of Action. In « *Antioxidants in human health and disease* », ISBN: 085 199 3346, pp: 1-13.

Peng S.; Scalbert A. and Monties B. (1991). Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, 30, pp: 775-778.

Perrot L. (2004). Evaluation de l'effet antihypertenseur de la fraction oligopeptidique du vin de Champagne. Identification et caractérisation d'oligopeptides. pp: 58-60. Thèse de doctorat.

Pham-Huy L. A.; He H. and Pham-Huy C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biomedical science*, 4, pp: 89-96.

Pietta P.-G.(2000). Flavonoids as antioxidants. *J.Nat.Prod*., 63, pp: 1035-1042.

Pincemail J.; Bonjean K.; Cayeux K. and Defraigne J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. Nutrition et stress oxydant. *Nutrition clinique et métabolisme*, 16, pp: 233-239.

Podsedek A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review.*LWT*, 40, pp: 1-11.

Poletti A. (1982). Plantes médicinales. In « *Fleurs et plantes médicinales* ».Edition : Delachaux et Niestlé, pp: 192-196.

Poyart C. (2003). Les bactéries des infections nosocomiales. In « *Bactériologie systématique* ». Faculté de médecine Necker-Enfants malades. pp: 75-80.

Proestos C.; Boziaris I. S.; Nychas G.-J. E. and Komaitis M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95, pp: 664-671.

Puupponen-Pimiä R.; Nohynek L.; Meier C.; Kähkönen M.; Heinonen M.; Hopia A. and Oksman-Caldentey K.-M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, pp: 494-507.

Rahim A. A.; Rocca E.; Steinmetz J.; Kassim M.J.; Ibrahim M.S. and Osman H. (2008). Antioxidant activities of mangrove *Rhizophore apiculata* bark extracts. *Food Chemistry*, 107, pp: 200-207.

Ribéreau-Gayon J.; Peynaud E. ; Sudraud P. et Ribérau-Gayon P. (1982).Composés phénoliques. In « *Traité d'œnologie Sciences et techniques du vin* », Ed.: Dunod, ISBN: 2-04-015458-2, pp: 477-519.

Ribéreau–Gayon P. (1968). Notion générale sur les composés phénoliques. In « *Les composés phénoliques des végétaux* », Ed.: Dunod, pp: 1-27.

Richter G. (1993). Métabolisme des végétaux: physiologie et biochimie. Ed.: Française, ISBN: 2-88074-231-5, pp: 317-339.

Robbins R. J. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.*, 51, pp: 2866-2887.

Rodríguez H.; Curiel J.A.; Landete J.M. ; de las Rivas B. ;de Felipe F. L. ; Gómez-Cordovés C.; Mancheño J. M. and Muñoz R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 132, pp: 79-90.

Rodríguez Vaquero M. J.; Alberto M. R. and de Narda M. M. C. (2007). Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18, pp: 93-101.

Salminen J.-P.; Ossipov V.; Loponen J.; Haukioja E. and Pihlaja K. (1999). Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr A.*, 864, pp: 283-291.

Salminen J.-P.; Roslin T.; Karonen M.; Sinkkonen J.; Pihlaja K. and Pulkkinen P. (2004). Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *Journal of Chemical Ecology*, 30, pp: 1693-1711.

Scalbert A. and Williamson G. (2000). Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *American Society for Nutritional Sciences*, pp: 2073S-2085S.

Schauenbeg P. et Paris F. (1977). Guide des plantes médicinales Analyse, description et utilisation de 400 plantes. ISBN: 2-603-00001-2, pp: 330.

Sfahlan A. J.; Mahmoodzadeh A.; Hasanzadeh A.; Heidari R and Jamei R.(2009). Antioxidants and antiradicals in almond hull and shell (*Amygdalus communis* L.) as a function of genotype. *Food Chemistry*, 115, pp: 529–533

Shan B.; Cai Y.-Z.; Brooks J. D. and Corke H. (2007). The *in vitro* antibacterial activity of dietary and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, pp: 112-119.

Shi H.; Noguchi N. and Niki E. (2001). Introducing natural antioxidants- Natural antioxidants-. In "*Antioxidants in food*", ISBN 0-8493-1222-1. pp: 147-155.

Siddhuraju P. (2007). Antioxidant activity of phenolic compounds extracted from defatted raw and dry heated *Tamarindus indica* seed coat. *LWT* 40, pp: 982-990.

Siger A.; Nogala-Kalucka M. and Lampart-Szczapa E. (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*, 15, pp: 137-149.

Silvestre A. J. D.; Cavaleiro J. A. S.; Delmond B.; Filliatre C. and Bourgeois G. (1997). Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products*, 6, pp: 27-33.

Soong Y.Y. and Barlow P. J. (2005). Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1085, pp: 270–277.

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**.**

Spignon G.; Tramelli L. and De Faveri D. M.(2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81, pp: 200-208.

Spranger I.; Sun B.; Mateus A. M.; de Freitas V. and Ricardo-da-Silva J. M. (2008). Chemical characterization and antioxidant activities of oligomeric and polymeric procyanidin fractions from grape seeds. *Food Chemistry*, 108, pp: 519-532.

Stahl W. and Sies H. (2004). Bioactivity and protective of naturel carotenoids. *Biochimica and Biophysica Acta (BBA)*, 1741, pp: 101-107.

Stanojević L.; Stanojević M.; Nikolić V.; Nikolić L.; Ristić D.; Čanadanovic-Brunet J. and Tumbas V. (2009). Antioxidant Activity and Total Phenolic and Flavonoid Contents of *Hieracium pilosella* L. Extracts. *Sensors*, 9, pp: 5702-5714.

Suja K.P.; Jayalekshmy A. and Arumughan C. (2005). Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chemistry*, 91, pp: 213–219.

Tabart J.; Kevers C.; Pincemail J.; Defraigne J.-O. and Dommes J.(2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chemistry* 113, pp: 1226-1233.

Taguri T.; Tanaka T. and Kouno I. (2006). Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol. Pharm. Bull*., 29, pp: 2226-2235.

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.

Tapiero H.; Townsend D. M. and Tew K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* , 58, pp:100-110.

Tian F.; Ji B.; Yang J.; Zhang G.; Chen Y. and Luo Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla Chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, 113, pp: 173-179.

Tripoli E.; La Guardia M.; Giammanco S.; Di Majo D. and Giammanco M. (2007). *Citrus* flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties : A review. *Food Chemistry* 104, pp: 466-479.

Troszyńska A.; Estrella I.; M.; López-Amóres L. and Hernández T. (2002). Antioxidant Activity of Pea (*Pisum sativum L.*) Seed Coat Acetone Extract. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol*., 35, pp: 158-164.

Valko M.; Rhodes C. J.; Moncol J.; Izakovic M. and Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer**.** *Chemico-Biological Interactions*, 160, pp: 1–40.

Vankar P. S.; Tiwari V. and Srivastava J. (2006). Extracts of stem bark of *Eucalyptus globulus* as food dye with antioxidant properties. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 5, pp: 1664-1668.

Vattem D. A.; Ghaedian R. and Shetty K. (2005). Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac J Clin Nutr*, 14, pp: 120-130.

Vázquez G.; Fontenla E.; Santos J.; Freire M. S.; González-Álvarez J. and Antorrena G.(2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*). *Industrial Crops and Products*, 28, pp: 279-285.

Vermerris W. and Nicholson R. (2009). Lignins-Families of Phenolic Compounds and Means of Classification-.In "*Phenolic compound biochemistry*", ISBN: 978-1-4020-5163-0, pp: 20-23.

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.

Wang J.; Yuan X.; Jin Z.; Tian Y. and Song H. (2007). Free radical and reactive oxygen species scavenging activities of peanut skins extract. *Food Chemistry*, 104, pp: 242-250.

Wang T.; Jónsdóttir R. and Ólafsdóttir G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116, pp: 240–248.

Wichtl M. et Anton R. (2003). Plantes thérapeutiques. Tradition, pratique officinale, science et thérapeutique. Ed.: 2ème TEC& DOC, ISBN: 2-7430-0631-5, pp: 200-201.

Wong C.-C.; Li H.-B.; Cheng K.-W. and Chen F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, 97, pp: 705-711.

Yang J., Guo J. and Yuan J. (2008). In vitro antioxidant properties of rutin. *LWT* 41, pp: 1060-1066.

Yang X. M.; Guo QM. 2007. Studies on chemical constituents in fruits of *Eucalyptus globulus. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 32, pp: 496-500.

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.

Yu J., Ahmedna M., Goktepe I. (2005). Effects of processing methods and extraction solvents on concentration and antioxidant activity of peanuk skin phenolics. Food Chemistry, 90, pp: 199-206.

Zimmer N. et Cordesse R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Prod. Anim*., 9, pp: 167-179.

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.

Zin Z. M.; Abdul Hamid A.; Osman A. and Saari N. (2006). Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemistry*, 94, pp: 169-178.

Glossaire

Glossaire médical

Affection : Maladie.

Aisselles : Creux situé entre la partie supérieure et interne du bras et la partie du thorax (partie supérieure du tronc, située entre le cou et la partie abdominale).

Analgésique : Qui supprime ou atténue la douleur.

Anesthésique : Qui rend le corps ou une partie du corps insensible.

Angine : Inflammation aiguë de l'oropharynx atteignant les amygdales et souvent les piliers du voile du palais (segment supérieur de la cavité buccale comprenant une partie osseuse et une partie musculo-membraneuse).

Antibactérien : Qui inhibe le développement des bactéries.

Antibiogramme : Résultats de l'étude *in vitro* de la sensibilité d'un germe à différents antibiotiques.

Antibiotique : Toute substance naturelle capable d'inhiber *In vivo* le développement des bactéries.

Anti-diarrhéique : Qui est actif contre les diarrhées.

Anti-inflammatoire : Qui soulage les inflammations.

Antimicrobien : Qui détruit les microorganismes.

Antiparasitaire : Qui détruit les parasites.

Antirhumatismal : Qui exerce une action anti-inflammatoire dans certains affections rhumatismales.

Antiseptique : Qui détruit les germes pathogènes notamment par application externe.

Apoptose : Mort cellulaire programmée (suicide cellulaire).

Astringent : Renforce les muqueuses et la peau, réduisant ainsi les sécrétions et les saignements.

Athérome : Dépôt lipidique jaune, qui se forme sur les parois internes des artères et qui se calcifier ou s'ulcérer.

Athérosclérose : Affection dégénérative des artères, très répandue, associant les lésions de l'artériosclérose (durcissement de la paroi des artères) et de l'athérome.

Auto-anticorps : Anticorps produit par un antigène provenant de l'organisme du même sujet (auto-antigène).

Bactéricide : Qualificatif attribué aux antibiotiques qui agissent sur les bactéries en les détruisant.

Bactériostatique : Agent qui inhibe la croissance et la reproduction des bactéries sans les détruire.

Balsamique : Qui contient un baume (produit naturel d'origine végétal, formé de résine riche en acide benzoïque et en acide cinnamique) qui en a les propriétés.

Cancer : Résulte d'un déséquilibre dans les mécanismes de croissance et de multiplication cellulaire. La cellule cancéreuse se caractérise par des anomalies nucléaires avec mitoses fréquentes et anarchiques.

Cancérogène ou cancérigène : Qui peut provoquer un cancer.

Cardiovasculaire : Qui se rapporte au cœur et aux vaisseaux sanguins.

Cataplasme : Préparation médicinale, en général chaude, appliquée sur les parties douloureuses du corps.

Cataracte : Maladie qui touche les yeux par formation d'une zone sombre ou opaque dans le cristallin troublant la vue.

Céruloplasmine : Protéine permet le stockage du cuivre plasmatique.

Collagène : Scléroprotéine complexe, constituant essentiel des fibrilles et fibres du tissu conjonctif ainsi que des os et du cartilage.

Commensal : Se dit d'un microorganisme qui partage la nourriture de son hôte, sans préjudice pour celui-ci. On donne le nom de bactérie commensale à des germes non pathogènes chez l'Homme.

Décoction : Consiste à maintenir les drogues dures (tige et racine) avec l'eau potable à ébullition pendant une durée de 15 à 30 minutes.
Dysfonctionnement : Toute anomalie ou perturbation dans le fonctionnement d'un organe.

Engelure : Lésion, inflammation de la peau causée par le froid.

Fébrifuge : Qui fait disparaitre la fièvre.

Ferritine : Molécule protéique de poids moléculaire élevé, permettant le stockage tissulaire du fer (essentiellement dans le foie, la rate et la moelle osseuse).

Fibrose : Formation pathologique d'un tissu fibreux.

Fœtus : Produit de la conception depuis la fin du troisième mois de la grossesse jusqu'à l'accouchement.

Gingivite : Inflammation de la gencive.

Grippe : Maladie virale, épidémique qui s'accompagne d'une forte fièvre.

Hémorroïde : Dilatation variqueuse des veines de la muqueuse anale et rectale.

Hépato-biliaire : Qui se rapporte au foie et la bile et au système des canaux biliaires.

Immunosuppression : Réduction ou abolition des réactions immunologique d'un organisme contre un antigène.

In situ : à sa place normale, en position habituelle.

In vitro : Expression latine dans le verre ; réaction observable dans un tube à essai ou un autre récipient, qui se produit en dehors de l'organisme.

In vivo : Expression latine « dans l'être vivant » et s'appliquant à ce qui s'effectue ou se produit dans l'organisme ou chez un animal d'expérience.

Infection : L'ensemble des conséquences pathologiques qui peuvent en résulter d'un envahissement du l'organisme par un agent étranger tel que bactérie, virus, parasite capable de se multiplier.

Infection nosocomiale : Infection acquise dans les hôpitaux lors d'une hospitalisation pour une autre affection.

Infection opportunistes : Infection par un germe habituellement peu virulent qui apparait par suite d'une diminution des défenses de l'organisme.

Inflammation : Ensemble de réactions locales qui se produisent dans l'organisme en réponse à l'action irritante ou à la perturbation créées par un certains nombres de facteurs. Ces réactions se caractérisent essentiellement par quatre symptômes : rougeur, tumeur, chaleur et douleur.

Infusion : *Consiste* à verser sur la drogue de l'eau bouillante et à laisser refroidir. L'infusion convient aux drogues fragiles (feuilles, fleurs et semences) et aux drogues riches en huiles essentielles.

Inhalation : Action de respirer par le nez la vapeur produite par une préparation médicinale bouillante.

Intoxication alimentaire : Ensemble des troubles secondaires par l'ingestion d'aliments que ces troubles soient dus à une contamination bactérienne.

Nécrose : Processus de dégénérescence aboutissant à la destruction d'une cellule ou d'un tissu.

Neuro-dégénératives : Sous groupe de maladies dégénératives (dans lesquelles un ou plusieurs organes sont progressivement dégradés), qui affecte le fonctionnement du cerveau ou plus généralement le système nerveux.

Opportuniste : Microorganisme présent dans la flore (association d'espèce bactérienne vivant à l'état commensal sur leur hôte) normale de l'individu, qui n'est pas pathogène pour l'Homme dans les conditions normales, mais qui devient pathogène suite d'un affaiblissement des défenses de l'organisme.

Oropharynx : Partie moyenne, buccale du pharynx (conduit musculo-membraneux faisant communiquer la cavité buccale avec œsophage d'une part, les fosses nasales avec larynx d'autre part), limitée an haut par le voile du plais.

Otite : Inflammation, aiguë ou chronique de l'oreille.

Paludisme : Maladie infectieuse endémique provoquée par des parasites du genre plasmodium et transmise à l'Homme par la piqure des femelles des moustiques du genre anophèles.

Phagocyte : Cellule de l'organisme qui a la propriété d'absorber des microorganismes ou des corps étrangers.

Prolifération : Multiplication de cellules ou de bactéries.

Pulmonaire : Qui se rapporte au poumon.

Rhumatisme : Terme générique vague se rapporte à un groupe d'affections aiguës ou chroniques d'origine diverses et parfois inconnues affectant essentiellement les articulations.

Scavenger : Terme anglo-saxon signifiant piégeur.

Septicémie : Etat morbide dû à la dissémination sanguine de germes pathogènes provenant d'un foyer infectieux.

Tonique : Fortifie ou stimule l'activité de l'organisme.

Toxi-infection : Intoxication par des toxines bactériennes.

Ulcère : Perte de substance au niveau de la peau ou d'une muqueuse sans tendance à la cicatrisation spontanée et montrant une évolution chronique.

Vasodilatateur : *Substance* qui augmente le calibre des vaisseaux sanguins.

Viscéral : Qui se rapporte ou qui appartient à un viscère (Tout organe contenu dans une cavité du corps).

Glossaire Botanique

Actinomorphe (ou régulière) : Se dit d'une fleur dans les pièces des verticilles (sépales, pétales, étamines) sont rangées selon la symétrie axiale.

Angiospermes : Ce terme ressemble toutes les plantes dont les ovules sont inclus dans un ovaire clos. Après la fécondation, l'ovaire des angiospermes se transforme en fruit renfermant des graines.

Anthèse : Période pendant laquelle les pièces florales de la fleur s'ouvrent pour laisser échapper ou recevoir le pollen.

Arbre : Plante ligneuse, à tige ou tronc unique et droit dont la taille est d'au moins 5 à 7 m de hauteur, peut être considérable à l'âge adulte, non rameaux à la base, ne porte pas de branche qu'à partir d'une certaine hauteur au dessus du sol. Les branches se divisent en rameaux sur lesquels s'attachent les feuilles.

Arbustes : Végétal ligneux dont la taille est inférieure à 7 m, produisant un grand rameaux grêles mais présentant, par ailleurs, tous les caractères d'arbre. Les arbustes peuvent être à feuilles caduques ou à feuilles persistantes.

Baie : Fruit charnu sans noyau, généralement indéhiscent, à plusieurs graines (fruit à pépins).

Bisexuée ou Hermaphrodite : Se dit d'une fleur présentant à la fois les deux sexes, mâle et femelle. C'est le cas de la majorité des plantes à fleurs. Cette caractéristique ne signifie pas que ces fleurs hermaphrodites soient autofécondes

Capsule : Fruit sec, à déhiscences variées, à nombreuses graines, contenant une ou plusieurs loges et dérivant d'un ovaire à plusieurs carpelles.

Déhiscent : Se dit d'un organe qui s'ouvre à maturité pour libérer son contenu.

Drupe : Fruit charnu, indéhiscent, à graine presque toujours unique et possédant un noyau.

Ecorce : Couche externe d'une tige ligneuse, d'un tronc d'arbre, de ses branches ou d'une racine et qu'on peut détacher ; elle est de couleur, de consistance, de forme et d'épaisseur variable selon les espèces. S'exfoliant à sa partie externe et elle se renouvelle par le phellogène.

Entière : Se dit d'une feuille ou d'une foliole (sous unité indépendante d'une feuille composée) à limbe sans divisions, ni dents, ni saillies.

Etamine : Pièce formée de deux parties, les filets et l'anthère (partie terminale, élargie d'une étamine et renfermant, ordinairement, les grains de pollen).

Falciforme : Se dit d'un organe (feuilles le plus souvent) dont la forme arquée rappelle celle d'une faux ou d'une faucille.

Feuille : C'est l'organe principal de la photosynthèse, de la respiration de la transpiration des plantes; à son niveau se font les échanges entre le végétal et l'atmosphère.

Fruit : Ovaire mûr (habituellement après fécondation) et toute autre structure qui lui est étroitement associée.

Graine : Ovule fécondé par le pollen et renfermant l'embryon et ses réserves.

Gymnospermes : Ce sont des végétaux souvent de grande de taille, caractérisées par des graines nues c'est-à-dire non enfermées dans un carpelle comme les angiospermes.

Indéhiscent : Fruit qui ne s'ouvre pas à maturité par un mécanisme régulier et défini.

Ligneux : Qualifie un organe (tige, rameau ou racine) ou une plante pourvue d'un appareil de soutien bien développé, de nature analogue à celle du bois.

Limbe : Partie élargie de la feuille surmontant le pétiole.

Ombelle : Type d'inflorescence indéfinie chez laquelle les pédoncules floraux, tous de même taille sont insérés au même niveau.

Opercule : Petit couvercle de certains fruits à déhiscence circulaire.

Opposé : Se dit d'organes insérés par deux, l'un face à l'autre à la même hauteur.

Persistant : Qualifie des organes (feuille, calice) qui subsistent à la fin de chaque cycle végétatif annuel.

Sessiles : Se dit de tout organe (fleur, fruit, feuille) dépourvu de pédoncule, pédicelle ou pétiole et s'insère directement à l'axe principal.

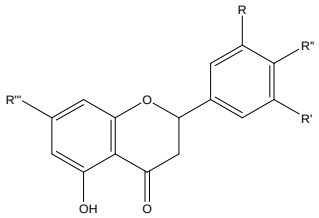
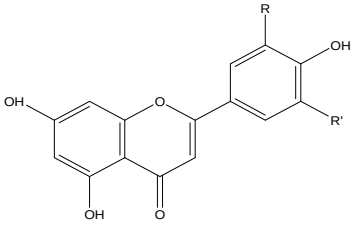
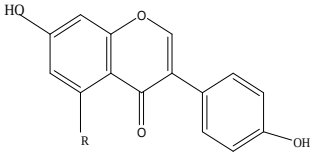
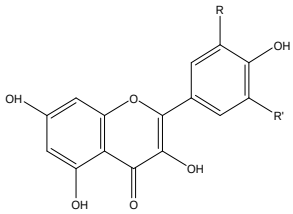
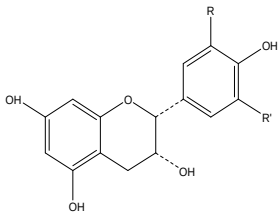
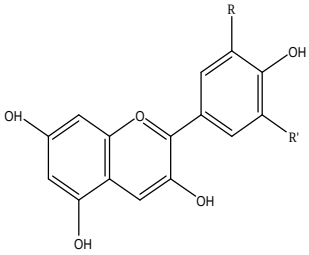
Spermaphytes, Spermatophytes : Embranchement du Règne végétal comprenant l'ensemble des végétaux supérieurs élaborant des graines.

Stipule : Appendice foliacé (organe ayant l'aspect d'une feuille) se présente le plus souvent deux par deux à la base du pétiole des feuilles.

Translucide : Qui laisse passer la lumière, mais ne permet pas de distinguer les contours.

Annexes

Tableau I : Structures chimiques de quelques flavonoïdes (Aruoma *et al.*, 2003; Pietta, 2000).

Classe	Structures de base	Exemples
Flavanones		R= R´=H, R´´=R´´´= OH; Naringénine R= OH, R´=H, R´´= R´´´= OH; Ériodictyol
Flavones		R=R´= H ; Apigénine R=OH, R´= H ; Lutéoline
Isoflavones		R= OH; Génestéine R= H; Daidzéine
Flavanols		R=R´= H; Kaempférol R=OH, R´= H; Quercétine R=R´=OH; Myricétine
Flavanols		R= OH, R´= H ; (-)-Epicatéchine R= R´= OH; (-) Epigallocatechine R=OH, R´= H; (+)-Catéchine R=R´= OH; (+)-Gallocatéchine
Anthocyanidines		R= OH, R´=H ; Cyanidine R= R´= OH ; Delphinidine R= R´= OCH_3; Malvidine

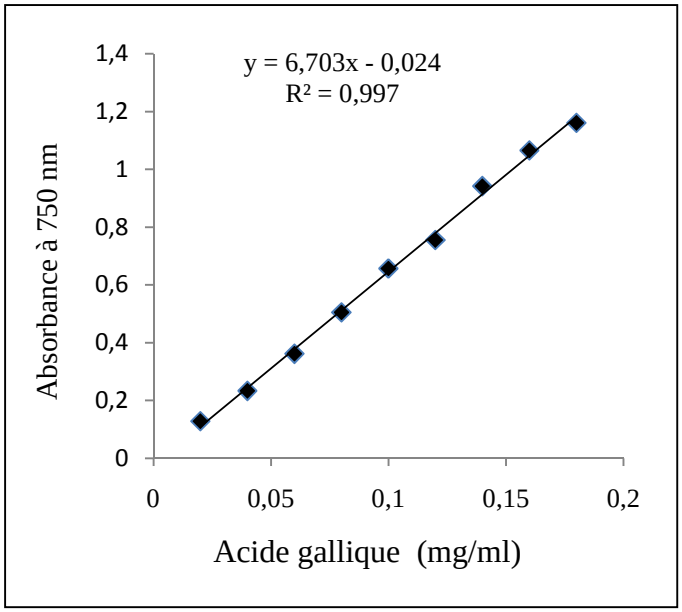


Figure 1: Courbe d'étalonnage pour le dosage des polyphénols totaux.

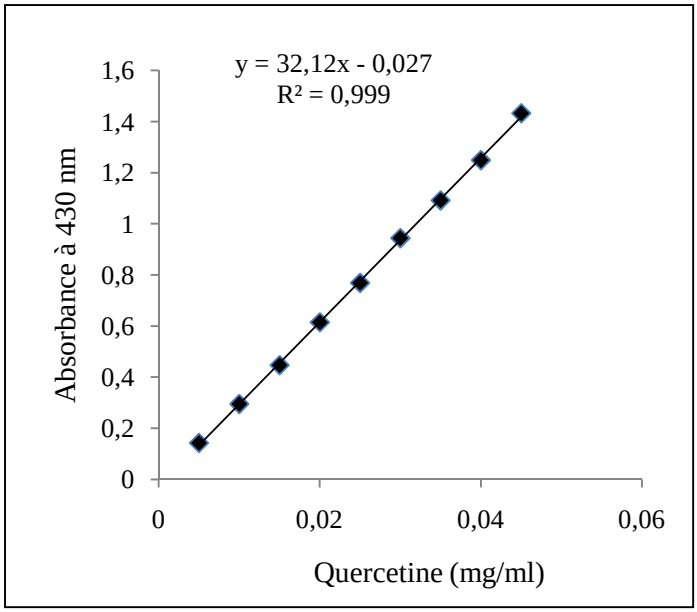


Figure 2: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonoïdes.

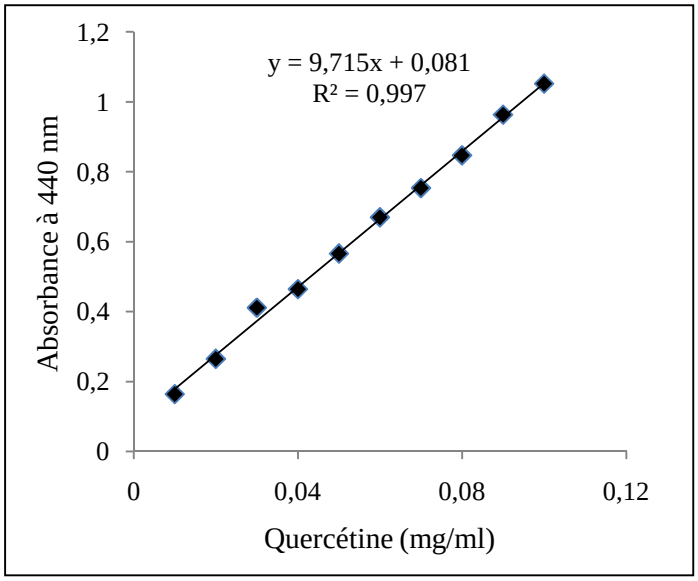


Figure 3: Courbe d'étalonnage pour le dosage des flavonols.

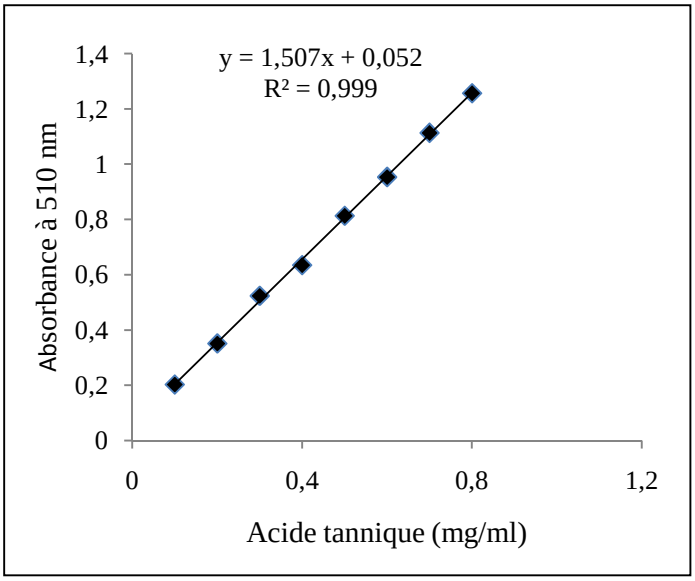


Figure 4: Courbe d'étalonnage pour le dosage des tannins.

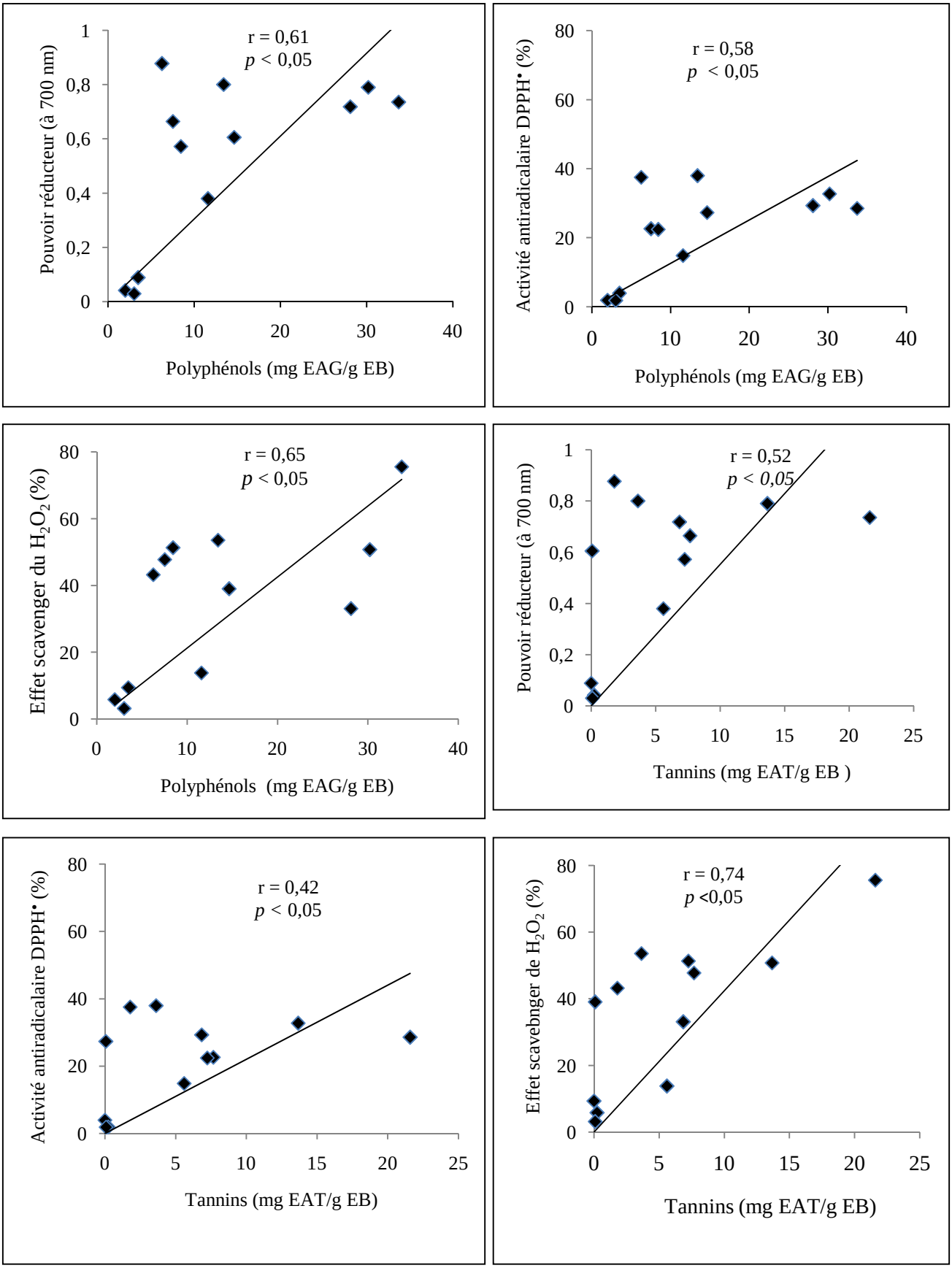


Figure 5: Courbes de corrélation établies entre les différents tests de l'activité antioxydante et les teneurs en composés phénoliques (polyphénols totaux et tannins) des différents extraits.

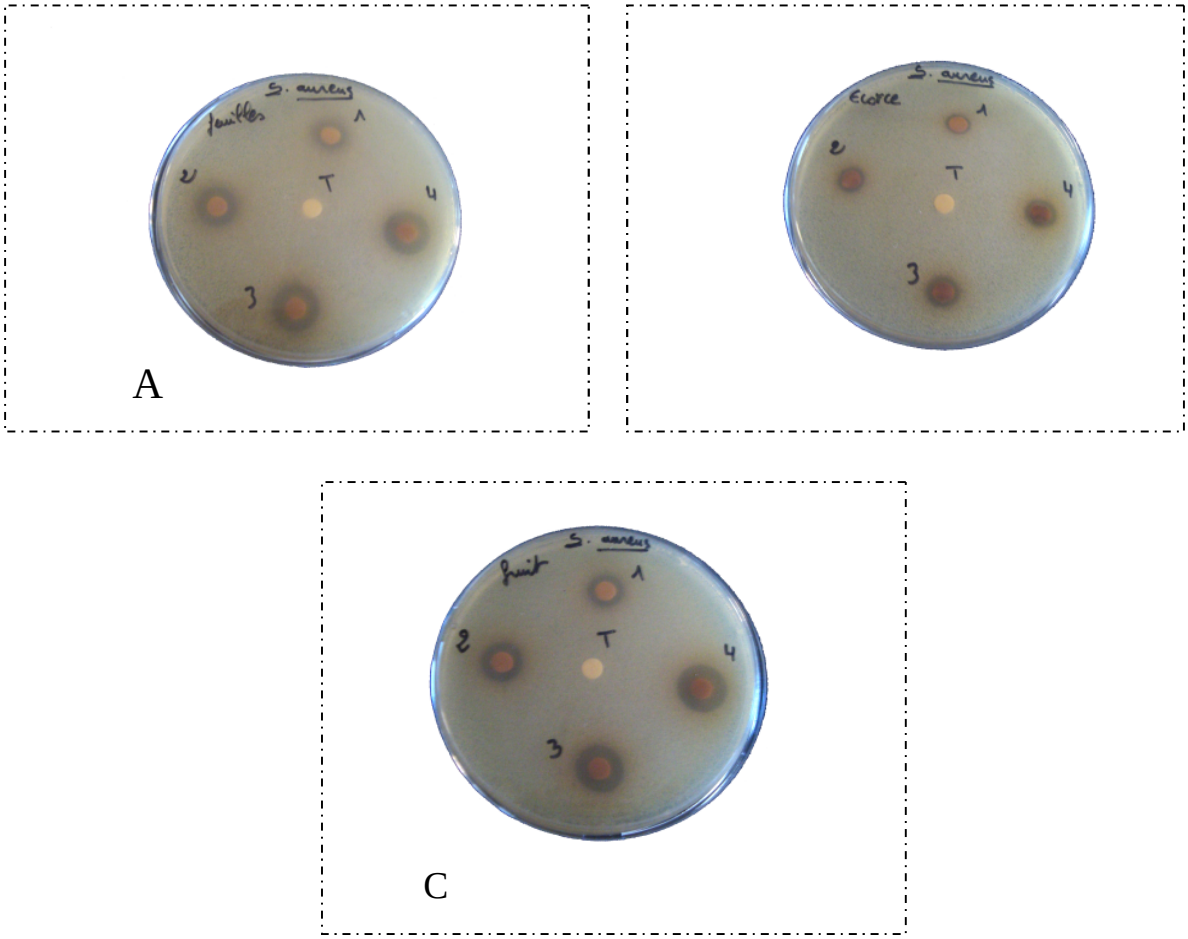


Figure 6: Activité des extraits des feuilles, d'écorce et fruits sur *Staphylococcus aureus*

A-Feuilles; B- Ecorce; C-Fruits.

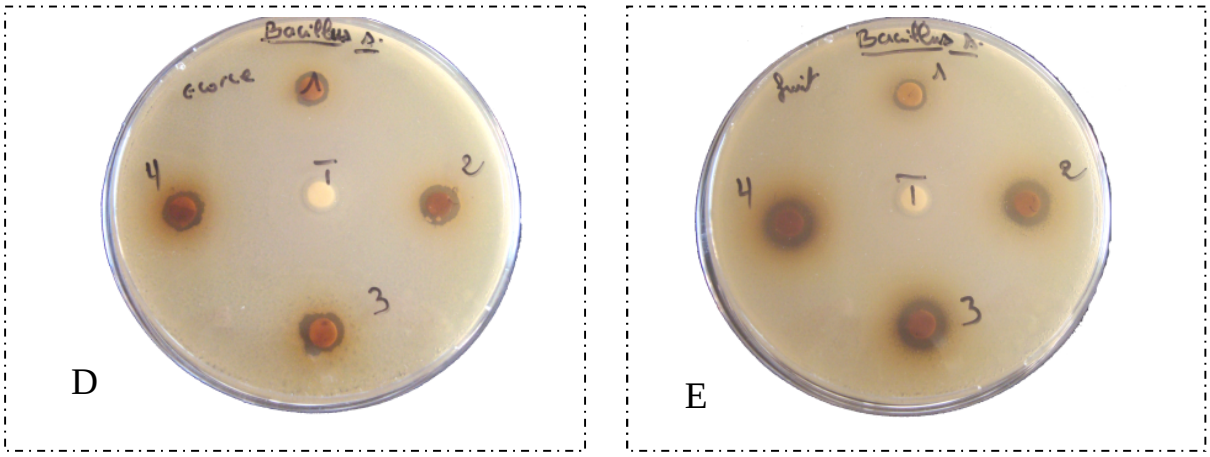


Figure 7: Activité des extraits d'écorce et des fruits sur *Bacillus subtilis*

D-Ecorce ; E : Fruits

1 -500 µg/disque ; 2-1000 µg/disque ; 3- 1500 µg/disque ; 4- 2000 µg/disque. T : Témoin (méthanol 80 %).

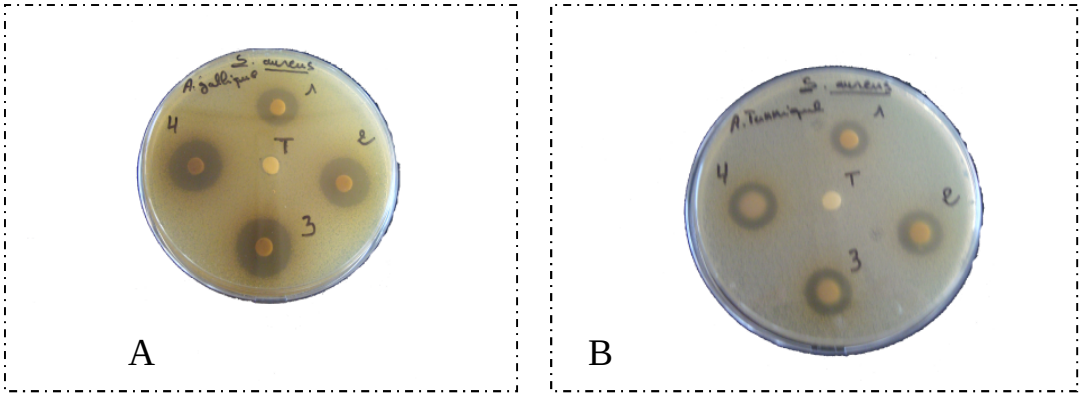


Figure 8: Activité de l'acide gallique et de l'acide tannique sur *Staphylococcus aureus*.

A- Acide gallique ; B- Acide tannique.

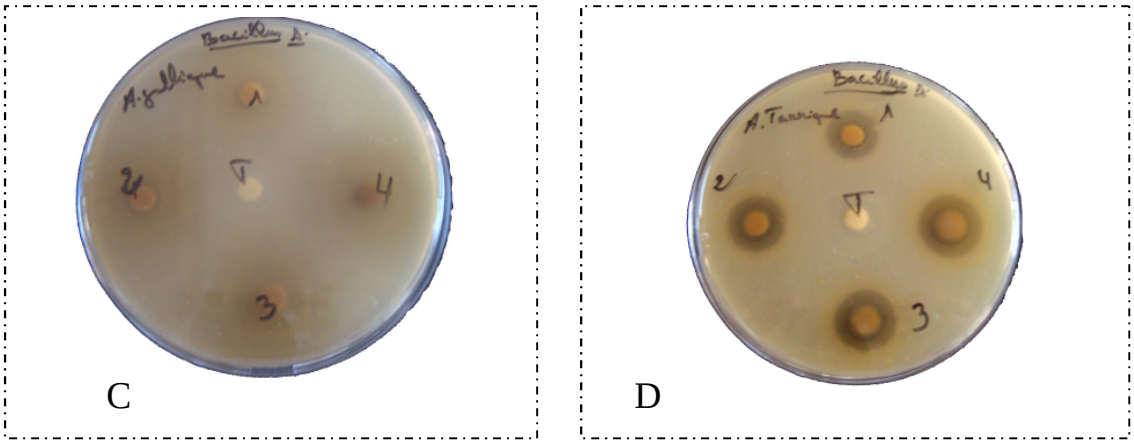


Figure 9: Activité de l'acide gallique et de l'acide tannique sur *Bacillus subtilis*

C- Acide gallique; D- Acide tannique.

1 -500 µg/disque ; 2-1000 µg/disque ; 3- 1500 µg/disque ; 4- 2000 µg/disque. T : Témoin (méthanol 80 %).

Composition des milieux de culture (pour un litre d'eau distillée) (Guirant et Galzy, 1980; Larpent *et al*., 1997)

Gélose Héktoen

Peptone……	12 g
Extrait de levure……..	3 g
Chlorure de sodium…….	5 g
Thiosulfate de sodium…….	5 g
Sels biliaires……	9 g
Citrate de fer ammoniacal…...	1,5 g
Salicine……	2 g
Lactose……	12 g
Saccharose……..	12 g
Fuchsine acide……	0,100 g
Bleu de bromothymol…….	0,065 g
Agar……	13,0 g
	pH = 7,5

PCA (Plate Count Agar)

Peptone…….	5 g
Extrait de levure……...	2,5 g
Glucose…….	1 g
NaCl…….	10 g
Agar…….	14 g
	pH = 6,8

Eau physiologique

Chlorure de sodium……..... 8,5 g

Répartir dans les tubes à essais, Autoclaver pendant 20 minutes à 120 °C.

Gélose Chapman

Extrait de viande……	1 g
Peptone de caséine et de viande…	10 g
Chlorure de sodium……...	75 g
D-Mannitol……....	10 g
Agar……	15 g
Rouge de phénol……	0,025 g
	pH = 7,4

Bouillon nutritif

Peptone…….	10 g
Extrait de viande……..	5 g
Chlorure de sodium……..	5 g
	pH= 7,2

Mueller-Hinton

Extrait de viande……	2 g
Hydrolysat acide de caséine……..	17,5 g
Amidon……..	1,5 g
Agar……	10 g
	pH = 7,4

Caractères bactériologiques, habitat des bactéries étudiées et mode de transmission de ces bactéries

Klebsiella pneumoniae Cette espèce fait partie de la famille des Enterobacteriaceae (ou entérobactéries) à Gram négatif, aéro-anaérobique, immobile, non sporulée, oxydase-, uréase+, fermente l'acétoïne (réaction de Voges Proskauer +), catalase+, réduit les nitrates en nitrites, fermente plusieurs sucres avec production de gaz, non protéolytique, diplobacilles et généralement capsulée. Sur un milieu gélosé, les colonies sont caractéristiques : elles sont volumineuses, bombées, brillantes et très visqueuses à cause de la capsule. *K. pneumoniae* est très répandue dans la nature, elle existe dans le sol, l'eau, la poussière. C'est une bactérie commensale du tube digestif de l'Homme et des animaux. Chez l'Homme, elle se retrouve également dans l'oropharynx (Delarras, 2007; Fauchère et Avril, 2002; Guiraud, 2003; Poyart, 2003). Les infections peuvent être manuportées de malade à malade ou par la contamination de l'environnement par l'intermédiaire des matières fécales ou des eaux d'égout. Cette bactérie est un agent d'infections nosocomiales et également agent d'intoxications alimentaires (Avril *et al.*, 2000; Guiraud, 2003).

Figure 10: Aspect des colonies de *K. pneumoniae* sur milieu Héktoen

Colonies bombées, visqueuses, volumineuses et de couleur jaune-saumon

Staphylococcus aureus Elle est de la famille des Micrococcaceae, à Gram positif, sous forme de cocci, groupée généralement en amas, non sporulée, catalase +, halophile, mannitol+ et coagulase+. Elle se retrouve dans le sol, l'air et l'eau. Cette bactérie est également résistante aux conditions hostiles de l'environnement (chaleur, sécheresse, salinité). C'est une bactérie commensale de la peau des animaux et de l'Homme et également de la muqueuse de l'Homme. A l'état normal, elle se trouve dans l'oropharynx, les fosses nasales, dans les selles, au niveau du périnée ou des aisselles (Berche, 2003; Fauchère et Avril, 2002).

Les infections peuvent être manuportées d'une personne à une autre ou transmises par l'intermédiaire de matériels ou d'environnements contaminés. *Staphylococcus aureus* est un agent majeur d'infections nosocomiales et des toxi-infections alimentaires (Berche, 2003; Fauchère et Avril, 2002).

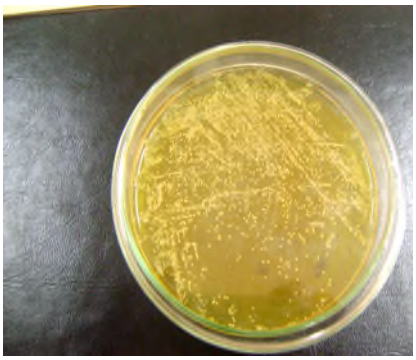


Figure 11: Aspect des colonies de *S.aureus* sur milieu Chapman

Très petites colonies de couleur jaune doré

Bacillus subtilis Cette bactérie appartient à la famille des Bacillaceae, bactérie à Gram positif, sous forme de bacille, catalase+, aérobie strict, mobile, apte à la sporulation et protéolytique. C'est une bactérie banale, très répandue dans la nature en particulier dans le sol, dans la poussière et sur les végétaux. Elle contamine de nombreux produits alimentaires tels que la volaille et les poissons. En raison de son aptitude à la sporulation, elle résiste aux conditions défavorables et peut être à l'origine de la dégradation des conserves alimentaires. C'est un agent de toxi-infections alimentaires (Fauchère et Avril, 2002; Guiraud, 2003).

Figure 12: Aspect des colonies de *B. subtilis* sur la PCA.

Petites colonies, de couleur jaune-blanchâtre, formes irrégulières (contours ondulés).

Résumé

Le gommier bleu (*Eucalyptus globulus*) est très utilisé en médecine traditionnelle en Algérie. Dans la présente étude, les extraits bruts des différentes parties de *Eucalyptus globulus* (feuilles, écorce et fruits) ainsi que leurs fractions obtenues par chromatographie sur colonne de gel Sephadex LH-20 ont été étudiés pour quantifier leurs teneurs en polyphénols et leur activité antioxydante (pouvoir réducteur du fer, effet piégeage du radical libre DPPH$^{\bullet}$ et l'activité réductrice de H_2O_2). De plus, l'evaluation de l'activité antibactérienne des extraits bruts. Les extraits bruts ont subi aussi le test de l'activité antibactérienne. L'analyse phytochimique des trois parties a révélé des teneurs en polyphénols totaux allant de (432 - 520 mg EAG/ g). L'écorce, les fruits et les feuilles ont les teneurs suivantes (518, 88 mg EAG/g EB) et (464,71 mg EAG/gEB) et (432,63 mg EAG/gEB), respectivement. Les fractions ainsi obtenues ont révélé des teneurs non négligeables en polyphénols. Tous les extraits bruts ont exercé un pouvoir réducteur supérieur à l'α tocophérol. L'extrait des fruits a montré une meilleure activité antiradicalaire inhibitrice de DPPH$^{\bullet}$ avec la plus faible CI_{50} (102,78 µg/ml) suivi des extraits des feuilles (CI_{50} 114,25 µg/ml), de l'écorce (CI_{50} 115,40 µg/ml) et de l'α tocophérol (CI_{50} 233,78 µg/ml). Cependant, l'extrait de l'écorce a présenté une meilleure activité inhibitrice du peroxyde d'hydrogène (75, 55% à 65 µg/ml), suivi de celui des fruits (50,74 %), des feuilles (33,06 %) et de l'α -tocophérol (20,07%) à la même concentration. Les fractions B et C ont exercé des pouvoirs antioxydants faibles par rapport à ceux des extraits bruts et mêmes parfois des pouvoirs supérieurs aux extraits bruts dont elles sont issues, cas des fractions B et C des feuilles. En revanche, la fraction A a dévoilé le pouvoir antioxydant le plus faible. De plus, les extraits des feuilles, de l'écorce ainsi que des fruits semblent capables d'inhiber la croissance de bactéries pathogènes essentiellement *staphylococcus aureus*.

Tous ces résultats mettent en valeur les différentes applications thérapeutiques de cette plante dans la médecine traditionnelle et encourage la recherche de nouvelles molécules naturelles à caractères antioxydant et antibactérien dont le but de les investir dans les différentes industries : pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires,… etc.

Mots-clés : *Eucalyptus globulus*, Frcationnement, Sephadex LH-20, Polyphénols, Activité antioxydante, Activité antibactérienne.

Abstract

The bleu gum tree (*Eucalyptus globulus*) is very used in traditional medicine in Algeria. In this study, the crude extract from different parts of *Eucalyptus globulus* (leaves, bark and fruits) and their fractions obtained by Sephadex LH-20 column were studies to quantify their levels of phenols and antioxidant activity (ferric reducing power, DPPH$^{\bullet}$ radical scavenging activity and scavenging of hydrogen peroxide). Thus, the evaluation of the antibacterial effect of the crude extract. The phytochemical analysis of the three organs exhibited different total phenols contents (432 - 520 mg GAE/ g CE). The phenolic contents were (518.88 mg GAE/g CE), (464.71 mg EGA/g CE) and (432.63 mg GAE/g CE) for bark, fruits and leaves, respectively. The fractions obtained showed a significant levels on phenolic compounds. All extracts exhibited a reducing power effect, higher than that of α-tocopherol. It was observed that fruits extract displayed the highest DPPH$^{\bullet}$ scavenging ability with the lowest IC_{50} value (IC_{50} 102.78 µg/ml), followed by leaves (IC_{50} 114.25 µg/ml), bark (IC_{50}115.40 µg/ml) and α tocopherol (IC_{50} 233.78 µg/ml). However, bark extract displayed the highest ability to scavenge hydrogen peroxide at 65 µg/ml concentration (75. 55%), followed by fruits (50.74 %), leaves (33.06 %) and α-tocopherol (20.07%) at the same concentration. The results showed that fractions B and fraction C exhibited considerably lower antioxidant activities for all antioxidant tests to those of crud extract with the exception for fraction C and fraction B of leaves witch showed antioxidant activity higher than their crude extract. Whereas, fraction A unveiled the lowest antioxidant capacity for all antioxidant tests. In addition, crude extracts of leaves, bark and fruits were efficient to inhibit growth of pathogenic bacteria mainly *Staphylococcus aureus*.

These results highlight the various therapeutic applications of this plant in traditional medicine and stimulate research of novel natural molecules with antioxidant and anti-bacterial effects and their investigation in several industrial fields: pharmacological, cosmetic, food, …etc.

Keywords: *Eucalyptus globulus*, Fractionation, Sephadex LH-20, Polyphenols, Antioxidant activity, Antibacterial capacity.

ملخص

الكاليتوس(*Eucalyptus globulus*) كثيرة الاستعمال في الجزائر في الطب التقليدي.في هذه الدراسة تم من جهة ،التقييم الكمي للمركبات الفينولية لمختلف مستخلصات الخامة للكاليتوس (الأوراق،القشرة و الفواكه) و مستخلصات الكروماتوجرافيا الناتجة من الفصل الكروماتوجرافي للمستخلصات الخامة باستعمال (Sephadex LH-20) و من جهة أخرى تقييم القوة المضادة للأكسدة للمستخلصات بالطرق التالية (قوة إرجاع الحديد،قوة تثبيط الجدر الحر DPPH$^{\bullet}$ وقوة تثبيط بيروكسيد الهيدروجين). كذلك مدى كبح المستخلصات الخامة لنمو البكتريا. من الناحية الكمية مستخلص القشرة يحتوي على ما يعادل (518،88 ملغ لحمض الغاليك/غ المستخلص الخام) يليه مستخلص الفواكه و الأوراق بكميات تقدر ب 464،71 ملغ لحمض الغاليك /غ المستخلص الخام و432،63ملغ لحمض الغاليك /غ المستخلص الخام على التوالي .مستخلصات الكروماتوجرافيا تحتوي أيضا على كميات معتبرة من المركبات الفينولية.أوضحت النتائج بان كل المستخلصات قادرة على إرجاع الحديد و تجتاز قوة ارجاع التكوفيرول α .النتائج أوضحت أن مستخلص الفواكه اظهر قوة عالية في تثبيط الجذر الحر DPPH$^{\bullet}$ بإعطائه تركيز لكبح 50 % يقدر ب (102،78 ميكروغ/مل).يليه مستخلص الأوراق (114،25ميكروغ/مل) ثم مستخلص القشرة (115,40ميكروغ/مل). بينما مستخلص القشرة يتميز بأكثر فعالية في إرجاع بيروكسيد الهيدروجين حيث تقدر النسبة بحوالي 75،55 % لتركيز 65 مكروغ/مل ،يليه مستخلص الفواكه بنسبة 50،74 % ثم مستخلص الأوراق بنسبة تقدر ب (33،06 %) واخيرا التكوفيرول-α (20،07 %) لنفس التركيز. أوضحت النتائج أيضا أن مستخلص الكروماتجرافي 'ج' و 'ب' لديهما قوة إرجاع اقل من مستخلصهما الخام و أحيانا أكثر قوة من الخام مثل مستخلص الكروماتوجرافي 'ج' و 'ب' للأوراق.مستخلص الكروماتوجرافي 'ا' يتميز بقوة مضادة للأكسدة جد ضعيفة. أثبتت النتائج أيضا أن مستخلصات الأوراق،القشرة و الفواكه قادرة على كبح نمو البكتيريا المسببة للأمراض عند الإنسان مثل : *Staphylococcus aureus* .

هذه النتائج قد قيمت استعمال هذا النبات في معالجة الكثير من الأمراض في الطب التقليدي وتشجيع البحث على جزيئات جديدة متميزة في قدرتها المضادة للأكسدة وكبحها لنمو البكتيريا و استغلالها في مجالات عدة مثل : صناعة المواد الغذائية ،الصيدلانية،التجميلية...الخ.

مفتاح الكلمات : الكاليتوس، الفصل الكروماتجرافي، المركبات الفينولية، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.