

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET
DE BIOCHIMIE

N° :



DOMAINE : SCIENCE DE LA NATURE ET DE
LA VIE
FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE
OPTION : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par: GUEDDAH Ahlam

SOUALAT Khadidja

Intitulé

Activité antioxydante et antibactérienne
D'Eucalyptus globulus

Soutenu devant le jury composé de:

Mme. BOUHADDA Amina	Université Msila	Présidente
Mme. BENCIKH Dalila	Université Msila	Rapporteur
Mme. GUESMIA Khaoukha	Université Msila	Examinatrice

Année universitaire : 2018/2019



REMERCIEMENTS

*Nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir accordé la force,
le courage et la patience pour terminer ce mémoire.*

*Nous exprimons nos remerciements et nos sincères gratitudees à « Mme.
Benchikh Dalila » notre encadreur, pour son aide précieux et
sa patience durant toute la période de la réalisation de notre travail.
Elle nous a orienté vers le succès avec ses connaissances et partageons
des idées et aussi l'encouragement tout au long de nos épreuves.*

*Sans oublier tous les enseignants du département de microbiologie et de
Biochimie.*

*Nous remercions les membres de jury: « Mme. Bouhadda Amina » d'avoir présidé ce jury,
et « Mme. Guesmia Khaoukha » d'avoir accepté de juger notre modeste travail
malgré leurs multiples préoccupations.*

*Nos plus vifs remerciements vont à tous les membres de l'équipe des
laboratoires du Département pour leur accueil, leur sympathie ainsi que
leurs idées constructives, ainsi qu'à tous nos collègues de promotion Biochimie appliquée.
Nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou loin.*



Dédicaces

*Avec l'aide de **DIEU**, j'ai pu réaliser ce modeste travail
que je*

dédie A :

*Mes chers parents comme un témoignage de mon grand
amour :*

Mohammed & Hayat.

Mon frère : Mehdi.

*Mes sœurs : Karima, Maria, Chaima, Basmalla et
Dinna.*

*Mes amis sans oublier: Asma, les deux Soumia,
Achwak, Nacira et Leila.*

Pour leur présence de tous les instants,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

AHLAM



*Avec l'aide de **DIEU**, j'ai pu réaliser ce modeste travail
que
je dédie A :*

*Mes chers parents comme un témoignage de mon grand
amour :*

Mohammed & Messaouda.

Ma sœur : Fatiha.

Mes frères : Hamza, Saddam, Soufian et Ismail.

*Mes amis sans oublier: Asma, les deux Soumia, Achwak,
Nacira et Leila.*

Pour leur présence de tous les instants,

Pour le soutien qu'ils m'ont apporté,

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

KHADIDJA

Sommaire

ملخص.....	I
Résumé.....	II
Abstract.....	III
Liste des abréviations.....	IV
Liste des tableaux.....	VI
Liste des figures	VII
Liste des annexes	VIII
Introduction	1

Partie I : Synthèse bibliographique

1. Présentation de la plante étudiée	3
1.1. Généralités sur la plante	3
1.2. Synonyme et Nomenclature	3
1.3. Description botanique d' <i>Eucalyptus globulus</i>	3
1.3.1: Feuilles.....	3
1.3.2: Fleurs	4
1.3.3: Fruits.....	4
1.4. La systématique botanique.....	4
1.5. Origine et répartition géographique	4
1.6. Composition chimique d'E.globulus	5
1.7. Effets thérapeutiques d'E.globulus	5
2. Stress oxydatif	5
2.1. Définition	5
2.2. Les radicaux libres.....	6
2.3. Les sources des radicaux libres	6
2.4. Les cibles des radicaux libres	7
2.5. Les antioxydantes.....	7
2.5.1. Les Systèmes de défense antioxydantes	8
3. Les composés phénoliques	9
3.1. Classification des polyphénols.....	9
3.1.1. Les acides phénoliques.....	9
3.1.2. Les flavonoïdes.....	9
3.1.3. Les tanins.....	9
4. Activité antibactérienne	10

4.1. Généralité.....	10
4.2. Mode d'action des antibiotiques	10
4.3. Description des bactéries étudiées	10
4.3.1. Bactéries à Gram positif	10
4.3.2. Bactéries à Gram négatif	11
4.4. Activité antibactériennes des polyphénols	11

Partie II : Matériel et méthodes

II .1.Matériel végétal	12
II.2. Préparation de l'extrait	12
II.3. Dosage des polyphénols totaux	12
II.4. Dosage des flavonoïdes totaux	13
II.5.Activités biologiques	14
5.1. L'activité antioxydante	14
5.1.1. Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode du DPPH	14
5.2. L'activité antibactérienne	15
5.2.1. Origine et choix des souches microbiennes	15
5.2.2. Préparation de l'inoculum	15
5.2.3. Méthode de diffusion sur gélose	16
5.2.4. L'antibiogramme	16
5.2.5. Traitement statistique	16

Partie III : Résultats et discussions

III.1. Rendement de l'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i>	17
III.2. Dosage des polyphénols totaux.....	18
III.3.Dosage des flavonoïdes totaux	18
III.4.Activité biologique d'extrait	19
4.1. Activité antiradicalaire par la méthode de réduction de radical libre DPPH.....	19
4.2. L'activité antibactérienne	21
4.2.1. Test antibactérien... ..	21
4.2.2. L'antibiogramme.....	23
Conclusion et perspectives.....	26

Références bibliographiques

Annexes

ملخص :

Eucalyptus globulus (الكالاتوس) هو نبات طبي ينتمي الى عائلة *Myrtaceae*. تم تحضير المستخلص المائي من هذه النبتة من الجزء الهوائي (الأوراق). حيث قدر المردود ب 8.639 %. أظهر التقدير الكمي (polyphénols و flavonoïdes) باستعمال طريقة التلوين أن هذا المستخلص غني بهذه المركبات (280,6372 ug EAG/mg) (d'extract ; (37,2839 ug EQ/mg d'extract) على التوالي . بالإضافة الى نشاط مضادات الأكسدة باستعمال طريقة إزالة الجذور الحرة DPPH حيث ان IC50 قدر ب 0.0189 ± 0.0015 (ملغ/مل) وهي أقل من تلك التي تم الحصول عليها بواسطة BHT 0.0012 ± 0.0057 (ملغ / مل).

في حين تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات ضد أربع سلالات بكتيرية (*Bacillus,S ; Staphylococcus aureus*) (*Escherichia coli et Pseudomonas aeruginosa*) باستعمال طريقة الانتشار فوق الجيلوز. اظهرت النتائج ان المستخلص له نشاط مضاد للبكتيريا موجبة الغرام بدرجات متفاوتة بينما في البكتيريا سالبة الغرام لا يوجد تأثير واضح.

كل هذه النتائج تثمن التطبيقات العلاجية المختلفة لهذا النبات في الطب التقليدي وتشجع على البحث عن جزيئات طبيعية جديدة ذات خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للجراثيم تهدف إلى الاستثمار في صناعات مختلفة: الأدوية، مستحضرات التجميل، الغذاء الخ.

الكلمات المفتاحية : الكاليتوس، نشاط مضاد للأكسدة ، نشاط مضاد للجراثيم ، DPPH ، Polyphénols .

Résumé :

Eucalyptus globulus (Kalitus) est une plante médicinale appartient à la famille des *Myrtacées*, L'extrait aqueux de la plante a été préparé à partir de la partie aérienne (feuilles). Le rendement d'extraction est d'ordre 8,639%. L'estimation quantitative des phénols totaux, flavonoïdes par la méthode colorimétrique a montré que l'extrait est riche en ces composés (280,6372 ug EAG/mg d'extrait) ; (37,2839 ug EQ/mg d'extrait) par ordre. L'activité antioxydant a été évaluée par la méthode de piégeage de radical libre DPPH dont l'IC₅₀ a été estimée à 0,0189±0,0015 mg/ml qui est inférieur à celle obtenue par le BHT (0,0057± 0,0012 mg/ml).

L'activité antimicrobien a été déterminé vis-à-vis quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) par la méthode de diffusion sur géloses. Les résultats mettent en évidence que l'extrait à manifesté une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif à des degrés variables, tandis que sur les bactéries à Gram négatif y'a aucun effet manifeste.

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 caractère antioxydante et antibactérien dont le but de les investir dans les différentes industries : pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires,... etc.

Mots-clés : Activité antibactérienne, Activité antioxydante, DPPH, *Eucalyptus globulus*, Polyphénols.

Abstract :

Eucalyptus globulus (Kalitus) is a medicinal plant belongs to the family Myrtaceae. The extract was prepared from the aerial part (leaves). The extraction yield is of the order 8.639%. Quantitative estimation of total phenols, flavonoid by the colorimetric method showed that the extract is rich in these compounds (280,6372 ug EAG/mg d'extract) ; (37,2839 ug EQ/mg d'extract) by order. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical scavenging method, the IC₅₀ of which was estimated to be 0.0189 ± 0.0015 mg / ml which is lower than that obtained by BHT (0.0057 ± 0.0012 mg / ml).

The antimicrobial activity was determined against four bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) by the agar diffusion method. The results demonstrate that the extract showed antibacterial activity against Gram positive bacteria to varying degrees, where as on Gram negative bacteria there is no obvious effect.

All these results highlight the different therapeutic applications of this plant in traditional medicine and encourages the search for new natural molecules with antioxidant and antibacterial characteristic whose purpose is to invest in different industries: pharmaceuticals, cosmetics, food, etc.

Keywords: Antibacterial activity, Antioxidant activity, DPPH, *Eucalyptus globulus*, Polyphenols.

Liste des abréviations :

A : Absorbance.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

AG : Acide gallique.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

AM : Ampicilline.

ARN : Acide Ribonucléique.

BHT: Butylated hydroxytoluène.

CAT : Catalase.

CCTA : Collection de Culture de type Américaine.

CI₅₀ : Concentration inhibitrice 50%.

DMSO: Diméthyl sulfoxyde.

DPPH : 2' 2-Di Phenyl-1-Picryl hydrazyl.

EAQ : Extrait aqueux.

ERO : Espèce réactives de l'oxygène.

GEN : Gentamicine.

GPX : Glutathion Peroxydase.

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène.

H.E : Huile essentielle.

O₂· : l'anion superoxyde.

OH : hydroxyle.

OMS : L'Organisation Mondiale de la Santé.

OX : Oxacilline.

PS : Poids sec.

Q : Quercétine.

RL : Radicaux libres.

Se : Sélénium.

SOD : Superoxyde dismutase.

T° : Température.

Zn : Zinc.

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Bactéries utilisées pour les tests antibactériens.....	15
Tableau 02 : Les antibiotiques testés sur les bactéries étudiées.....	16
Tableau03 : Aspect, couleur et rendement d'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i>	17
Tableau 04 : Teneur en polyphénols totaux d'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i>	18
Tableau 05 : Teneur en flavonoïdes totaux d'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i>	18
Tableau 06 : Valeurs d'IC50 d'extrait aqueux et de BHT.....	20
Tableau 07 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait aqueux d' <i>Eucalyptus globulus</i>	22
Tableau 08 : Diamètres des zones d'inhibition de l'antibiogramme des quatre souches utilisées.....	24

Liste des Figures :

Figure 01 : Feuilles, fleurs, fruits et graines d' <i>E.globulus</i>	4
Figure 02 : Définition du stress oxydant.....	5
Figure 03 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydante.....	6
Figure 04 : Sources de production des radicaux libres.....	6
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes	9
Figure 06 : Localisation géographique du site de l'échantillonnage d' <i>E.globulus</i> . Région de Ras-El-Oued (Sétif).....	12
Figure 07 : Courbe standard de l'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux. (Moyenne \pm SD).....	13
Figure 08 : Courbe standard de la quercétine pour la détermination des flavonoïdes totaux. (Moyenne \pm SD de trois mesures).....	14
Figure 09 : les pourcentages d'inhibition de DPPH en fonction de différentes concentrations du BHT et l'extrait aqueux.....	20
Figure 10 : Les zones d'inhibition de la croissance des quatre bactéries utilisées induites par l'extrait d' <i>Eucalyptus globulus</i>	21
Figure 11 : L'antibiogramme des quatre souches utilisées.....	23

Liste des annexes :

Annexe I :

Figure 01: Structure chimique de l'eucalyptol (Pietta, 2000).

Annexe II :

Matériels et produits utilisées.

Annexe III :

Tableau 01 : Echelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne (Ponce et *al.*, 2003).

Introduction

Introduction

Le corps humain produit des radicaux libres telles que: l'anion superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), 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 radicaux libres 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 et le diabète (Biglari *et al.*, 2008).

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, diverses études sont focalisées sur l'extraction des antioxydantes naturels à faible coût à partir des plantes médicinales qui peuvent remplacer les additifs de synthèses qui pourraient être cancérigènes et même toxiques pour le consommateur (Daker *et al.*, 2008).

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

Il y a une préoccupation concernant les effets indésirables des molécules synthétiques destinées à la lutte contre le stress oxydant et les infections bactériennes. Il semble donc important de trouver une alternative à l'utilisation des antioxydantes synthétiques et des antibiotiques classiques. Les remèdes à base de plantes constituent une alternative dans les systèmes de soins primaires et donc, une voie prometteuse pour le développement des médicaments traditionnellement améliorés. Récemment, beaucoup de chercheurs s'intéressent aux plantes médicinales pour leur richesse en antioxydantes naturels à savoir les polyphénols, les flavonoïdes, les tannins, etc. qui possèdent des activités antioxydantes et antimicrobiennes. De ce fait, l'exploitation de nouvelles molécules bioactives ayant des effets secondaires limités ou inexistantes depuis des sources naturelles et leur adoption comme une alternative

Introduction

thérapeutique aux molécules synthétiques sont devenues des objectifs prioritaires pour les recherches scientifiques et les industries alimentaires et pharmaceutiques.

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la recherche des antioxydantes et des antibactériens naturels en évaluant les propriétés antioxydantes et antibactériennes d'extrait d'une plante médicinale largement distribuée en Algérie: *E. globulus*.

Les objectifs de la présente étude sont :

- Préparation d'extrait de la partie aérienne de la plante *E. globulus*.
- Evaluation de la teneur en polyphénols et en flavonoïdes totaux d'extrait de notre plante.
- Evaluation de l'activité antiradicalaire d'extrait d'*E.globulus* par le test de DPPH.
- Evaluation de l'activité antibactérienne d'extrait d'*E.globulus* vis-à-vis quatre souches bactériens par le test de diffusion des disques.

Partie I :
Synthèse bibliographique

1. Présentation de la plante étudiée :

1.1. Généralités sur la plante :

La famille des Myrtacées est une famille des plantes dicotylédones qui comprend plus de trois mille espèces réparties en 48 à 134 genres environ. Ce sont des arbres et des arbustes, souvent producteurs d'huiles aromatiques, des zones tempérées, subtropicales à tropicales, poussant principalement en Australie. Les principaux genres de cette famille sont : *Eucalyptus*, *Psidium*, *Myrtus* et *Eugenia* (Govaerts *et al.*, 2008).

Beaucoup d'espèces appartenant à cette famille sont une source d'huiles essentielles pour la parfumerie mais en aromathérapie, nous avons accès à environ 15 variétés différentes. Nous ne pouvons pas traiter tous les chémotypes et avons choisis d'aborder ceux qui nous paraissent le plus pertinents : *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus radié* (*Eucalyptus radiata*), *Eucalyptus citronné* (*Eucalyptus citriodora*), *Eucalyptus mentholé* (*Eucalyptus dives piperitone*) (Bruneton, 1999).

1.2. Synonyme et Nomenclature :

Synonymes : Gommier bleu, Eucalyptus globuleux, Arbre de fièvre, Eucalyptus officinal.

Nomenclature :

- Français: eucalyptus, arbre de la fièvre, gommier bleu ;
- Anglais: blue gum tree ;
- Arabe: Kalitus, Kalatus (Goetz et Ghadira, 2012).

1.3. Description botanique d'*Eucalyptus globulus* :

L'*Eucalyptus* est un très bel arbre de 30 à 35 m, jusqu'à 100 m (Traore *et al.*, 2013). Leur tronc comprend une écorce à la base foncée, rugueuse, en hauteur, lisse, grisâtre et porte des rameaux dressés (Ghedira *et al.*, 2008).

1.3.1: Feuilles

Les *Eucalyptus* portent des feuilles persistantes, glabres mais différentes en fonction de l'âge des rameaux :

- Les jeunes rameaux possèdent des feuilles larges, courtes, bleu-blanc, avec un vrai limbe nervuré (vignette).
- Les rameaux plus âgés possèdent des feuilles aromatiques, épaisses, vert foncé, courtement pétiolées.

1.3.2: Fleurs

Les fleurs sont très variées. Elles ont de couleur blanc crème, solitaires, relativement larges. La base des sépales adhère à l'ovaire infère, le calice et la corolle sont soudés et sa paroi renferme des poches d'essence aromatique.

1.3.3: Fruits

Les fruits à maturité ont la forme d'un cône, ils sont secs, et de couleur brune. Ils ont également des valves qui se soulèvent pour laisser échapper les graines lors de leur chute sur le sol, comme la figure 01 démontre (Ghedira *et al.*, 2008).



Figure 01 : Feuilles, fleurs, fruits et graines d'*E.globulus*.

1.4. La systématique botanique : (Goetz et Ghadira, 2012).

- **Règne** : Plantae
- **Sous-règne** : Tracheobionta
- **Division** : Magnoliophyta
- **Classe** : Dicotylédones
- **Ordre** : Myrtales
- **Famille** : *Myrtaceae*
- **Genre** : *Eucalyptus*
- **Espèce** : *Eucalyptus globulus*

1.5. Origine et répartition géographique :

Le genre *Eucalyptus* est endémique en Australie. Il est cultivé de nos jours dans quelques régions subtropicales d'Afrique, d'Asie (Chine, Inde, Indonésie) et d'Amérique du Sud ainsi qu'en Europe méridionale et aux États-Unis. Les espèces appartenant à ce genre sont utilisées pour assécher certaines zones marécageuses (Amakura *et al.*, 2002).

1.6. Composition chimique d'*E.globulus* :

Les *Eucalyptus* sont des plantes aromatiques et médicinales qui contiennent plusieurs composés biologiquement actifs tels que, les huiles essentielles (Oxydes terpéniques : 1,8-cinéole ; monoterpènes : alpha-pinène, limonène, gamma-terpinène, paracymène ; sesquiterpènes : aromadendrène ; sesquiterpénols : globulol), les flavonoïdes, les acides phénols et les tanins (Amakura *et al.*, 2002).

L'eucalyptol ou le 1,8 cineole (Annexe I) c'est le composé majoritaire avec une concentration de 70 à 85% (Song *et al.*, 2009).

1.7. Effets thérapeutiques d'*E.globulus* :

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) reconnaît l'usage traditionnel des feuilles d'*Eucalyptus*, des polyphénols sont utilisés comme des antioxydantes naturels, des antiseptiques des voies urinaires, analgésiques en usage interne et externe, de plus en plus, l'intérêt des chercheurs dans la prévention et le traitement du cancer, des maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, hypoglycémiantes et antispasmodiques bronchique (Batish *et al.*, 2008). Et pour soulager la fièvre et les symptômes de l'asthme, ainsi que pour traiter l'inflammation des voies respiratoires (Juergens et Dethlefsen, 2003).

Les huiles essentielles (HE) d'*E. globulus* présente des propriétés antirhumatisme, stimulante et tonifiante (Tesche et Metternich, 2008).

2. Stress oxydatif

2.1. Définition :

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre profond de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes de l'organisme (Boyd *et al.*, 2003). Ce déséquilibre provient soit d'une production exagérée d'agents oxydants, soit d'une altération des mécanismes de défense (Morena *et al.*, 2002) comme démontre la figure 02.

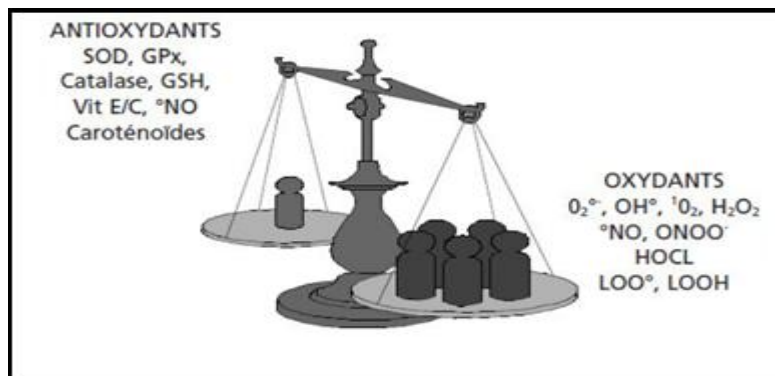


Figure 02 : Définition du stress oxydant.

2.2. Les radicaux libres :

En chimie, un radical libre est un atome ou une molécule dont la structure chimique est caractérisée par la présence d'un électron libre sur leur couche périphérique ce qui le rend extrêmement réactif (Valko *et al.*, 2006). Ce déséquilibre n'est que transitoire et est comblé par l'acceptation d'un autre électron ou par le transfert de cet électron libre sur une autre molécule, comme la figure 03 (Afonso *et al.*, 2007).

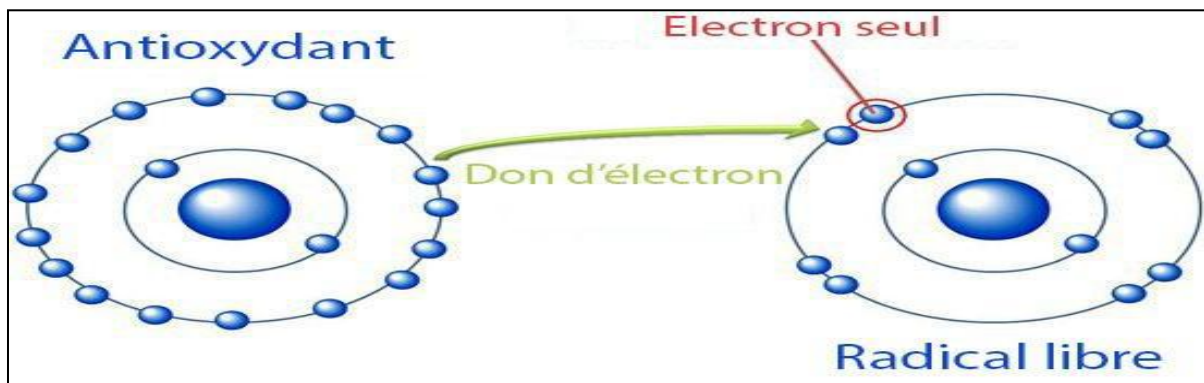


Figure 03 : Neutralisation d'un radical libre par un antioxydant.

2.3. Les sources des radicaux libres :

Les êtres humains sont constamment exposés aux radicaux libres. En effet, les sources de radicaux libres sont variées : la pollution atmosphérique, la cigarette, le rayonnement UV, les radiations ionisantes, les radiations cosmiques, le métabolisme cellulaire (activité mitochondriale, réactions enzymatiques), l'inflammation et les métaux toxiques, comme la Figure 04 montre (Favier, 2006) .



Figure 04 : Sources de production des radicaux libres

2.4. Les cibles des radicaux libres :

La production excessive de radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques (oxydation de l'ADN, des protéines, des lipides, des glucides), mais aussi des lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides (Harris, 2002).

- **Les protéines** : sont des constituants cellulaires structurels, fonctionnels et essentiels qui peuvent subir des modifications oxydatives. L'oxydation des protéines et des acides aminés par les radicaux libres (RL) aboutit à la formation des produits carbonylés et hydroxylés. Dans les conditions physiologiques, les cibles majeurs sont les acide aminés : soufrés, basiques, et aromatiques (Levine, 2002).
- **Les acides nucléiques** : ce sont des cibles majeures des RLs. Des altérations structurales dénaturent l'ADN et entraînent des cassures chromosomiques. Des perturbations sur la multiplication, la transmission ou réplication sont notées (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).
- **Les lipides** : L'attaque des radicaux libres au sein de doubles liaisons lipidiques membranaires aboutit à la désorganisation complète de la membrane, cette désorganisation commence par un défaut de la fluidité ; elle se poursuit par des perturbations de plus en plus marquées qui peuvent aller jusqu'à la lyse complète de la membrane (Lehucher-Michel *et al.*, 2001).

2.5. Les antioxydantes :

Un antioxydant peut être défini comme toute substance capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder ou empêcher l'oxydation de ces substrats (Berger, 2006).

2.5.1. Les Systèmes de défense antioxydantes :

Le maintien d'un niveau non cytotoxique des RLs est assuré par des systèmes d'antioxydantes (Berger, 2006). Les cellules utilisent de nombreuses stratégies antioxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). La nature des systèmes antioxydantes diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques (endogènes) et systèmes non enzymatiques (exogènes) (Goudable et Favier, 1997).

i. Les antioxydants endogènes :

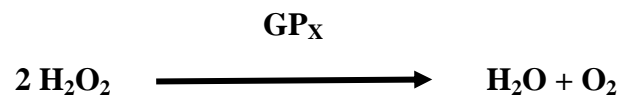
- **Les superoxydes dismutases (SOD)** : sont des métallo-enzymes qui catalysent la dismutation des ions Superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène, composés stables et moins toxiques (Arora *et al.*, 2002).



- **La catalase (CAT)** : Est une enzyme à hème qui réduit le peroxyde d'hydrogène en libérant l'oxygène et l'eau, elle est localisée surtout dans les peroxysomes et les hématies (Arora *et al.*, 2002).



- **La glutathion peroxydase (GP_x)** : Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du H₂O₂ en H₂O et O₂ (Arora *et al.*, 2002).



ii. Les antioxydants exogènes :

Les vitamines :

- **La vitamine A (Les caroténoïdes)** : Est une molécule liposoluble joue un rôle dans l'inactivation de l'oxygène singulet du fait qu'elle permet la désexcitation de l'oxygène. Le β-carotène peut également réagit avec le radical peroxyde et inhiber la peroxydation lipidique (Costantini et Moller, 2008).
- **La vitamine E (Le tocophérol)** : Est une vitamine liposoluble, elle intervienne directement au niveau des membranes biologiques et inhibe ainsi la propagation de la peroxydation et assurer le maintien de l'intégrité et la stabilité membranaire (Khalil, 2002).
- **La vitamine C (acide ascorbique)** : Est une vitamine hydrosoluble, réducteur présente dans les fluides intra et extracellulaires, est un piègeur très efficace des ions superoxyde, du peroxyde d'hydrogène, et de l'oxygène singulet. Elle protège les biomembranes et les lipoprotéines (Chen *et al.*, 2000).

Les oligoéléments :

- **Zinc (Zn)** : Le Zinc est un oligo-élément de numéro atomique 30 et de masse atomique 66,39. Cet oligo-élément est un des cofacteurs essentiels de la SOD. Le

zinc protège les groupements thiols des protéines et il peut inhiber partiellement les réactions de formation d'espèces oxygénées induites par le fer ou le cuivre (Mezzetti *et al.*, 1998).

- **Le sélénium (Se) :** Le sélénium est un oligo-élément de numéro atomique 34 et de masse atomique 78,96. C'est un constituant de la glutathion peroxydase, enzyme qui joue un rôle intracellulaire. Cet effet antioxydant est capital dans la détoxification des radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire (Wolters *et al.*, 2005).

3. Les composés phénoliques

Les polyphénols sont des métabolites secondaires très répandues dans le règne végétal, sont très réactifs comprenant au moins un noyau benzoïque portant un ou plusieurs groupes hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Les composés phénoliques présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs, ils contribuent au développement de la plante (Ballasundram *et al.*, 2007).

3.1. Classification des polyphénols :

Selon la diversité structurale des composés phénoliques, ces métabolites peuvent être repartis en plusieurs classes, parmi ces dernières: les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tannins. Ces classes des composés phénoliques sont les plus rencontrées chez les végétaux (Balasundram *et al.*, 2007).

3.1.1. Les acides phénoliques :

Ce sont des composés possédant une fonction acide en plus de la fonction phénol, représentés par deux groupes essentiels: les acides hydroxybenzoïques et les acides Hydroxycinnamiques (Manach *et al.*, 2004).

3.1.2. Les flavonoïdes :

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols et dont la structure comprend deux noyaux aromatiques et un hétérocycle oxygéné de structure C6-C3-C6 (Figure 05). Ils sont considérés comme pigments quasiment universels des végétaux. Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques (Krishna *et al.*, 2001).

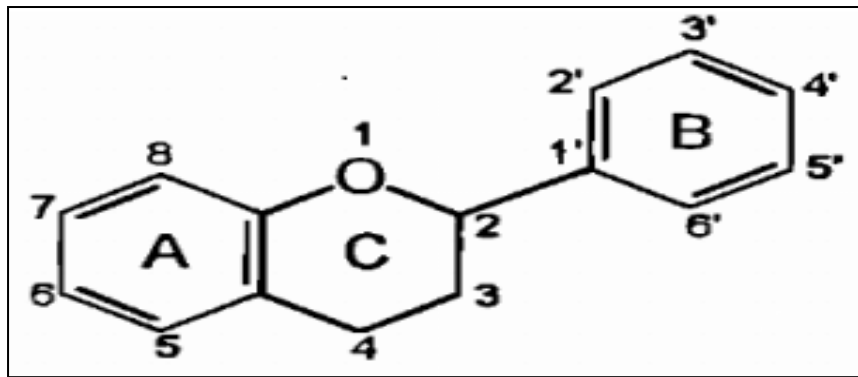


Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes.

La structure de l'hétérocycle ainsi que son degré d'oxydation permettent de distinguer des différentes classes des flavonoïdes (Pietta, 2000).

3.1.3. Les tanins :

Les tanins sont des composés phénoliques à haut degré de polymérisation, de poids moléculaire élevé (500 et 3000 Dalton). La caractéristique la plus déterminante des tanins est leur capacité à former des complexes (par précipitation) avec les polymères naturels comme les protéines et les polysaccharides (Rubenza *et al.*, 2005). En raison de leur structure et de leurs propriétés chimiques, deux classes sont distinguées: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Schaenberg et Hess, 2007).

4. Activité antibactérienne

4.1. Généralité :

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des microorganismes qui vont progressivement coloniser son revêtement cutano-muqueux. Pour résister à ces microorganismes de nombreux moyens sont mis en jeu. On peut schématiquement en distinguer 3 groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle et l'immunité acquise (García-Ruiz *et al.*, 2008).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut entraîner la sélection de souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes (Jürgen *et al.*, 2009).

4.2. Mode d'action des antibiotiques :

L'élimination des microorganismes pathogènes fait appel à des substances dites : antibiotiques. Ces derniers sont synthétisés par des microorganismes. Ils ont la capacité soit de détruire les bactéries (effet bactéricide), ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) (Elghozi, 1992).

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui détruisent les bactéries en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire et membrane plasmique), inhibition de la synthèse protéique et l'acide nucléique, inhibition de certaines voies métaboliques des bactéries et par conséquent perturbant leurs fonctions (Tenover, 2006).

4.3. Description des bactéries étudiées :

4.3.1. Bactéries à Gram positif

***Staphylococcus aureus* :**

Sont des cocci à Gram positif. Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré (Patrick et al., 1988).

***Bacillus subtilis* :**

C'est une bactérie résistante, présente dans les sols. Elle contamine les aliments et une fois ingéré, *Bacillus subtilis* peut être à l'origine d'une intoxication alimentaire (Guiraud, 2003).

4.3.2. Bactéries à Gram négatif

***Escherichia coli* :**

C'est un bacille à Gram négatif de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles.

Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales (Patrick et al., 1988).

***Pseudomonas aeruginosa* :**

C'est l'exemple-type des bactéries pathogènes opportunistes, la contamination terminale par *Pseudomonas* est classiquement rapportée dans la littérature, touchant la robinetterie et les canalisations d'alimentation mais peu les collecteurs. La bactérie pénètre dans l'installation très souvent par des phénomènes de rétro contamination: mains, projection d'eau, siphons, elle colonise le réseau quand elle trouve un terrain favorable à son développement: température, oxygène, nutriments, support (Patrick et al., 1988).

4.4. Activité antibactériennes des polyphénols :

Plusieurs études ont été focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des polyphénols. Les études du pouvoir inhibiteur des flavonoïdes sur la croissance bactérienne

ont démontré que de nombreux composés flavoniques sont doués d'un effet important sur différentes souches bactériennes à Gram négatif et Gram positif (Ulanowska et *al.*, 2007).

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Tim et Andrew, 2005).

Partie II :
Matériel et méthodes

II.1. Matériel végétal :

La plante " *Eucalyptus globulus* " a été récoltées la fin d'Avril et le début de Mai dans la région de Ras- El- Oued à Sétif la figure 06. Les feuilles de la plante ont été nettoyée, séché à l'obscurité dans un endroit bien aéré, puis les broyée et stockée à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.



Figure 06 : Localisation géographique du site de l'échantillonnage d'*E.globulus*. Région de Ras-El-Oued (Sétif). (Google Map2019).

II.2. Préparation de l'extrait :

L'extraction est effectuée par épuisement du matériel végétal. 50g de la poudre des feuilles d'*Eucalyptus globulus* sont macérés dans 500 ml d'eau distillée. Le mélange est maintenu sous l'agitation et la décoction pendant 10 min à T° 100 C°. La solution obtenue a été filtrée à travers un filet de nylon puis papier de wattman, versé dans des boîtes à verre, puis les séchés dans l'étuve à T° 37 C° jusqu'au séchage, pour l'obtention d'un extrait qui sera stockée à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation (Annexe II). (Fellah *et al.*, 2008). Le rendement est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de la plante sèche à partir de la formule suivante :

$$\text{Rdt\%} = \frac{M \text{ extrait}}{M_0 \text{ échantillon}} \times 100$$

Le Rdt% : Le rendement d'extraction.

M extrait : Masse de l'extrait sec résultant en gramme.

M₀ échantillon : Masse de matériel végétal à traiter en gramme.

II.3. Dosage des polyphénols totaux :

Principe :

La méthode est fondée sur l'oxydation des composés phénoliques par le réactif Folin-Ciocalteu, qui est un mélange de complexes d'acide phosphotungstique et l'acide phosphomolybdique de couleur jaune. Cette oxydation entraîne la formation d'un nouveau complexe molybdène-tungstène de couleur bleu qui absorbe à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents (Hadouchi *et al.*, 2016).

Mode opératoire :

100 μ l de l'extrait est mélangé avec 500 μ l du réactif de Folin-Ciocalteu (10%), après 04 min, 400 μ l de carbonate de sodium (7,5%) est ajouté, l'ensemble est incubé à température de laboratoire pendant 1h 30 min puis la lecture est faite à 765 nm . la concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique (la figure 07) et elle est exprimée en μ g d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait (μ g EAG/mg d'extrait) (Hadouchi *et al.*, 2016).

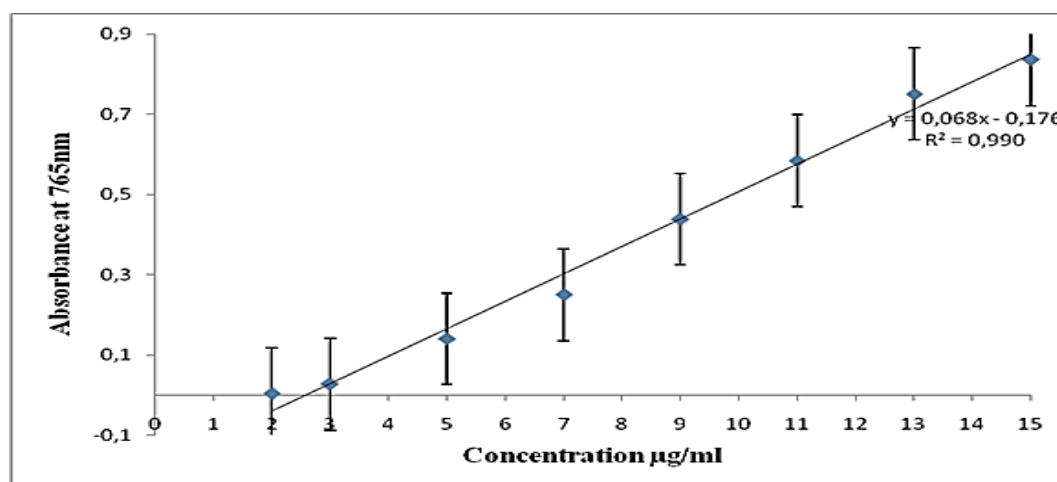


Figure 07 : Courbe standard de l'acide gallique pour la détermination des polyphénols totaux. (Moyenne \pm SD).

II.4. Dosage des flavonoïdes totaux :

Principe :

Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres en présence de chlorure d'aluminium, grâce aux groupements hydroxyles libres. Ainsi la couleur jaune obtenue est proportionnelle à la quantité des flavonoïdes dans l'extrait (Ribereau-Gayon, 1968).

Mode opératoire :

1ml de trichlorure d'aluminium (AlCl₃ 2%) est ajouté à 1ml de l'échantillon contenant différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min à température ambiante et à l'abri de la lumière. La lecture est faite à 430 nm. la concentration des flavonoïdes totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (la figure 08) et elle est exprimée en µg d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) (Bahorun et *al.*, 1996).

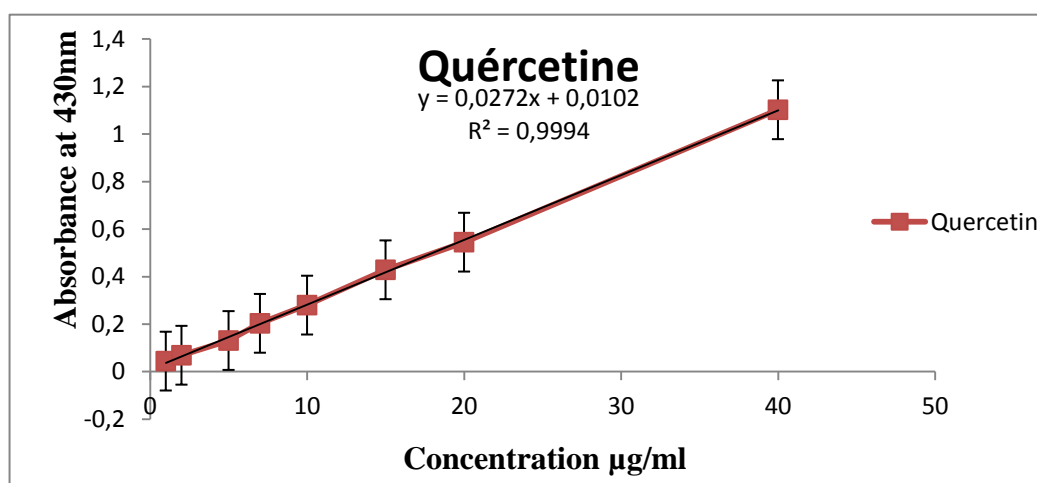
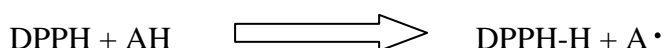


Figure 08 : Courbe standard de la quercétine pour la détermination des flavonoïdes totaux. (Moyenne ± SD de trois mesures).

II.5. Activités biologiques :**5.1. L'activité antioxydante :****5.1.1. Estimation du pouvoir antiradicalaire par la méthode du DPPH :****Principe :**

Le test au 2,2-diphényl-2-picryl-hydrazyle (DPPH), permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul de l'IC₅₀ des substances antioxydants contenues dans un extrait. Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur de proton H⁺.



Où AH est un composé capable de céder un H⁺ au radical DPPH. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaire (Molyneux, 2004).

Mode opératoire :

Le protocole expérimental utilisé est celui de (Brand-williams et *al.*, 1995). Avec quelques modifications. La solution de DPPH est préparée par solubilisation de 4mg de DPPH dans 100 ml de méthanol.

Le contrôle négatif est réalisé en remplaçant l'échantillon par le méthanol et les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH, ce pourcentage est calculé selon la formule suivante.

Où:

$$\text{Activité anti-radicalaire (\%)} = (A_0 - A / A_0) \times 100$$

A₀ : Absorbance de la solution du DPPH• sans l'échantillon (contrôle négatif) ;

A : Absorbance de la solution du DPPH• en présence de l'échantillon.

Les pourcentages du DPPH résiduels en fonction des concentrations des échantillons, nous permettent d'obtenir la quantité d'antioxydant requise pour diminuer la concentration du DPPH initiale de 50%. Cette valeur est appelée concentration inhibitrice IC₅₀.

5.2. L'activité antibactérienne :**5.2.1. Origine et choix des souches microbiennes :**

Les bactéries étudiées ont été choisies pour leurs fréquences élevées à contaminer les denrées alimentaires et pour leur pathogénicité. Elles nous ont été fournies par le laboratoire pédagogique de microbiologie de notre département. Elles sont entretenues par repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24 h à 37°C. 2 Bactéries à Gram⁺ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et 2 Bactéries à Gram⁻ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ont été testées (tableau 01).

Bactéries	Gram	Code	Provenance
- <i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	Laboratoire de microbiologie - université de M'sila
- <i>Bacillus subtilis</i>	Positif	ATCC 6633	
- <i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 8739	
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	

Tableau 01 : Bactéries utilisées pour les tests antibactériens.

5.2.2. Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture pure des bactéries sur milieu d'isolement (gélose nutritive) ayant au maximum 24h, on racle à l'aide d'une pipette pasteur scellée quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

Ensuite, on décharge la pipette pasteur dans 10 ml d'eau physiologique stérile et on homogénéise la suspension bactérienne; son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Ferland qui correspond à 10^8 UFC/ml, puis diluer pour obtenir un inoculum à 10^6 UFC/ml (Tyagi et Malik, 2011).

5.2.3. Méthode de diffusion sur gélose :

Afin de tester l'activité antimicrobienne de l'extrait d'*Eucalyptus globulus*, nous avons utilisé la méthode de l'antibiogramme par diffusion à partir de disques imprégnés de l'extrait (50 mg/ml, 75mg/ml, 100mg/ml) et un disque contient le DMSO comme témoin déposé au centre de chaque boîte. Les milieux coulés en boîte de Pétri sontensemencés par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne de 10^6 UFC/ml. Un volume correspondant à 10 μ L de l'extrait est déposé sur des disques de papier Wattman stériles de 6 mm de diamètre. En parallèle, des témoins sont utilisés afin de vérifier la croissance des différentes souches, cette opération est répétée 3 fois. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C/24 h. L'activité antibactérienne est appréciée par la mesure, à l'aide d'une règle, des diamètres des zones claires (mm) qui se forment autour des disques (Raho *et al.*, 2008).

5.2.4. L'antibiogramme :

Pour détecter la sensibilité des souches bactériennes utilisées dans notre expérience, nous avons testé 03 antibiotiques synthétiques qui sont : Gentamicine, Ampicilline, l'Oxacilline et avec un témoin qu'il est le DMSO, par la méthode de diffusion sur la gélose (tableau 02).

Antibiotique	Code	Charge
Gentamicine	GEN	500 μ g
Ampicilline	AM	10 μ g
Oxacilline	OX	1 ou 5 μ g

Tableau 02 : Les antibiotiques testés sur les bactéries étudiées.

5.2.5. Traitement statistique :

Pour chaque test ou méthode, les moyennes et les écarts type des essais ainsi que les représentations graphiques ont été réalisées par le logiciel Excel 2007.

Partie III :
Résultats et discussion

III.1. Rendement de l'extrait d'*Eucalyptus globulus* :

Le rendement de l'extrait aqueux (EAQ) d'*E.globulus* a été calculé en fonction de la matière végétale de la partie aérienne (feuille), l'extraction se fait par l'eau, cette opération a permis d'obtenir un extrait aqueux, l'observation des résultats démontre dans le tableau 03.

Extrait	Aspect	Couleur	Rendement %
EAQ	Poudre	Marron foncée	8,639

Tableau03 : Aspect, couleur et rendement d'extrait d'*Eucalyptus globulus*.

La préparation de l'extrait de la partie aérienne d'*Eucalyptus globulus* a été effectuée par l'eau qu'il est un solvant polaire. Su et ses collaborateurs (2006) ont rapporté que le rendement des extractions aqueuses augmente avec la température. Cela est expliqué par le fait que l'eau à haute température provoque la perturbation des cellules facilitant la pénétration du solvant et la solubilisation des molécules (Albano et Miguel, 2010). La chaleur peut, cependant, conduire à la dégradation des molécules thermolabiles (Seidel, 2005), c'est la raison pour laquelle, la décoction a été effectuée pendant un temps réduit.

Le rendement de cette extraction est exprimé en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de plante sèche, il est de valeur (8,639%) dans notre travail. Nos résultats sont supérieurs à ceux de Raho *et al.* (2012) qui est de 1,2%, et de Pal singh *et al.* (2012) qui est de 1,8% pour les feuilles fraîches. De nombreux auteurs ont remarqué que les plantes sèches donnent un meilleur rendement que les plantes fraîches. Zrira *et al.* (1994) ont rapporté que les feuilles d'*E.globulus* donnaient un meilleur rendement à l'état sec (4,29%) que frais (3,91%). Donc il y'a une relation entre le rendement et l'état de fraîcheur de la plante utilisée pour l'extraction. Cette différence de rendement entre les mêmes espèces peut être attribuée à des nombreux facteurs tels que : le stade de croissance, conditions pédoclimatiques et édaphiques de la région, technique d'extraction, etc..... (Ben Ammar *et al.*, 2007).

III.2. Dosage des polyphénols totaux :

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm.

La quantité des polyphénols a été rapportée en microgramme d'équivalent de l'acide gallique par milligramme de poids sec de l'extrait (μg EAG/mg Ps). Les résultats sont présentés dans le tableau 04 :

Extrait	[C] des polyphénols ($\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$)
EAQ	$280,6372 \pm 0,1117$

Tableau 04 : Teneur en polyphénols totaux d'extrait d'*Eucalyptus globulus*.

III.3. Dosage des flavonoïdes totaux :

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), la quercétine a été utilisée comme standard. L'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 430 nm.

La quantité des flavonoïdes a été rapportée en microgramme d'équivalent de la quercétine par milligramme de poids sec de l'extrait ($\mu\text{g EQ/mg Ps}$). Les résultats sont présentés dans le tableau 05 :

Extrait	[C] des flavonoïdes ($\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$)
EAQ	$37,2839 \pm 0,1981$

Tableau 05 : Teneur en flavonoïdes totaux d'extrait d'*Eucalyptus globulus*.

L'objectif de l'étude quantitative de l'extrait aqueux d'*E.globulus* est la détermination de la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes totaux. Le choix de doser cette famille de substances chimiques bioactives est justifié par leurs effets antioxydants et antimicrobiens (Li *et al.*, 2003).

La teneur en polyphénols totaux de l'extrait d'*E.globulus* est déterminée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Nos résultats révèlent que l'extrait aqueux est riche en polyphénols avec un taux de ($280,6372 \pm 0,1117 \mu\text{g EAG/mg Ps}$). Zin *et al.* (2006) ont rapporté que les polyphénols sont présents dans les différentes parties de la plante étudiée mais avec des teneurs variables d'une partie à une autre, La teneur est notée pour les feuilles ($432,63 \pm 4,59 \mu\text{g EAG/mg Ps}$). Dans notre étude, le taux d'extraction des feuilles est presque la moitié de celles de l'autre étude. Cela peut s'expliquer par le solvant qu'il est l'un des paramètres qui peut affecter l'extraction des polyphénols (Troszyńska *et al.*, 2002). Des études écrites par Spignon *et al.*, (2007). Montre que les solvants aqueux donnent les meilleurs rendements d'extraction que les solvants absolus. Le système acétone-eau 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'eau (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). Et aussi comprend une étape supplémentaire concernant la méthode d'extraction qu'il est la délipidation. Il consiste à utiliser un solvant apolaire afin d'éliminer les cires, les lipides...etc.

Cette différence peut être aussi expliquée par les facteurs génétiques des plantes ainsi qu'à l'origine géographique, aux conditions climatiques et à la durée de stockage, de la récolte et aussi aux méthodes d'extraction appliquées, la masse de la poudre et le temps de contact avec le solvant (Falleh *et al.*, 2008).

D'après les résultats obtenus, les flavonoïdes sont présents dans la partie aérienne de la plante de manière significative comme pour le dosage des polyphénols totaux, les feuilles dévoilent une teneur de $(37,2839 \pm 0,1981 \mu\text{g EQ/mg Ps})$. Nos résultats sont supérieurs à ceux obtenus par (Chira *et al.*, 2008; Pietta, 2000). Qui ont rapporté que l'extrait des feuilles possède une teneur faible $(1,16 \pm 0,03 \text{ mg EQ/ g EB})$ qui correspond à un taux de 31 % de flavonoïdes totaux. Cette grande différence pourrait s'expliquer par la région dans laquelle la plante est cultivée, la méthode de dosage, la sensibilité et la pureté des réactifs utilisés ainsi que la période de récolte (Zrira *et al.*, 1994).

III.4. Activité biologique d'extrait :

4.1. Activité antiradicalaire par la méthode de réduction de radical libre DPPH :

L'activité antioxydante de l'extrait a été évaluée *in vitro* par la méthode de réduction de radical libre DPPH. La présence des pièges à radicaux libres permet de réduire le DPPH de couleur violette en DPPHH de couleur jaune.

- **Détermination d'IC₅₀ :**

L'IC₅₀ de BHT et de l'extrait aqueux est déterminée à partir de la partie linéaire de la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration.

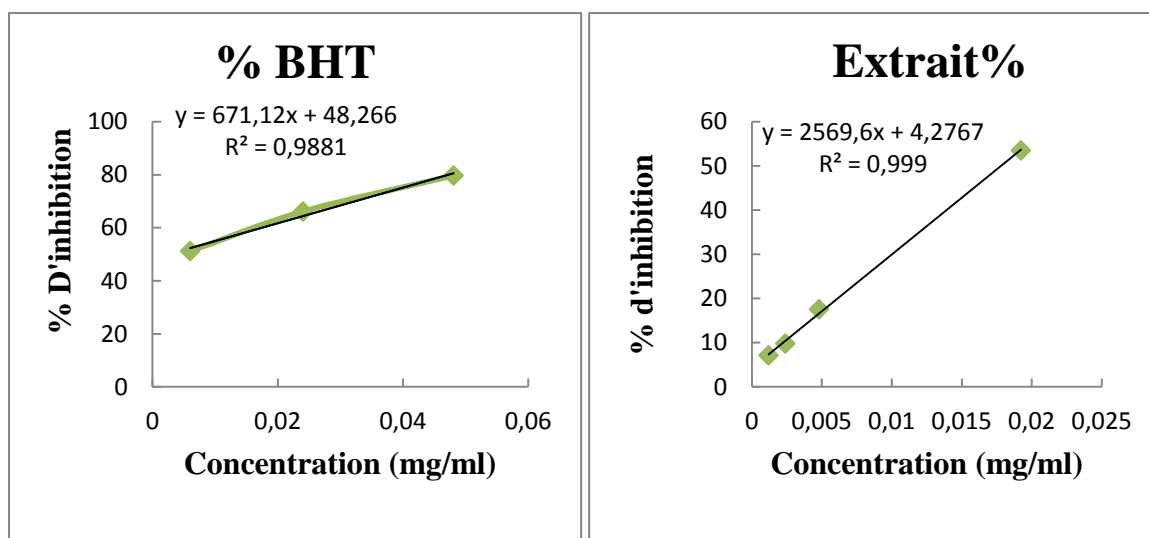


Figure 09 : les pourcentages d'inhibition de DPPH en fonction de différentes concentrations du BHT et l'extrait aqueux.

Extrait	BHT	EAQ
IC ₅₀ (mg/ml)	0,0057 ± 0,0012	0.0189 ± 0,0015

Tableau 06 : Valeurs d'IC₅₀ d'extrait aqueux et de BHT.

L'activité antiradicalaire de l'extrait a été évaluée par le test du DPPH, celui-ci est souvent utilisé pour la rapidité des résultats comme il est employé pour le criblage des molécules douées d'activités antioxydantes présentes dans les extraits des végétaux (Yi *et al.*, 2008).

Les résultats de l'action antiradicalaire de l'extrait d'*E.globulus* montrent une IC₅₀ (feuilles) de l'ordre de (0,0189 ± 0,0015 mg/ml). Nos extrait est moins actif que le BHT (0,0057 ± 0,0012 mg/ml). Ces résultats suggèrent que l'extrait d'*E.globulus* contient des agents piègeurs de radicaux libres agissant comme antioxydants primaires. L'action de ces antioxydants est supposée être due à leur capacité de donation d'atomes d'hydrogène ou d'électrons dérivée principalement de l'hydroxyle du cycle A des flavonoïdes (Le *et al.*, 2007). Mishra *et al.* (2010) ont précédemment montré que l'extrait d'*E.globulus* à une IC₅₀ de (0.057mg /mL). Et celles de Pal Singh *et al.* (2012) qui est de (0.136mg/mL) pour les feuilles. les résultats du pouvoir antioxydant peuvent influencée non seulement par la composition chimique, mais également par les conditions de l'essai (température de réaction, rapport antioxydante/DPPH, type de solvant, pH, concentration en échantillon) (Popovici *et al.*, 2009 ; Noipa *et al.*, 2011 et Costa *et al.*, 2012).

Des études concernant le test DPPH montrent que l'extrait contiennent des molécules antioxydantes qui ont la capacité de céder l'hydrogène et par conséquent réduisant et

décolorant le DPPH, c'est un phénomène de transfert de (s) électron (s) célibataire (s) qui sont localisé dans l'orbitale externe du DPPH; l'antioxydant va réagir complètement avec le radical, et quand nous augmentons la concentration, l'activité antioxydante reste constante à cause de la saturation des couches électroniques du radical.

Les mécanismes biologiques des composés polyphénoliques ont été attribués à leurs propriétés antioxydantes grâce à plusieurs mécanismes possibles, telles que leur capacité à piéger les radicaux libres, briser les réactions radicalaires en chaîne, en réduisant directement les peroxydes, et de stimuler les activités enzymatiques de la défense antioxydantes (Ghedadba *et al.*, 2014).

A la différence du BHT (un radical pure), l'extrait n'est pas formé d'une seule molécule mais de plusieurs dizaines de composés à des concentrations variables. Une forte activité antioxydant est indiquée par une faible valeur d'IC50. Cette activité est déterminée par une diminution de l'absorbance produite par les substances antiradicalaire. (Talbi *et al.*, 2015).

4.2. L'activité antibactérienne:

4.2.1. Test antibactérienne :

L'activité antibactérienne d'extrait d'*Eucalyptus globulus* est testée vis-à-vis de quatres souches bactériennes par la méthode de diffusion des disques. Les résultats sont présentés dans la figure 10 et le tableau 07 suivants :



Figure 10 : Les zones d'inhibition de la croissance des quatre bactéries utilisées induites par l'extrait d'*Eucalyptus globulus*.

[C] (mg/ml) d'extrait	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
	50(mg/ml)	75(mg/ml)	100(mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	20,5	23
<i>Bacillus subtilis</i>	16,5	19,5	21,5
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0

Tableau 07 : Diamètres des zones d'inhibition de la croissance bactérienne induites par l'extrait aqueux d'*Eucalyptus globulus*.

L'activité antibactérienne de l'extrait d'*E.globulus* a été évaluée vis-vis de quatre souches bactériennes de référence, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode de diffusion des disques. La détermination des diamètres de la zone d'inhibition est faite autour des disques contenant l'extrait testée à différentes concentrations : 50, 75 et 100 mg/ml.

Nos résultats montrent que l'extrait est actif sur deux souches étudiées à Gram⁺ avec un diamètre d'inhibition variant entre (19 à 23 mm) pour le *Staphylococcus aureus*, (16,5 à 21,5mm) pour le *Bacillus subtilis*, il y'a donc une relation dose-effet. Cependant aucun effet sur les autres souches à Gram⁻.

Les interprétations sont faites en se référant à l'échelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne donnée par Ponce et *al.*, (2003) (Annexe III). A partir de cette échelle on peut classer les bactéries de la plus sensible à la plus résistante comme suivant: *S. aureus* > *B. subtilis* > *E. coli* = *P. aeruginosa*.

Ces résultats, s'accordent avec ceux de Raho et benali, (2008) sur la sensibilité de *S. aureus* et la résistance de *P. aeruginosa vis à vis* de l'extrait des feuilles d'*E.globulus*. Ces auteurs ont expliqué la résistance de *P. aeruginosa* par sa forte capacité de métaboliser un large spectre de composés organiques, ce qui favorise leur utilisation dans la bioremediation. *P. aeruginosa* est connu pour sa forte résistance intrinsèque contre de nombreux antibiotiques due à la restriction de sa membrane extérieure même pour les produits synthétiques (Elaissi et *al.*, 2011).

La méthode de diffusion des disques a révélé que l'effet antibactérien d'extraits de la plante médicinale d'*E.globulus* diffère d'une souche à une autre. Les bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa* sont avérées les plus résistantes alors que *S. aureus* et *B. subtilis* sont les plus

sensibles. 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 est liée à la présence d'une enveloppe qui comprend une membrane cellulaire riche en lipopolysaccharides et d'une paroi solide qui limite l'accès des agents antimicrobiens à leur cible dans les cellules bactériennes, car les agents antimicrobiens sont en contact avec l'enveloppe cellulaire. Contrairement aux bactéries Gram positif qui sont non protégées contre les agents externes. (Oumaskour *et al.*, 2012).

4.2.2. L'antibiogramme :

Afin de vérifier la résistance des souches bactériennes utilisées dans notre expérience, nous avons testé 03 antibiotiques synthétiques avec le DMSO dans les mêmes conditions que l'extrait. Les résultats des zones d'inhibition sont présentés dans la figure 11 et le tableau 08.

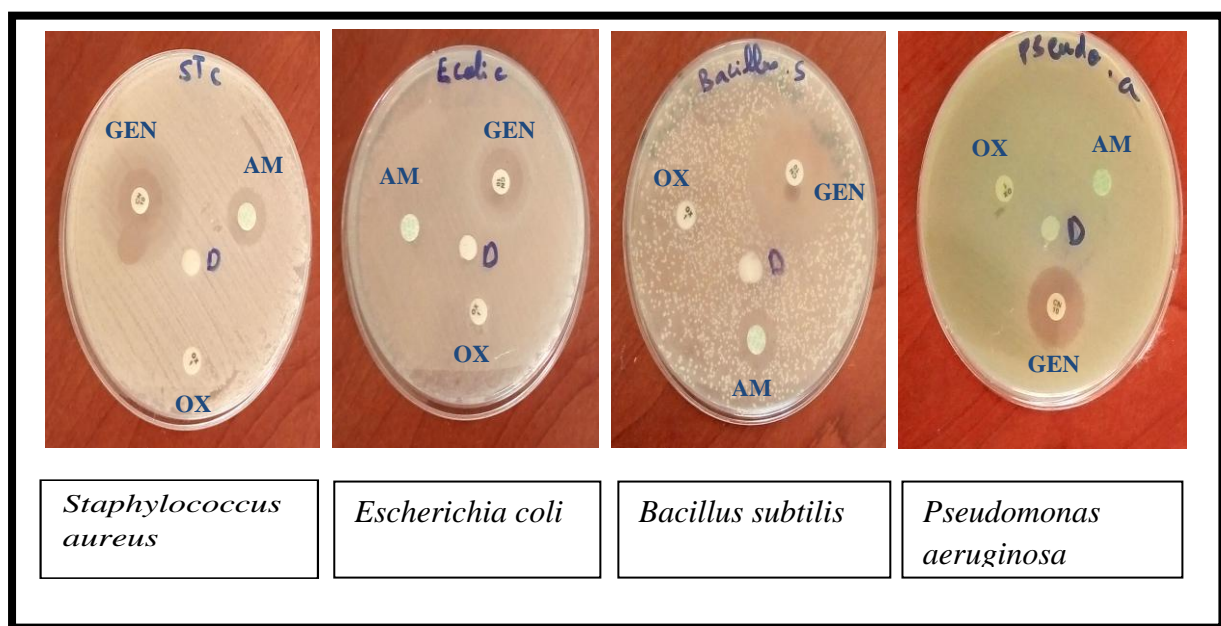


Figure 11 : L'antibiogramme des quatre souches utilisées.

Antibiotiques souches	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	Contrôle négative (DMSO)	Gentamicine (GEN)	Oxacilline (OX)	Ampicilline (AM)
<i>S.aureurs</i>	0	16	0	14
<i>Bacillus Subtilis</i>	0	22	0	14
<i>E.Coli</i>	0	16	0	0
<i>Pseudomonas.a</i>	0	19	0	0

Tableau 08 : Diamètres des zones d'inhibition de l'antibiogramme des quatre souches utilisées.

L'analyse comparative des effets de l'extrait et des antibiotiques a révélé la:

- Résistance des quatre souches à l'oxacilline, et d'*E. Coli* et *pseudomonas.a* vis à vis de l'ampicilline.
- Sensibilité des bactéries étudiées à la gentamicine avec des diamètres des zones d'inhibition entre 16 et 22mm.
- Différence significative entre l'effet de l'extrait et les antibiotiques sur la même souche bactérienne.
- Similarité de l'action antibactérienne de la gentamicine et de l'extrait des feuilles sur *B. subtilis* entre 19 et 22mm.
- Sensibilité de *B. subtilis* et *S.aureurs* vis-à-vis de l'extrait des feuilles et de l'ampicilline, ce qui peut s'expliquer par le fait que l'extrait des feuilles ont le même mode d'action que l'ampicilline sur les bactéries Gram⁺.

D'autre étude par (Rather et *al.*, 2012) a montré qu'une Sensibilité similaire à la gentamycine pour *P. aerugenosa* et *E. coli* ceci pourrait être du au même mode d'action de la gentamycine sur les bactéries Gram⁻. La variation de l'activité antimicrobienne des agents antibactériens pourrait s'expliquer par des différences structurelles entre les bactéries.

Le DMSO est utilisé pour la dissolution de l'extrait, il été testé comme solvant, les résultats montrent que le solvant est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes.

En vue des résultats obtenus pour l'antibiogramme et tenant compte des concentrations des disques d'antibiotiques, le pouvoir inhibiteur d'*E.globulus* sur *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* est très satisfaisant en comparaison à la gentamicine ce qui est très encourageant pour développer des préparations médicamenteuses à base d'*E.globulus*.

Cela est interprété par le fait que les plantes produisent une variété énorme de petites molécules antibiotiques ayant un large spectre de structures telles que les flavonoïdes et les polyphénols. Cependant, la plupart de ces petites molécules ont une faible activité antibiotique par rapport aux antibiotiques communs produits par les bactéries.

Conclusion et Perspectives

L'évaluation des plantes médicinales pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement en Algérie. Ceci montre que les molécules isolées à partir des plantes médicinales sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances.

L'objectif primordial assigné par cette étude et d'évaluer les propriétés antioxydantes et antimicrobiens du plante *E.globulus* utilisée dans la pharmacopée traditionnelle pour traitement de plusieurs maladies.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait a présenté un bon rendement 8,639 %.

L'évaluation du contenu des phénols totaux en adoptant la méthode de Folin- Ciocalteu révèle la présence des quantités intéressantes en polyphénols $280,6372 \pm 0,1117$ μg EAG/mg Ps. De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' AlCl_3 qui nous mène à conclure que cette plante est riche en flavonoïdes $37,2839 \pm 0,1981$ μg EQ/mg d'extrait.

L'évaluation de potentiel antiradicalaire de l'extrait par le test au DPPH a montré que les composés phénoliques de la plante étudiée étaient doués d'activité antioxydante. Le test DPPH d'*E.globulus* a présenté une activité élevé avec une IC_{50} de $0,0189 \pm 0,0015$ mg/ml.

D'après ces résultats, on peut déduire qu'*E.globulus* présente une activité antioxydante efficace.

L'activité antimicrobienne a été déterminée sur quatre souches bactériennes, selon la méthode de diffusion des disques, Les résultats indiquent que l'extrait possède une activité antimicrobienne sur les souches testées à Gram positif tandis que les souches à Gram négatif manifestent une résistance. Cet effet antimicrobien, évalué par une zone d'inhibition, dans certains cas, est révélé supérieure à celui des antibiotiques commerciaux (AM et OX). La plante *E.globulus* peut donc être exploitée dans le domaine pharmaceutique comme un antibiotique naturel.

À la suite de ces résultats, il serait donc intéressant d'étendre l'éventail des tests antioxydantes et antimicrobiens ainsi que l'isolement et la caractérisation des composés actifs dans l'extrait en vue d'identifier les différentes molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante.

L'ensemble de ces résultats obtenus in vitro ne constitue qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement active, une étude in vivo est souhaitable, pour obtenir une vue plus approfondie sur les activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'extraits de cette plante.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

Afonson, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collan, P., Lomri, A., (2007). Radicaux libres dérivés de l'oxygène et superoxyde dismutases : rôle dans les maladies rhumatismales. *Revue du rhumatisme*, 74(7) : 636-643p.

Albano, S., Miguel, M., (2010). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, 1-6p.

Amakura, Y., Umino, Y., Tsuji, S., (2002). Constituents and their antioxydative effects in eucalyptus leaf extract used as a natural food additive. *original research article food chemistry*, 77(1) : 47-56p.

Arias, E., Gomez, D., Cudmani, N., Vattuone, A., Isla, I., (2004). Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. *Life Sciences*, 75: 191–202p.

Arora, A., Sairam, R., Srivastava, G., (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82 :1227-1238p.

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

Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Pinkas, M., (1996). Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from haw torn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *ArzneimForsch /Drug Research*, 46(11) : 1086-1089p.

Ballasundram, N., Sundram, K., Samman, S., (2007). Phenolic compound in plants and agricol-industrial by products: antioxidants activity, occurrence and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203p.

Batish, D., Pal Singh, H., Kumar Kohli, A., Shalinder, S., (2008). Huile essentielle d'eucalyptus en tant que pesticide naturel. *Écologie et gestion des forêts*, 256(12) : 2166–2174p.

Ben Ammar, R., Kilani, S., Bouhlel, I., Skandarani, I., Mahmoud, A., (2007). Antibacterial and cytotoxic activities of extracts from (Tunisian) *Rhamnus alaternus*. *Annals of Microbiology*, 57(3) : 453-460p.

Berger, M., (2006). Manipulations nutritionnelles du stress oxydant : état des connaissances. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 20: 48-53p.

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

- Boyd, B., Ford, C., Koepke, M., Gary, K., Horn, E., (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience et Nutrition*, 4(6) :70-77p.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie*, 28: 25-30p.
- Bruneton, J., (1999). *Pharmacognosie « Phytochimie Plantes » médicinales* .3^{ème} éd. Paris, Tec et Doc, 540p.
- Chen, k., Suh, J., Carr, A., Morrow, J., Zeind, J., (2000). Vitamin C suppresses oxidative lipid damage in vivo, even in the presence of iron overload. *American Journal Physiology Endocrinology Metabolism*, 279(6) : 1406-1412p.
- Chira, K., Suh, H., Teissède, L., (2008). Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie*, 6 :75-82p.
- Costa, P., Goncalves, S., Valentao, P., Andrade, B., Anabela, R., (2012). *Thymus lotocephalus* wild plants and in vitro culture produce different profoles of phenolic compound with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 135 : 1253-1260p.
- Costantini, D., Moller, A., (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology*, 22 (2) :367-370p.
- Daker, M., Abdullah, N., Vikineswary, S., Goh, P., Kuppusamy, U., (2008). Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabilizer of lipidrich foods. *Food Chemistry*, 107: 1092-1098p.
- Dastmalchi, K., Damien Dorman, H., Oinonen, P., Darwisj, Y., (2008). Chemical composition and *in vitro* antioxidative activity of lemon balm. *Food science and technology*, 41: 391-400p.
- De Billerbeck, G., (2007). Huiles essentielles et bactéries résistantes aux antibiotiques. *Phytothérapie*, 5: 249–253p.
- Elaissi, A., Hadj Salah, K., Mabrouk, S., Larbi, M., Chemli, R., Harzallah-Skhiri, F., (2011). Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species essential oils. *Food Chemistry*, 129 :1427–1434p.
- Elghozi, D., (1992). *Médecine Flammarion*. 2^{ème} Ed. Paris , Duval, 289p.
- Favier, A., (2006). Stress Oxydant et pathologies humaines. *Annals of Pharmacotherapy SAGE Journal* , 64 : 390-396p.

- Fellah, H., Ksouri, K., Chaieb, K., Karray, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., (2008). Phenolic composition of E, Globulus. Organs, and their biological activities. *Compte rendu de biologie*, 331 : 372-379p.
- Fisher, K., Philip, C., (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. *Trends in Food Science & Technology* , 19 :156-164p.
- Garcia-Ruiz, A., Bartolomé, B., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., (2008). Potential of phenolic compound for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19: 835-841p.
- Ghedadba, N., Bousselsla, H., Hambaba, L., Mouloud, Y., (2014). Evaluation de l'activité antioxydant et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubium vulgare L.* *Phytothérapie*, 12(1) :15-24p.
- Ghedira, K., Goetz, P., Jeune, R., (2008). *Eucalyptus Globulus Labill.* *Phytothérapie* , 6: 197-200p. DOI:10.1007/s10298-008-0315-1.
- Goetz, p., Ghedira, k., (2012). *Phytothérapie anti-infectieuse*. Ed. france , springer verlag, 382p.
- Goudable, J., Favier, A., (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme*, 11: 115-200p.
- Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B., Landrum, L., Matsumoto, K., Mazine, F., Lughadha, E., Proneça, C., (2008). *Liste de contrôle mondiale des myrtacées*. Ed. Richmond, Royal Botanic Gardens, 455p.
- Guiraud, J., (2003). Micro-organismes intervenant dans l'industrie alimentaire. In : *Microbiologie Alimentaire*. Edition. Paris : Dunod. 79-95p.
- Gutiérrez, M., Garcia, A., Sagrista, M., Casado, F., 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: 2337-2360p.
- Hadouchi, F., Gaouche, T., Halla, N., (2016). Screening phytochimique, activités antioxydantes et pouvoir hémolytique de quatre plantes sahariennes d'Algérie. *Phytothérapie*, 1-9p.
- Harris, A., (2002). Hypoxia a key regulatory factor in tumor growth. *Nature Reviews Cancer*, 2(1) : 38-47p.
- Juergens, U., Dethlefsen, U., (2003). Activité anti-inflammatoire du 1,8-cinéol (eucalyptol) dans l'asthme bronchique: essai à double insu contrôlé par placebo. *Médecine respiratoire*, 97: 250- 256p. DOI: 10.1053 / rmed.2003.1432.

Jürgen, R., Paul, S., Ulrike, S., Reinhard, S., (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties— an Overview: 3. *Forsch Komplementmed*, 16: 79-90p.

Khalil, A., (2002). Molecular mechanisms of the protective effect of vitamine against Atherosclerosis. *Canada Journal of Physiology and Pharmacology*, 80(7) :662-669p.

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

Krishna, D., Chaluvadi, M., Raj, N., Sripal, R., (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33 :2-16p.

Lee, B., Lee, S., Lee, H., Sim, G., Kim, J., Cho, Y., and Hong, J., (2007). Anti-oxidative and Photo-protective Effects of Coumarins Isolated from *Fraxinus chinensis*. *Arch Pharm Res*, 30 : 1293-1301p.

Lehucher-Michel, M.P., Lesgards, J.F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M., (2001). Stress oxydant et pathologies humaines. *La Presse médicale*, 30: 1076-1081p.

Levine, R., (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation; aging and disease. *Free radical Biology and Medicine*, 32 :790-796p.

Li, B., Cheng, W., Wong, W., Jiand, Y., (2003). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*, 102 :771-776p.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., (2004). Polyphénols: Food sources and bioavaibility. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79 : 727-747p.

Mezzetti, A., Pierdomenico, SD., Costantini, F., Romano, F., (1998). Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free radical biology medicine journal*, 25(6) : 676-681p.

Mishra, K., Sahu, N., Mishra, A., Ashoke, K., Chattopadhyay, P., (2010). Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of essential oil of Eucalyptus leaf. *Pharmacognosy Journal*, 16 :25-28p.

Molyneux, P., (2004). The use of the stable free radical diphenyl picryldrazyl (DPPH.) for estimating antioxidant activity Song klanakar. *Journal of Sciences and Technologies*, 26 (2) :211-219p.

Morena, M., Martin-Mateo, M., Cristol, J., Canaud, B., (2002). Stress oxydant, hémoincompatibilité et complications de la dialyse au long cours. *Néphrologie*, 23(5) :201-208p.

Noipa, T., Supalax, S., Thawatchai, T., Wittaya, N., (2011). New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food search International*, 44 : 798-806p.

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

Oumaskour, K., Boujaber, N., Etahiri, S., Assobhei, O., (2012). Screening of antibacterial and antifungal activities in green and brown algae from the coast of Sidi Bouzid (El Jadida, Morocco). *African journal of biotechnology*, 11(104) : 16831-16837p.

Pal Singh, H., Kaur, S., Negi, K., Kumari, S., Saini, V., Batish, R., (2012). Assessment of in vitro antioxidant activity of essential oil of *Eucalyptus citriodora* (lemonscented Eucalypt; Myrtaceae) and its major constituents. *Food Science and Technology*, 48: 23-241p.

Patrick, B., Jean, L., Michel, S., (1988). *Bactériologie : Les bactéries des infections humaines*. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris, Lavoisier MSP. 274p.

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

Ponce, G., Fritz, R., Del Valle, E., Roura, I., (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, (36) : 679–684p.

Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., (2009). Evaluation de l'activité antioxydante des copposés phénoliques par laréactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de Génie industriel*, 4 : 25-39p.

Raho, B., Ghalem, M., Benali, M., (2008). Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(10) : 211-215p. ISSN 1996-0816.

Rather, A., Dar, A., Wani, A., Shah, S., Bhat, A., Ganai, A., Bhat, A., Anand, R., Qurishi, A., (2012). Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. *Phytomedicine*, 19 : 1185– 1190p.

Ribéreau-Gayon, P., (1968). *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition. Paris, Dunod, 254p.

Références bibliographiques

Rubenza, D., Shemb, M., Otsyiac, R., Bakengesac, S., (2005). Polyphénolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected Acacia leaves. *Animal Feed Science and Technology*, 119 :129-142p.

Schaenberg, A., Hess, H., (2007). Les plantes contiennent des tannins dans l'alimentation des ruminants. *Revue UFA*, 2:45-46p.

Seidel, V., (2005). Initial and Bulk Extraction. In: Sarker , S and Gray, A . *Natural products isolation*. Ed, Totowa , Humana Press , 27-37p.

Song, A., Wang, Y., Liu, Y., (2009). Study on the chemical constituents of the essential oil of the leaves of Eucalyptus globules Labill from China. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 4(4) : 134-140p.

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

Su, X., Duan, J., Jian, Y., Shi, J., Kakuda, Y., (2006). Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 :348-353p.

Tesche, S., Metternich, F., (2008). The value of herbal medicines in the treatment of acute non-purulent rhinosinusitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1265 (11):1355-1359p.

Talbi, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Hilali, A., (2015). Evaluation de l'activité antioxydant et la composition physico-chimique des extraits méthanoliques et aqueux de la *Nigella sativa L. Sci*, 6(4) : 1111-1117p.

Tenover, C., (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119 (6) : 3-10p.

Tim, P., Andrew, L., (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *Journal Antimicrob Ag*, 26: 343–356p.

Traore, N., Sidibe, L., Bouare S., Harama, D., Somboro, A., Fofana, B., Diallo, D., Figueredo , G., et Chalchat, J., (2013). Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Eucalyptus citriodora* Hook et *Eucalyptus houseana* W.Fitzg. ex Maiden. *Int. J. Biol. Chem.Sci*, 7(2): 800-804p. ISSN : 1991-8631.

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

Tyagi, A., Malik, A., (2011). Antimicrobial potential and chemical composition of Eucalyptus globulus oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*, 126 : 228–235p.

Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakbkiewicz-Banecka, J., Âgrzyn, G., (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62: 132-135p.

Valko, M., Rhodes, C., Izakovic, M., Mazur, M., (2006). Free radical, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160 :1-40p.

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

Wolters, M., Hermann, S., Golf, S., Katz, N., (2005). Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *Journal of Clinical Nutrition*, 24 : 1-7p.

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

Yi, Z., Yan, Y., Liang, Y., Zeng, B., (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of Pericarpium Citri Reticulatae of a new Citrus Cultivar and its main flavonoid. *LWT*. 41:597 603p.

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

Zrira, S., El khiran, F., Benjllal, B., (1994). Huiles essentielles de six espèces xérophyles d'Eucalyptus. *Effet du milieu sur les rendements et la composition-chimique*, 14 (1) : 5-9p.

Annexes

Annexe I :

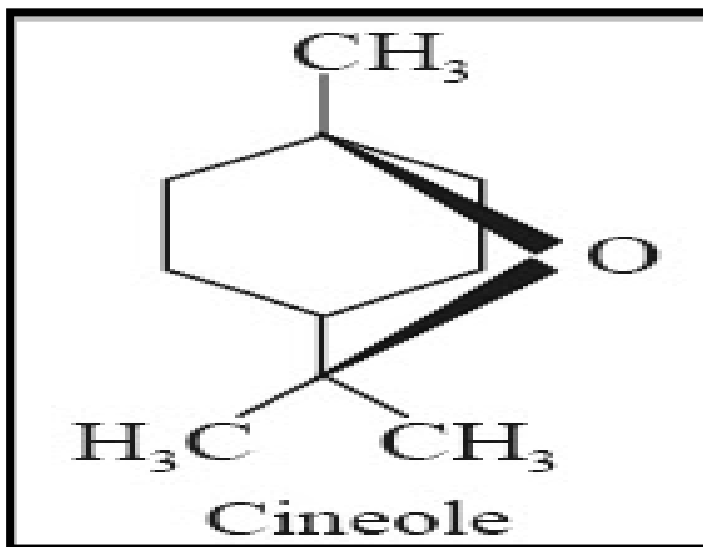


Figure 01: Structure chimique de l'eucalyptol (Pietta, 2000).

Annexe II :

Matériels utilisés :

Les différents matériels utilisés pour nos travaux sont :

- Agitateur du tube VORTEX FISCHER SCIENTIFIC TOPMIX FB 15024
- Agitateur magnétique RCT basic
- Balance analytique KERN/ALJ220-4NM
- Balance de palliase KERN FTB
- Etuve Memmert
- Plaque chauffante RCT basic
- Spectrophotomètre OPTIKA B-350
- Cuve
- Tubes secs
- Bécher
- Entonnoir
- Eprouvette
- Fiole

- Filet de nylon
- Micropipette
- Boîtes de pétri
- Ecouvillon stériles
- Disques en papiers wattman vierges
- Porte pièce

Produits de travail :

- Acide gallique (200µg /ml)
- Carbonate de sodium Na₂ CO₃ (7,5%)
- Réactif de Folin-Ciocalteu (10%)
- Quercétine
- AlCl₃ (2%)
- Solution de DPPH
- BHT (1mg/ml) : préparé dans le méthanol
- DMSO
- Milieu de culture (gélose nutritif)
- Antibiotiques : (AM, GEN, OX)

Annexe III :

Activité antimicrobienne	Degré de sensibilité	Diamètre de la zone d'inhibition
Extrêmement sensible	+++	Plus de 20mm
Très sensible	++	15mm à 19mm
Sensible	+	8 à 14mm
Non sensible	-	Moins de 8mm

Tableau 01 : Echelle de l'estimation de l'activité antimicrobienne (Ponce et *al.*, 2003).

ملخص

Eucalyptus globulus (الكالاتوس) هو نبات طبي ينتمي الى عائلة *Myrtaceae*. تم تحضير المستخلص المائي من هذه النبتة من الجزء الهوائي (الأوراق). حيث قدر المردود بـ 8.639%. أظهر التقدير الكمي (polyphénols و flavonoïdes) باستعمال طريقة التلوين أن هذا المستخلص غني بهذه المركبات (280,6372 ug EAG/mg d'extrait) ; (37,2839 ug EQ/mg d'extrait) على التوالي. بالإضافة الى نشاط مضادات الأكسدة باستعمال طريقة إزالة الجذور الحرة DPPH حيث ان IC50 قدر بـ 0.0189 ± 0.0015 (ملغ/مل) وهي أقل من تلك التي تم الحصول عليها بواسطة BHT 0.0057 ± 0.0012 (ملغ / مل).

في حين تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات ضد أربع سلالات بكتيرية (*Bacillus,S* ; *Staphylococcus aureus*)

باستعمال طريقة الانتشار فوق الجيلوز. اظهرت النتائج ان المستخلص له نشاط مضاد للبكتيريا موجبة الغرام بدرجات متفاوتة بينما في البكتيريا سالبة الغرام لا يوجد تأثير واضح.

كل هذه النتائج تثمن التطبيقات العلاجية المختلفة لهذا النبات في الطب التقليدي وتشجع على البحث عن جزيئات طبيعية جديدة ذات خصائص مضادة للأكسدة ومضادة للجراثيم تهدف إلى الاستثمار في صناعات مختلفة: الأدوية، مستحضرات التجميل، الغذاء الخ.

الكلمات المفتاحية : الكاليتوس، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للجراثيم، DPPH، Polyphénols.

Résumé

Eucalyptus globulus (Kalitus) est une plante médicinale appartient à la famille des *Myrtacées*, L'extrait aqueux a été préparé à partir de la partie aérienne (feuilles). Le rendement d'extraction est d'ordre 8,639%. L'estimation quantitative des phénols totaux, flavonoïdes par la méthode colorimétrique a montré que l'extrait est riche en ces composés (280,6372 ug EAG/mg d'extrait) ; (37,2839 ug EQ/mg d'extrait) par ordre. L'activité antioxydant a été évaluée par la méthode de piégeage de radical libre DPPH dont l'IC50 a été estimée à $0,0189 \pm 0,0015$ mg/ml qui est inférieure à celle obtenue par le BHT ($0,0057 \pm 0,0012$ mg/ml).

L'activité antimicrobien a été déterminé vis-à-vis quatre souches bactériennes (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) par la méthode de diffusion sur géloses. Les résultats mettent en évidence que l'extrait à manifesté une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram positif à des degrés variables, tandis que sur les bactéries à Gram négatif y'a aucun effet manifeste

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 caractère antioxydante et antibactérien dont le but de les investir dans les différentes industries : pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires,... etc.

Mots-clés : Activité antibactérienne, Activité antioxydant, DPPH, *Eucalyptus globulus*, Polyphénols.

Abstract

Eucalyptus globulus (Kalitus) is a medicinal plant belongs to the family Myrtaceae, the extract was prepared from the aerial part (leaves). The extraction yield is of the order 8.639%. Quantitative estimation of total phenols, flavonoid by the colorimetric method showed that the extract is rich in these compounds (280,6372 ug EAG/mg d'extrait) ; (37,2839 ug EQ/mg d'extrait) by order. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical scavenging method, the IC50 of which was estimated to be 0.0189 ± 0.0015 mg / ml which is lower than that obtained by BHT (0.0057 ± 0.0012 mg / ml).

The antimicrobial activity was determined against four bacterial strains (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) by the agar diffusion method. The results demonstrate that the extract showed antibacterial activity against Gram positive bacteria to varying degrees, where as on Gram negative bacteria there is no obvious effect.

All these results highlight the different therapeutic applications of this plant in traditional medicine and encourages the search for new natural molecules with antioxidant and antibacterial characteristic whose purpose is to invest in different industries: pharmaceuticals, cosmetics, food, etc.

Keywords: Antibacterial activity, Antioxidant activity, DPPH, *Eucalyptus globulus*, Polyphenols.