République Algérienne Démocratique et Populaire
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Université Dr Yahia Farès de Médéa
جامعة الدكتور يحي فارس المدية
Faculté des Sciences
كلية العلوم
Département des Sciences de la nature et de la vie
قسم علوم الطبيعة والحياة



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Spécialité : phytopathologie

Thème

Evaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits végétaux issus des feuilles sèches d'*Eucalyptus sp*

Présenté par
Melle : LICIR Imane **Melle : YAHI Radhia**

Devant le jury

Bendoumia Houda	MCB	Présidente
Boukhalfoun Leila	MAA	Promotrice
Kirouani Abderrezzak	MCB	Co-Promoteur
Boumediene Farida	MAA	Examinatrice
Outtar Fahima	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2019-2020

Remerciement

En tout premier lieu, nous remercions« ALLAH » le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous a permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadante Madame **Boukhalfoun. L** qui nous a dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, sa patience, ses conseils, tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nous remercions aussi chaleureusement et avec sincères gratitudes notre co-encadrant Monsieur **Kirouani. A** pour ses conseils et l'intérêt incontestable qu'il a porté, ainsi pour le temps qu'il a bien voulu nous consacrer, On exprime pour eux notre respect et nous nous trouvons incapable de formuler nos remerciements à eux.

Nous exprimons nos profonds remerciement à Mme **Bendoumia** d'avoir présidé le jury de ma soutenance, mes remerciements vont aussi aux examinatrices Mme **Outtar** et Mme **Boumediene** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous souhaiterons également remercier nos professeurs de la faculté des sciences de la nature et de la vie pendant les cinq années du notre parcours.

Nous tenons à témoigner nos sincères remerciements à toutes personnes ayant contribués de près ou de loin au bon déroulement de ce modeste travail.

Résumé

Les plantes aromatiques ont l'aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires en réponse aux stress biotique et abiotique. Ces métabolites secondaires possèdent diverses propriétés biologiques. Ce travail s'inscrit dans l'objectif d'une évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits végétaux issus des feuilles sèches d'*Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx*. La préparation des extraits végétaux a été effectuée par macération dans différents solvants tels que : l'eau, le méthanol. Les extraits méthanoliques et aqueux des deux espèces d'*Eucalyptus* ont présenté de bons rendements avec une prédominance pour les extraits aqueux. Le screening phytochimique des extraits des deux espèces a révélé que les sucres réducteurs, les quinones libres et les anthraquinones se présentent abondamment. En effet, les extraits méthanoliques sont fortement riches en saponines, les flavonoïdes, les coumarines et les tanins, cependant les extrait aqueux sont moyennement riches en flavonoïdes, coumarines et en tanins. La présence de ces métabolites secondaires dans les deux espèces étudiées relève leur utilité dans la médecine traditionnelle.

Mots clés : Eucalyptus, Extraits, métabolites secondaires, screening phytochimique.

Abstract

Aromatic plants have the ability to synthesize many secondary metabolites in response to the biotic and abiotic stresses. These secondary metabolites have various biological properties. The objectif of current study is to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of plant extracts from the dry leaves of *Eucalyptus blakelyi* and *Eucalyptus cladocalyx*. The preparation of the plant extracts was carried out by maceration in various solvents such as: water, methanol. Methanolic and aqueous extracts from both Eucalyptus species showed good yields with a predominance for aqueous extracts. The phytochemical screening of the extracts of the two species revealed that the reducing sugars, the free quinones and the anthraquinones are present in abundance. Indeed, the methanolic extracts are strongly rich in saponins, flavonoids, coumarins and tannins; however the aqueous extracts are moderately rich in flavonoids, coumarins and tannins. The presence of these secondary metabolites in both species shows their usefulness in traditional medicine.

Keywords: Eucalyptus, Extracts, secondary metabolites, phytochemical screening.

ملخص

تمتلك النباتات العطرية القدرة على تصنيع العديد من المستقلبات الثانوية استجابةً للإجهاد الحيوي واللاحيوي. هذه المستقلبات الثانوية لها خصائص بيولوجية مختلفة. هذا العمل هو جزء من هدف تقييم النشاط المضاد للأكسدة ومضاد الميكروبات للمستخلصات النباتية من الأوراق الجافة لأوكالبتوسبلاكيليوأوكالبتوسكلادوكاليكس. تم تحضير المستخلصات النباتية عن طريق النقع في مذيبات مختلفة مثل: الماء والميثانول. أظهرت المستخلصات الميثانية والمائية لكلا النوعين من الأوكالبتوسمردود جيد مع غلبة المستخلصات المائية. أظهر الفحص الكيميائي النباتي للمستخلصات من كلا النوعين أن السكريات المختزلة والكينونات الحرة والأنثراكينونات موجودة بكثرة. حيثان المستخلصات الميثانولية غنية جدًا بالصابونين والفلافونويدوالكومارين والعفص، في حين المستخلصات المائية نجدها غنية نسبيابالفلافونيداتوالكومارين والعفص. يظهر وجود هذه المستقلبات الثانوية فيالنوعين المدروسين فوائد كبيرة في الطب التقليدي.

الكلمات المفتاحية: الأوكالبتوس ، المستخلصات ، المستقلبات الثانوية ، الفحص الكيميائي النباتي.

Sommaire

Remerciements

Résumé

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction……..13

PARTIE 1 : Synthèse bibliographique……..15

Chapitre I : Les plantes médicinales……16

I.1. Définition……16

I.2. Parties de plantes médicinales utilisées……16

I.3. Présentation de la famille des Myrtacées…….....18

I.3.1. Généralités sur la famille des Myrtacées……...…18

I.3.2. Position systématique……...….19

I.3.3. Distribution géographique……...…..19

I.3.4. Le genre Eucalyptus……...…...19

I.3.4.1. Historique des Eucalyptus en Algérie……19

I.34.2. Origine et définition…….20

I.3.4.3. Classification botanique……..21

I.3.4.4. Description botanique……21

I.3.4.5. Distribution géographique…….. 21

I.3.4.6. Mode de reproduction……21

I.3.4.7. Propriété thérapeutique d'Eucalyptus……22

Chapitre II : Métabolisme secondaire…….……23

II.1. Définition…….....23

II.2. Biosynthèse…….….23

II.3. Classification……....24

II.3.1. Polyphénols……...25

II.3.1.1. Structure chimique……25

II.3.1.2. Biosynthèse des polyphénols……25

II.3.1.3. Classification……..27

II.3.2. Les alcaloïdes……32

II.3.2.1. Biosynthèse…… 32
II.3.2.2. Classification des alcaloïdes…….....33
II.3.2.3. Fonctions et propriétés…….34
II.3.2.3.1. Propriétés physico-chimiques……34
II.3.2.3.2. Propriétés pharmacologiques…….34
II.3.3. Terpénoïdes……..34
II.3.3.1. Définition……..34
II.3.3.2. Structure……34
II.3.3.3. Biosynthèse……...35
II.3.3.4. Classification…….35
II.3.3.5. Fonctions et propriétés……..37
Chapitre III: Activités biologiques étudiées…….....39
III.1. Activité antioxydante…….39
III.1.1. Stress oxydant…….39
III.1.1.1. Les marqueurs biologiques de stress oxydant…….....39
III.1.2. Les radicaux libres……..40
III.1.2.1. Source des radicaux libres……40
III.1.2.2. Origine des formes réactives de l'oxygène chez les plantes……42
III.1.2.3. Nature des radicaux libres…….. …….....42
III.1.2.4. Rôle des radicaux libres chez les plantes…….....44
III.1.3. Les antioxydants…….....44
III.1.3.1. Classification des antioxydants……...44

III.2. Activité antifongique…….48
III.2.1. Les antifongiques……48
III.2.2.Mécanismes d'action antifongiques……48
III.2.3. Relation entre l'activité antifongique et les métabolites secondaires……49
III.3.Activité antibactérienne…….....49
III.3.1.Généralités…….....49
III.3.2. Infections bactériennes……50
III.3.3.L'antibiotique…….....50
III.3.3.1. Mode d'action des antibiotiques…….....50
III.3.4. Activité antibactériennes des polyphénols…….....51
PARTIE 2 : Etude Expérimentale……53

Chapitre I:Matériel et méthodes…….....54
I.1. Présentation de la région d'étude……..54
I.2. Matériel utilisé……55
I.2.1. Matériel végétal…….....55
I.2.2. Souches microbiennes…….57
I.2.3. Matériel et réactifs des tests biologiques……57
I.3. Méthodes adoptées……57
I.3.1. Préparation des extraits…….....57
I.3.1.1. Préparation des extraits aqueux…….....57
I.3.1.1.1. Mode opératoire ……57
I.3.1.2. Préparation des extraits organiques : méthanolique, éthanoliqueetacétonique…58
I.3.1.2.1. Mode opératoire…….58
I.3.1.3. Préparation d'un décocté…….58
I.3.1.3.1. Mode opératoire…….58
I.3.2. Détermination du rendement des extraits secs……59
I.3.3. Extraction des flavonoïdes……..59
I.3.3.1. Mode opératoire…….....59
I.3.3.1.1. Macération et évaporation……..59
I.3.3.1.2. Extraction liquide – liquide……59
I.3.3.1.2.1. Elimination de la chlorophylle et les lipides par l'éther de pétrole……59
I.3.3.1.2.2. Elimination des génines libres……59
I.3.3.1.2.3. Elimination des mon osides……. ……..60
I.3.3.1.2.4. Récupération des flavonoïdes……60
I.3.3.1.2.5. Evaporation sous vide de butanol……...60
I.3.3.2. Calcul du poids de résidu des flavonoïdes……...60
I.3.4. Extraction des tanins……. ……..60
I.3.4.1. Mode opératoire……60
I.3.4.2. Calcul du poids de résidu des tannins……...61
I.3.5. Screening phytochimiquedes extraits végétaux……..61
I.3.5.1. Détection des stérols et poly terpènes……...61
I.3.5.2.Détection des tanins……...61
I.3.5.3.Détection des flavonoïdes……. …62
I.3.5.4.Détection des saponines……62
I.3.5.5. Détection des coumarines……62

I.3.5.6. Détection des protéines……..62
I.3.5.7. Détection des alcaloïdes…….. …..62
I.3.5.8. Détection des sucres réducteurs…….63
I.3.5.9. Détection des quinones libres……63
I.3.5.10. Détection des anthraquinones……. ……63
I.3.2.11. Détection des substances phénoliques…….63
I.3.6. Etude des activités biologiques des extraits utilisés…….....63
I.3.6.1. Activité antioxydante…….. …..63
I.3.6.1.1. Réduction du fer : FRAP (FerricReducingAntioxidant Power)…….63
I.3.6.1.1.1. Principe…….....63
I.3.6.1.1.2. Mode opératoire……...64
I.3.6.1.1.3. Expression des résultats……...64
I.3.6.1.2. Piégeage par le radical libre DPPH…….. …….64
I.3.6.1.2.1. Principe……64
I.3.6.1.2.2. Mode opératoire……65
I.3.6.1.2.3. Expression des résultats……65
I.3.6.2. Activité antifongique…….……66
ChapitreII:Résultats et discussion……..68
II.1. Rendements en extraits bruts…….68
II.2. Tests biochimiques préliminaires……...69
Conclusion……....72
Références bibliographiques

Liste des tableaux et des figures

Tableau 01 : Position systématique de la famille des Myrtacées……19
Tableau 02: Exemples de dérivés de l'acide benzoïque identifiés chez des plantes halophytes…….27
Tableau 03 : Exemples de dérivés de l'acide hydroxycinnamique rencontrés chez des plantes halophytes……28
Tableau 04 : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes……35
Tableau 05 : Source endogène et exogène……..41
Tableau 06 : Résultats du screening phytochimique des extraits d'*E blakelyi* et*E cladocalyx*……..70
Figure 01 : Distribution géographique de la famille des myrtacées……19
Figure 02 : Voies du métabolisme secondaire des plantes……..24
Figure 03 : Le noyau phénols…….....25
Figure 04 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols…….....26
Figure 05 : Structure de base des flavonoïdes…….28
Figure 06 : Structures chimiques des tannins ; (A) Tannins hydrolysables, (B) Tannins condensés…….....30
Figure 07 : Structures chimiques de lignine……31
Figure 08 : Structure d'une molécule de coumarine……...31
Figure 09 : Structure chimique de stilbène…….....32
Figure10 : Structure de base de l'isoprène……..35
Figure 11 : déséquilibre de la balance entre antioxydants et espèces oxygénées actives...39
Figure 12 : la réaction catalysée par XOR……..41
Figure 13 : Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale……....42
Figure 14 : Cascade de production des principales ERO……43
Figure 15 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des espèces réactives……45
Figure 16 : Structure chimique d'un polyphénol de synthèse (3,3′, 5,5′-Tetra-t-butylbiphenyl4, 4′-diol)……...47
Figure 17 : Schéma représentatif des mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques sur une bactérie à Gram positif (gauche) et à Gram négatif (droite)……...51
Figure 18 : Localisation du site de récolte (Forêt de Bainem)……....54
Figure 19: Branches feuillées et inflorescences……..56

Figure 20 : Les étapes de préparation de l'extrait aqueux……58
Figure 21 : mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltraizine ferrique Fe^{3+} -TPTZ et un antioxydant (AH)…….64
Figure 22 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant……..65
Figure 23 : Rendements des extraits méthanolique et aqueux *d'Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx*……**.....**69

Liste des abréviations

µl : Microlitre

$^1O_2$: Oxygène singulet

BHA : Acide bêta-hydroxylé

BHT : Hydroxytoluènebutylé

CAT : Catalase

CH_2O : Méthanal

$CuSO_4$: Sulfate de cuivre

DPPH :2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

EOA : Espèces oxygénées actives

ERO/ ROS : Espèce Réactive de l'Oxygène

Fe^{3+} : Ferrique

$feCl_3$: Chlorure de fer

GPx : Glutathion peroxidase

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène MB : Concentration Minimale Bactéricide

H_2SO_4 :L'acidesulfurique

HCl : Acidechlorhydrique

HO• : Holmium

HOCl• : acide hypochloreux

$K_3Fe(CN)_6$:ferricyanure de potassium

M : Masse

MeOH :Méthanol

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH_4OH :L'ammoniaque

nm : Nanomètre

NO :le monoxyde d'azote

O2•- : Ion Superoxyde

OH• : Radical hydroxyle

PAM : plante aromatique médicinale

PDA : milieu de culture

PH : potentiel hydrogène

ROO• : Radical peroxyle

ROOH : Peroxyde organique

SOD : Superoxydedismutase

tr /min :tour par minute

UV : Ultra-violet

XDH : Xanthine de hydrogenase

XOR : Xanthine Oxidoreductase

Introduction

Les plantes médicinales constituent des ressources précieuses pour la majorité des populations rurale et urbaine en Afrique et représentent le principal moyen par lequel les individus se soignent (Badiaga, 2011).

Les plantes supérieures produisent des centaines de milliers de composés chimiques divers avec différentes activités biologiques et rôles écologiques importants. Dans de nombreux cas, ces substances ou composés servent de mécanisme de défenses chimiques contre les insectes, herbivores et micro-organismes.

Les métabolites secondaires que constituent ces plantes sont responsables de leurs effets, il s'agit : des composés phénoliques, des huiles essentielles, des alcaloïdes qui ont un effet inhibiteur sur les enzymes. Ces composés possèdent une capacité anti-oxydante très importante et peuvent contribuer à une diminution du stress oxydatif (Koyama et al., 1999).

L'Algérie est considérée comme un pays riche en plantes aromatiques et médicinales susceptibles d'être utilisées dans différents domaines (pharmacie, parfumerie, cosmétique, agroalimentaire) pour leurs propriétés thérapeutiques, organoleptiques et odorantes (Quézel et Santa, 1962). Ces plantes aromatiques sont à l'origine des produits à forte valeur ajoutée (huiles essentielles, extraits, résines…) qui se présentent presque souvent comme des mélanges complexes dont il convient d'analyser la composition avant leur éventuelle valorisation.

L'Eucalyptus est l'un des principaux genres de la famille des Myrtacées. Il est originaire d'Australie et de Tasmanie, et il est acclimaté dans d'autres pays comme l'Inde, le Brésil (Ghedira et al., 2008) et dans le bassin Méditerranéen (Aït youssef, 2006). En Algérie, l'Eucalyptus occupe une surface de 39.000 ha en 1995 (Jacovelli, 2002), ses feuilles sont employées traditionnellement comme remède tonique sous forme d'infusion pour traiter la grippe saisonnière, les infections des voies respiratoires, les diarrhées, les fièvres, les douleurs dentaires, les engelures et autres complications (Aït youssef, 2006 ; Kim et al., 2001).

Les propriétés pharmacologiques de l'Eucalyptus sont liées essentiellement à sa composition en diverses classes de métabolites secondaires à savoir les huiles essentielles, les tannins et les flavonoïdes (Vankar et al., 2006), les extraits de feuilles de cette plante sont inclus au Japon, dans la liste des additifs alimentaires (Amakura et al., 2002).

Récemment, de nombreux travaux ont été entrepris sur les propriétés médicinales des extraits d'Eucalyptus, ces recherches ont démontré qu'ils présentaient divers effets biologiques tels que antibactérien et antioxydant (Al-Sayed et al., 2010 ; Boukhalfoun et al., 2020).

C'est dans ce contexte que notre travail s'est consacré à l'étude de la composition chimique des deux espèces d'Eucalyptus, *Eucalyptus blakelyi*Maiden et *Eucalyptus cladocalyx*Mueller notamment l'identification des différents groupes chimiques présents dans les extraits préparés à partir des feuilles sèches, ainsi que l'évaluation in vitro du pouvoir antioxydant, antibactérien et antifongique.

Partie théorique

Chapitre I

Les plantes médicinale

I.1. Définition

Une plante médicinale est définie par la pharmacopée française comme une « drogue végétale : ce sont toutes les plantes qui contiennent une ou des substances pouvant être utilisées à des fins thérapeutiques ou qui sont des précurseurs dans la synthèse de drogues utiles (Sofowora, 2010).

Actuellement grâce aux progrès scientifiques considérables enregistrés depuis la fin du XIXème siècle (technique d'analyse et extraction... etc.), les plantes médicinales constituent des ressources inestimables qui ont été utilisées pour trouver de nouvelles molécules nécessaire à la mise au point de futurs médicaments (Gurib-Fakim, 2006). D'après Odile et Daniel (2007), environ plus de 30% des médicaments contiennent des principes actifs d'origine naturelle.

I.2. Parties de plantes médicinales utilisées

Les différentes parties de la même plante médicinale peuvent présenter des constituants chimiques très différents et qui n'ont pas la même action thérapeutique. Généralement en médecine traditionnelle, la partie qui contient plus de principes actifs est la plus employée. Les parties de plantes qui peuvent être employées chez la plupart des populations sont ceux qui ont été décrites par (Gurib-Fakim ,2006).

-Racine : Les racines peuvent être fibreuses, solide ou charnues.

-Rhizome : Le rhizome est une tige ligneuse ou allongée charnue qui pousse généralement horizontalement en dessous du sol, formant des feuilles au-dessus du sol et des racines dans le sol.

-Bulbe : Un bulbe est une pousse souterraine verticale disposant de feuilles modifiées utilisées comme organe de stockage de nourriture par une plante à dormance. Les bulbes populaires en médecine traditionnelle sont l'oignon et l'ail.

-Tubercule : Un tubercule est une structure charnue gonflée, généralement souterraine, qui assure la survie des plantes pendant la saison d'hiver ou en période de sécheresse. Ces

organes peuvent être formés sur les racines ou se développent sur les parties aériennes de la plante. La pomme de terre africaine (*Hypoxissp*. De la famille Hypoxidaceae) est un exemple bien connu.

-Écorce : L'écorce est la couche protectrice externe d'un tronc d'arbre, elle est souvent riche en toxines (phénols) et principes amers (tanins), ce qui la rend plus protectrice. Exemple : *Cinchonasp*. De la famille des Rubiaceae et *Cinnamomumcamphora* et *C. camphora*qui appartiennent à la famille des Lauraceae.

-Bois : Le bois est la tige épaisse ou le bois lui-même. Exemple : *Santalum album* de la famille Santalaceae.

-Feuilles : Les feuilles peuvent être utilisées seules ou mélangées avec leur pétiole.Exemple : *Ginkgo biloba* de la famille Ginkgoaceae.

-Gommes : Les gommes sont des composés solides constituent d'un mélange de polysaccharides. Ils sont solubles dans l'eau et partiellement digérés par les êtres humains**.** Exemple *Acacia Sénégal* ;*Terminaliabentzoe.*

-Fleurs : Les fleurs sont très utilisées dans la médecine traditionnelle.

- Exemple 1 **:***Eschscholtziacalifornica Cham*

L'eschscholtzia renferme des alcaloïdes responsables de l'amélioration de la qualité du sommeil. Elle favorise l'endormissement, diminue les réveils nocturnes et prolonge le temps de sommeil. (Vincieri et al, 1988).

- Exemple 2 : Aubépine : *Crataegus monogyna et oxyacantha L.*

À fleurs odorantes de couleur blanche ou rose, sont groupées en bouquets. On utilise en thérapeutique les sommités fleuries qui sont récoltées à la fin du printemps. (Paris, 1983).

-Fruits : Plusieurs études rapportent que les fruits riches en flavonoïdes, en anthocyanines et en procyanidines, comme la grenade *Punicagranatum*, auraient le potentiel de réduire les risques de maladies cardiovasculaires. Ces composés agiraient en synergie sur différents marqueurs, par exemple dans les plaquettes sanguines et les vaisseaux sanguins (Chong et al, 2010).

-Graines : Les graines de ricin (*Ricinuscommunis*), sont des graines oléagineuses importantes, elles contiennent approximativement 50% de l'huile et 18% de protéines (Anoskie and Chibogwuk, 1981).

Les graines de *Ricinuscommunis*ont été employées dans différentes parties du monde comme cathartique, un émétique et pour le traitement de la lèpre et de la syphilis (Abdulazim et al, 1998).

I.3. Présentation de la famille des Myrtaceae

I.3.1. Généralités sur la famille des Myrtacées

Est une famille des plantes dicotylédones qui comprend plus de 5650 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).

Ce sont des arbustes à : fleurs axillaires hermaphrodites ; 5-mère et du Calice cupuliforme. Les étamines sont très nombreuses, insérées avec les pétales au sommet du tube calycinal. Le gynécée est infère ou semi-infère à 5 carpelles uniloculaires, à ovules nombreux, à placentation axile. Le fruit est bacciforme bleuâtre, globuleux, de 5-8mm de diamètre **(**Quzel et Santa, 1963),

Les fleurs à odeur suave des Myrtacées sont pollinisées par divers insectes, oiseaux ou mammifères ; le nectar sert de monnaie d'échange. Chez les genres Eucalyptus, Melaleuca et Callistemon, les étamines sont plus remarquables que les pétales, donnant à l'inflorescence un aspect de goupillon. Les espèces à fruit charnu sont disséminées par les oiseaux et les mammifères ; les espèces à fruits capsulaires ont de petites graines parfois ailées qui sont disséminées par le vent ou par l'eau (Bruneton, 1999).

La recherche bibliographique réalisée sur cet axe montre que la majorité voire la totalité des espèces de la famille des Myrtacées renferme des métabolites secondaires tels que : les flavonoïdes, les huiles essentielles et les terpénoïdes.

Beaucoup d'espèces de cette famille possèdent des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle, elles sont une source d'huiles essentielles pour la parfumerie et en aromathérapie. Récemment, de nombreux travaux ont été entrepris sur les activités biologiques des huiles essentielles d'Eucalyptus (Sefidkon et al., 2006; Sefidkon et al., 2007). Boukhalfoun et al. (2020) ont constaté que les huiles essentielles d'*Eucalyptus blakelyi*présentaient une excellente activité contre les bactéries *Staphylococcus aureus,Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*.

I.3.2. Position systématique

La position systématique de la famille des Myrtacées est comme suit :

Tableau 1.1 : Position systématique de la famille des Myrtacées (Grêté, 1965).

Règne	Plantae
Sous-règne	Eucaryotae
Embranchement	Spermaphytae
Sous-embranchement	Angiospermae
Classe	Dicotylédonae
Ordre	Myrtales
Famille	Myrtaceae

I.3.3. Distribution géographique

Les myrtacées se trouvent dans la région méditerranéenne, en Australie, en Amérique tropicale, en Afrique subsaharienne, à Madagascar et dans les régions tropicales et tempérées de l'Asie (Bruneton, 1999).Néanmoins, certaines espèces ont été acclimatées dans d'autres pays tels que les pays du bassin Méditerranéen, l'Europe et l'Amérique du nord (Aïtyosef, 2006*)*.



Figure 1.1 : Distribution géographique de la famille des Myrtacée**s** (Bruneton, 1999).

I.3.4. Le genre Eucalyptus

I.3.4.1. Historique des Eucalyptus en Algérie

Les espèces du genre Eucalyptus ont été introduites massivement en Algérie dès le XIXe siècle (dès 1856), en particulier l'*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 les auteurs Aït Youssef (2006) et Baba Aïssa (1999) sont **:**

- *Eucalyptus globulus*Labill ou gommier bleu.
- *Eucalyptus citriodora* son huile essentielle lui procure une odeur citronnelle de verveine.
- *Eucalyptus camaldulensis*ou gommier rouge.

L'Eucalyptus, comme exotique, a déjà une longue histoire (Métro, 1955). C'est à partir de 1850 que les Eucalyptus ont été introduits par les Français en Algérie, avec l'E.camaldulensisDehn., comme espèce pionnière. Mais, la plantation massive de ces arbres a eu lieu, entre 1865 et 1963. Les Eucalyptus ont été plantés à titre exceptionnel pour l'assèchement des marais (Mehani, 2006).

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

C'est vers les années 1960 et 1970 qu'ont commencé le reboisement à base d'Eucalyptus à l'est du pays (EL-Kala, Annaba, Skikda) au centre (Tizi-ouzou et Baïnem) et à l'ouest (Mostaganem) dans le but de répondre aux besoins nationaux en produits ligneux et avec un capital d'environ 130 espèces. La plantation d'Eucalyptus a continué jusqu'en 1982 où il a été mis fin à la production des plantes en pépinière et par conséquent à leur plantation (Meziane, 1996 ; Mehani, 2006).

I.3.4.2. Origine et définition

Le genre Eucalyptus fût décrit et baptisé en 1788 par le botaniste Français Heritier, après qu'il eut examiné des échantillons d'*Eucalyptus obliqua* parmi les différentes plantes récoltées en Australie (Bingendako, 2004). Le terme Eucalyptus dérive du mot grec « Eu » : vrai et « Kalyptus » : couvercle ou opercule (Boullard, 1997), allusion au couvercle du bouton floral qui couvre les étamines (Aït Youssef, 2006).

Le genre Eucalyptus comprend environ 700 espèces réparties sur l'île-continent Australie et sur une petite partie du sud-est Asiatique (Le genre Eucalyptus est presque totalement endémique de l'Australie puisque seulement quelques espèces ne sont pas originaires exclusivement de ce pays et une seule n'y est pas représentée (Pryor, 1976 ; George, 1981).

I.3.4.3. Classification botanique

Les Eucalyptus sont des angiospermes dicotylédones de la famille des Myrtacées. La principale classification est celle de Pryor et Johnson (Pryor et Johnson, 1971) qui définissent sept sous-genres (Corymbia, Blakella, Eudesmia, Gaubaea, Idiogenes, Monocalyptus et Symphyomyrtus). Un huitième sous-genre (Telocalyptus) a été suggéré par Johnson en 1976. Plus récemment, les sous-genres Corymbia et Blakella ont été formellement séparés du reste des Eucalyptus et placés dans un nouveau genre Corymbia (Hill et Johnson, 1995). Actuellement, les Eucalyptus sont répartis dans les genres Eucalyptus, Corymbia et Angophora. Le genre Eucalyptus comprend principalement les sous-genres des Symphyomyrtus et des Monocalyptus qui contiennent la plupart des espèces cultivées.

I.3.4.4. Description botanique

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).

I.3.4.5. Distribution géographique

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

I.3.4.6. Mode de reproduction

La majorité des espèces d'Eucalyptus présentent un nombre de chromosome de 2n = 22. Les fleurs sont hermaphrodites, les organes mâles et femelles se trouvent dans la même fleur. L'âge de maturité oscille selon les espèces de 3 à 10 ans, mais un décalage de

floraison existe entre les différentes unités génétiques (individus, provenances, espèces). La pollinisation est principalement entomophile ou réalisée par les oiseaux pour les espèces à grandes fleurs (Hopper et Moran, 1981), ce qui favorise dans ce dernier cas l'hybridation inter-spécifique. La distance de dispersion du pollen est généralement inférieure à 100 mètres (Eldridge et al., 1993).

L'allogamie préférentielle est favorisée par différents mécanismes dont la protandrie (maturation décalée du stigmate et du pollen), mais aussi l'incompatibilité du tube pollinique et du stigmate, la stérilité mâle et par un mécanisme génétique de contrôle d'incompatibilité (Pryor, 1976).Cependant, il existe une part non négligeable d'autogamie lors de la fécondation. Dans les conditions naturelles, le taux d'allofécondation moyen est estimé à 75 % avec des variations comprises entre 60 et 90 % (Moran et al., 1989). L'autofécondation produit des graines peu viables avec des taux de germination réduits et une croissance plus lente. Les arbres très consanguins sont éliminés simplement par concurrence avec les autres arbres. Des formes anormales plus ou moins létales, appelées « dwarfs » ou naines sont parfois observées, mais sans être obligatoirement reliées à la consanguinité (Arbez et Lacaze, 1999).

I.3.4.7. Propriétés thérapeutiques d'Eucalyptus

L'Eucalyptus est utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise pour une variété de maladies, Ses principales utilisations sont la production d'huiles essentielles, qui sont utilisées à des fins médicinales et pharmaceutiques. (Belyagoubi, 2012), aussi pour soulager les symptômes de l'asthme, pour traiter l'inflammation des voies respiratoires, de la gorge ou des muqueuses de la bouche (voie interne) ainsi que pour soulager les douleurs rhumatismales (Atta, 1998). Les Aborigènes (Australiens autochtones) utilisent traditionnellement les feuilles d'Eucalyptus pour guérir les plaies et les infections fongiques. Les extraits de feuilles d'Eucalyptus ont été approuvés en tant qu'additifs alimentaires et sont également utilisés dans les formulations cosmétiques (Takahashi, 2004 ; Boukhalfoun et al., 2020). En effet, les plantations d'Eucalyptus ont été utilisées pour désinfecter la région d'Alger. Son action antimalarique est vérifiée par la disparition de moustiques en Campanie (Italie), en Sicile, en Sardaigne et au lac Fezara en Algérie. Au XIXe siècle, l'Eucalyptus est considéré comme, antipyrétique, antalgique des céphalées, antispasmodique et béchique. L'écorce était considérée antispasmodique et antipyrétique (Ghidira et al., 2008 ; Pal Sing et al., 2012).

Chapitre II

Les métabolites secondaires

II.1. Définition

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

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (Boudjouref, 2011). Ils sont caractérisés par de faible concentration dans les tissus végétaux (généralement quelque pourcent du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) (Newman and Gragg, 2012). Ces molécules organiques n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (Guignard, 1996).

Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique (Buchanan, 2001).

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

II.2. Biosynthèse

La production des métabolites secondaires est étroitement liée au métabolisme primaire, résultant généralement de trois voies de biosynthèse (Figure 2.1) : la voie de shikimate, la voie de mévalonate et du pyruvate (Verpoorte et Alfermann, 2000). La plupart des précurseurs sont issus de la glycolyse (pyruvate, phosphoénolpyruvate, acétyl-CoA), de la voie des pentoses phosphate (glycéraldéhyde-3-P, Erythrose-4-P) et du métabolisme des lipides (glycéraldéhyde-3-P et acétyl-CoA). Ces précurseurs sont à l'origine de la diversité structurale observée au niveau des métabolites secondaires (Mayer, 2004).

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

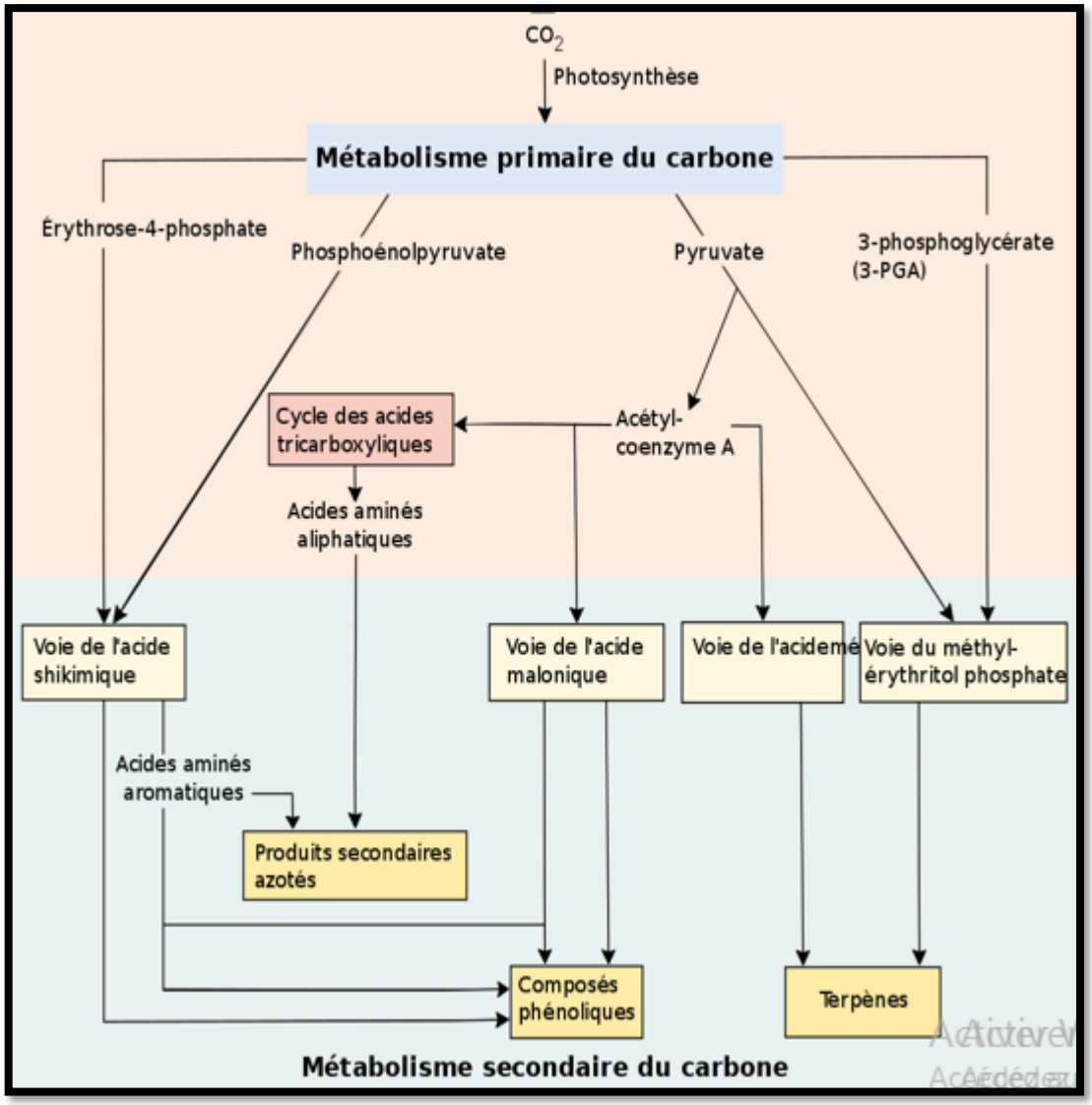


Figure 2.1 : Voies du métabolisme secondaire des plantes (Taiz et al., 2006).

II.3. Classification

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

II.3.1. Polyphénols

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires qui constituent un des groupes le plus représenté et largement distribué dans le monde végétal avec plus de 8000 structures phénoliques. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyl libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside (Bruneton, 2015 ; Šaponjac et al., 2016), Ils sont solubles dans la solution de carbonate de sodium. Chimiquement, ils sont réactifs et donnent souvent lieu à des liaisons hydrogènes, ou chélater des métaux pour les O-dihydroxyphénols (catéchol). Enfin, ils sont sensibles à l'oxydation (Gorham, 1977).

II.3.1.1. Structure chimique

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

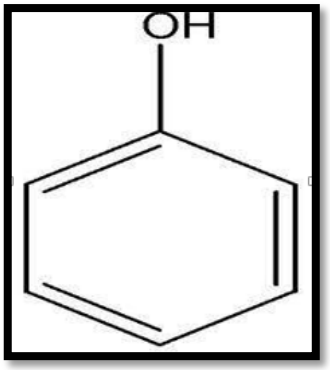


Figure 2.2 : Le noyau phénols (Herzi, 2012).

II.3.1.2. Biosynthèse des polyphénols

La biosynthèse des polyphénols se fait par deux voies principales.

a- La voie de l'acide shikimique

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

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

b-Voie de l'acétate

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).

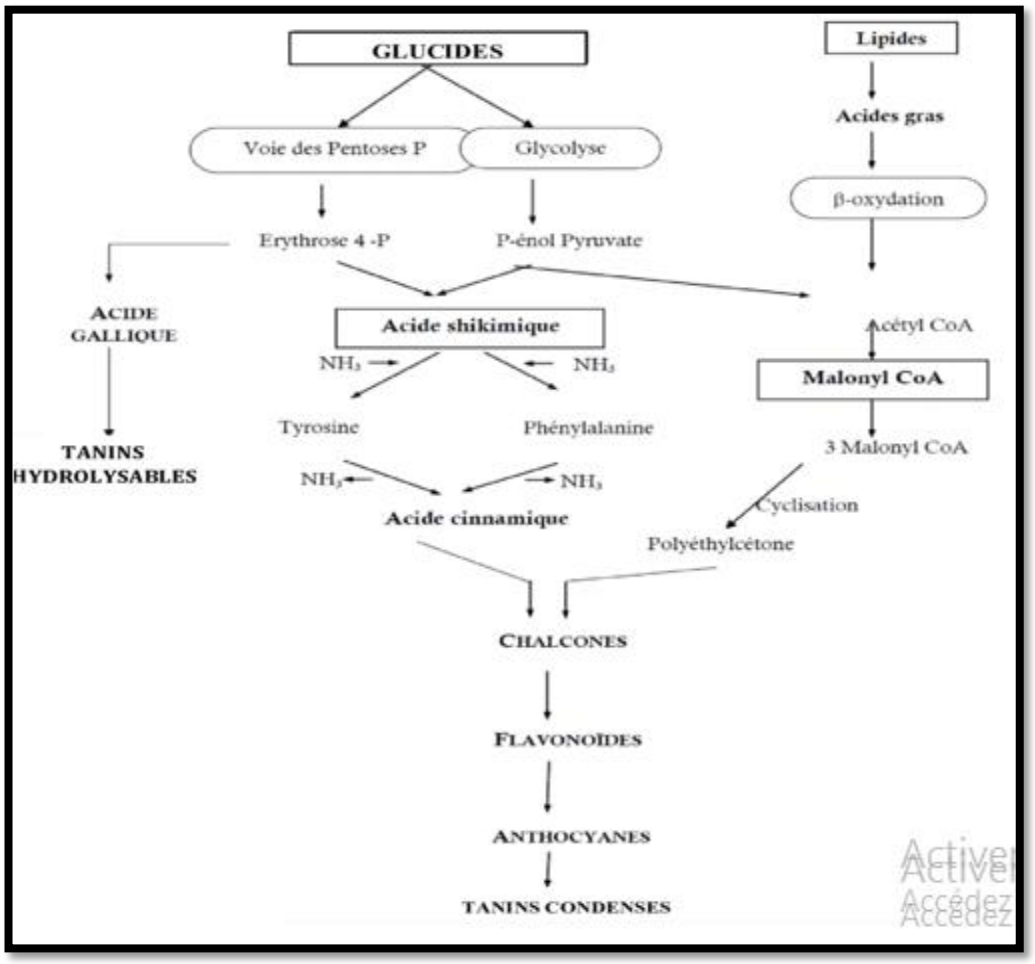


Figure 2.3 : Représentation schématique des voies de biosynthèse des polyphénols (Chaouche, 2014).

II.3.1.3. Classification

On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, (Macheix et al., 2006). 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.

a- Polyphénols monomériques

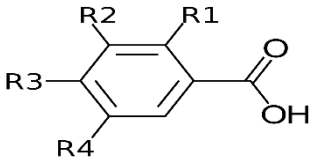
• Acides phénoliques

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

✓ Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Ils dérivent de l'acide benzoïque et ont une structure de base de type C6-C1 (Ignat et al., 2011). Ces acides hydroxybenzoïques sont très communs, aussi bien sous forme libre que sous forme d'esters ou d'hétérosides (Bruneton, 2015). Les plus répandus sont : l'acide salicylique et l'acide gallique (Bruneton, 1999).

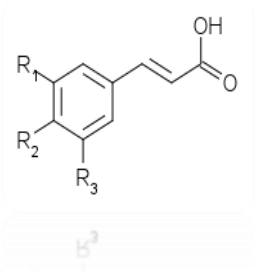
Tableau 2.1 : Exemples de dérivés de l'acide benzoïque identifiés chez des plantes halo phytes (Ksouri et al., 2012).

Squelette	Composé	R1	R2	R3	R4
	Acide vanillique	H	OCH3	OH	H
	Acide gallique	H	OH	OH	OH

✓Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Ils ont une structure de base de type C6-C3 (Ignat et al., 2011). Les fonctions phénols(OH) de ces dérivés peuvent aussi être méthylés (-O-CH3).

Tableau 2.2 : Exemples de dérivés de l'acide hydroxycinnamique rencontrés chez des plantes halophytes (Ksouri et al., 2012).

Squelette	Composé	R1	R2	R3
	Acide p-coumarique	H	OH	H
	Acide férulique	OCH3	OH	H
	Acidecaféique	OH	OH	H

• Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont les composés les plus abondants parmi tous les composés phénoliques.Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux. Ils interviennent aussi dans les processus de défense contre le rayonnement UV, les herbivores et les attaques microbiennes (Bruneton, 2015). Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes (Stöckigt et al., 2002) et leur nombre ne cesse d'accroitre. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure en C6-C3-C6 du diphénylpropane (Figure 2.4), les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C (De Rijke et al., 2006).

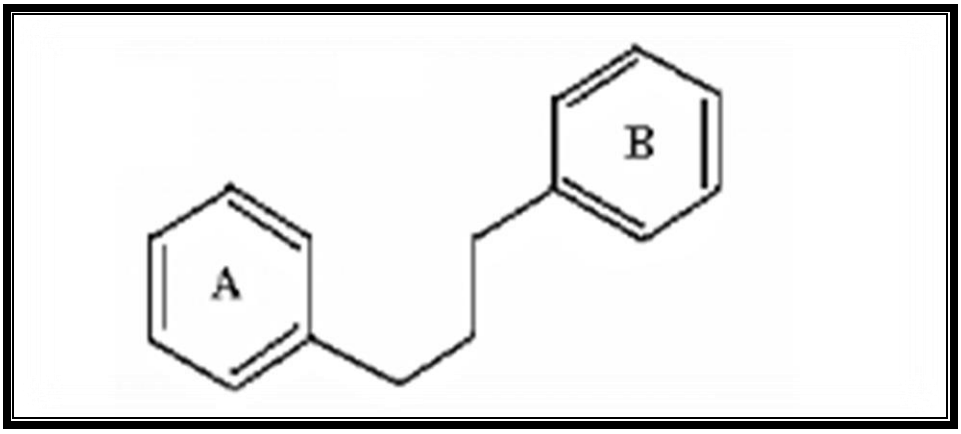


Figure 2.4 : Structure de base des flavonoïdes (Lovegrove et al., 2017).

b- Polyphénols sous forme de polymères

• Tanins

Les tanins représentent une classe très importante de polyphénols localisés dans les vacuoles (Aguilera-Carbo et al., 2008). Ce sont des composés phénoliques ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 Da et qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines (Fogliani, 2002). Sur le plan structural, on distingue les tanins hydrolysables, esters d'acide phénolique, des tanins condensés plutôt des polymères de polyhydroxyflavan-3-ols (Fogliani, 2002).

✓ **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 2.5 A) (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 tanins condensés sont des polyphénols de masse molaire élevée. Ils résultent de la polymérisation autooxydative ou enzymatique des unités de flavan-3,4-diols liées majoritairement par les liaisons C4-C8 (parfois C4-C6) des unités adjacentes, et se nomment ainsi proanthocyanidines de type B. Lorsque la condensation se produit entre les unités adjacentes par la liaison C4-C8 et par une liaison d'éther additionnelle entre C2 et C7, les proanthocyanidines sont dits de type A (Wollgast et al., 2000).Le degré de polymérisation varie considérablement de quelques molécules de flavanols à plus de 50 (figure 2.5 B) (Bennick, 2002 ; Chira et al., 2008 ; Rahim et al., 2008). 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).

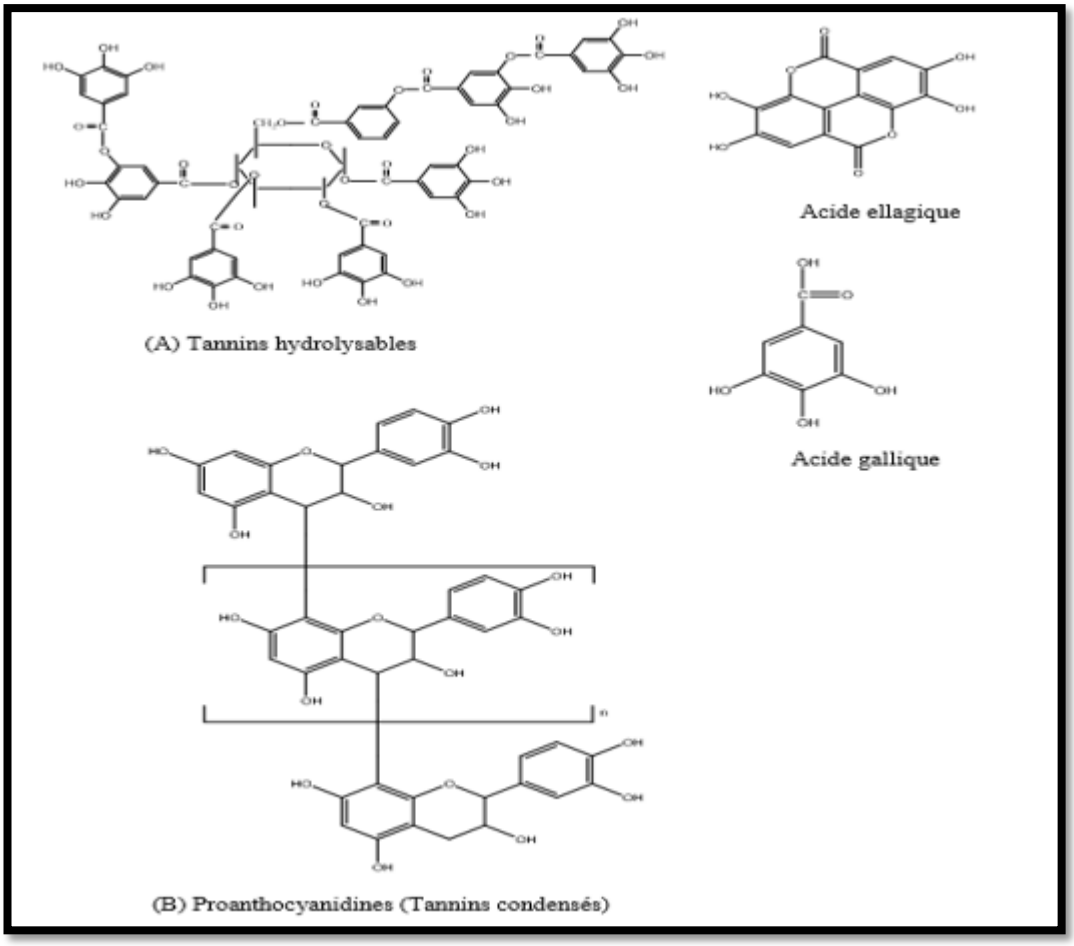


Figure 2.5: Structures chimiques des tannins ; (A) Tannins hydrolysables, (B) Tannins condensés (Naczk and Shahidi, 2004).

• Lignines

La lignine est un polymère d'unités phényle propane qui incruste les parois des cellules végétales, elle est responsable de la dureté et la rigidité de la matière végétale (Scehovic, 1990). Les lignines jouent un rôle de barrière chez la plante contre les champignons et les attaques d'insectes (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).

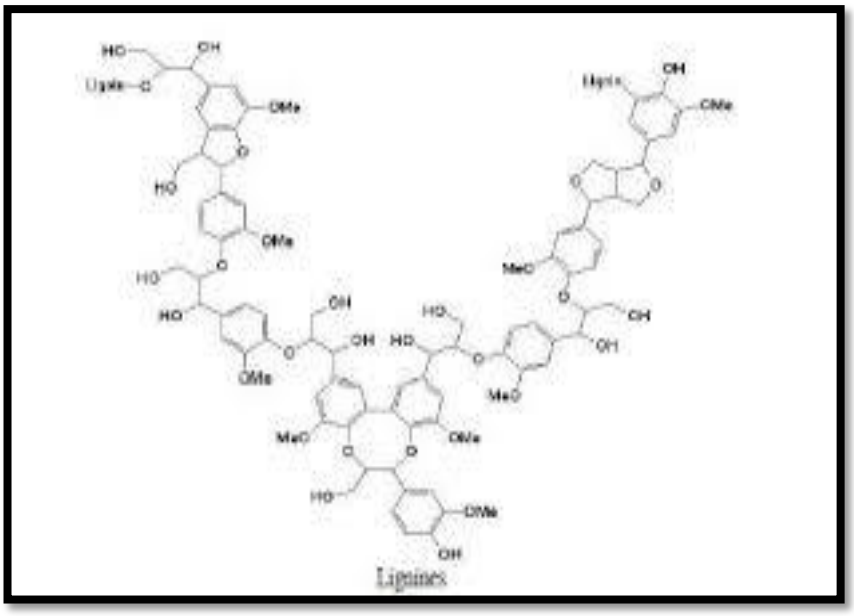


Figure 2.6 : Structures chimiques de lignine (Scalbert et Williamson, 2000).

c- Coumarines

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7- cinnamiques (Ounis, Boumaza et al., 2018).

Elles existent sous forme libre solubles dans les alcools et dans les solvants organiques ou les solvants chlorés ou encore liées à des sucres (hétérosides) qui sont plus ou moins solubles dans l'eau (Bruneton, 1999). La coumarine et ses dérivés ont des actions phyto biologiques (Hostettmann, 1992) telles que bactériostatiques et anti fongiques (Rufini et Sampaolo, 1977). Ils ont un effet antioedémateux (Hoult et Paya, 1996).

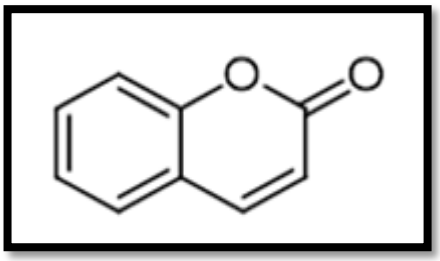


Figure 2.7 : Structure d'une molécule de coumarine (Cowan, 1999).

d- Les stilbenes

Les stilbenes font partie d'un groupe très vaste des polyphénols. Ils sont majoritairement présents dans toutes les sources végétales. Ils sont composés d'une structure qui est composé de deux cycles aromatiques, les stilbenes sont caractérisés par deux formes

isomères qui ont des propriétés chimiques et biologiques différentes. Ces derniers jouent un rôle de défense constitutive et inductible (activités antimicrobiennes).Les stilbenes possèdent un large spectre d'effets pharmacologiques et thérapeutiques. (Aziza et Hamida, 2018).

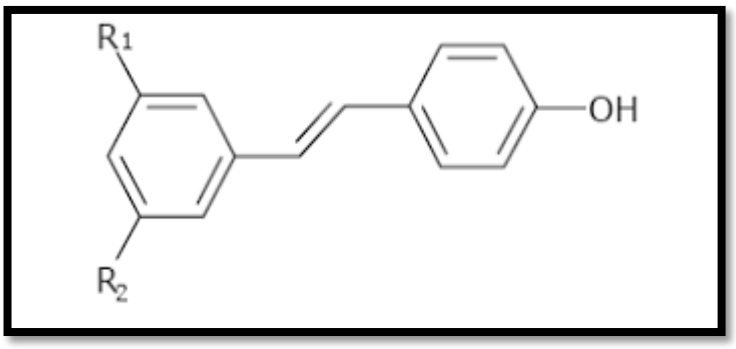


Figure 2.8 : Structure chimique de stilbène (Perret, 2001).

II.3.2. Les alcaloïdes

Le terme alcaloïde a été introduit au début du XIXème siècle par Meisner (Bruneton, 1999). Ce sont des substances organiques d'origine naturelle (le plus souvent végétale), renfermant de l'azote, généralement incorporé dans un système hétérocyclique. La plupart ont des propriétés basiques. Il existe plusieurs types d'alcaloïdes, certains ont de structures très simples, d'autres de structures beaucoup plus complexes.

D'une manière générale, les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques très variées ainsi que par leur toxicité(Pelletier, 1983).

Chez de nombreuses plantes, les alcaloïdes se localisent dans les pièces florales, les fruits ou les graines, ces substances sont trouvées concentrées dans les vacuoles (Krief, 2003). Ce sont des composés relativement stables qui sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques (Mauro, 2006).

II.3.2.1. Biosynthèse

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

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

II.3.2.2. Classification des alcaloïdes

a- Selon l'origine biosynthétique : On distingue trois types d'alcaloïdes :

✓ Alcaloïdes vrais

Représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes, sont toxiques et disposent d'un large spectre d'activités biologiques importantes. Ils dérivent d'acides aminés et comportent un atome d'azote dans un système hétérocyclique(Bruneton, 1999).

✓ Pseudo-alcaloïdes

Présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés (Bruneton, 1999).

✓ Proto-alcaloïdes

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

b- Selon leur composition chimique et structure moléculaire

Les alcaloïdes peuvent être divisés en plusieurs groupes.

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

✓ **Alcaloïdes isoquinoléiques :** morphine, éthylmorphine, codéine et Papavérine contenues dans l'opium du pavot et des alcaloïdes indoliques : ergométrine, ergotamine et ergotoxine de l'ergot des céréales (Gonzalez et al., 1984).

✓ **Alcaloïdes quinoléiques :** se trouvent dans les écorces de Cinchona (Donatien, 2008).

✓ **Alcaloïdes pyridiques et pipéridiques :** parexemple : ricinine chez ricin.

✓ **Alcaloïdes dérivés du tropane :** comme scopolamine et atropine chez la belladone.

✓ **Alcaloïdes stéroïdes :** racine de vératre, douce-amère ou aconite (aconitine) par exemple (Gonzalez et al., 1984).

II.3.2.3. Fonctions et propriétés

II.3.2.3.1. Propriétés physico-chimiques

-Les alcaloïdes sont peu solubles dans l'eau

-Caractérisés par une forte solubilité dans l'alcool

-Peuvent donner des colorations spécifiques avec certains réactifs (réactifs de Mayer, de Dragendorff, deWasicky, de Bouchardat) (Yahaioui and Silat, 2018)

-Sont des composés de métabolisme secondaire de masse moléculaire faible et de fonction basique.

-Sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène (Guenfis, 2018)

II.3.2.3.2. Propriétés pharmacologiques

Les alcaloïdes exercent généralement leur activités pharmacologiques sur les mammifères comme l'Homme, ils sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments, comme poisons, Les alcaloïdes présentent en fréquemment des propriétés pharmacologiques, notamment au niveau de système nerveux central, du système nerveux autonome et du Système cardiovasculaire (Guenfis, 2018).

II.3.3. Terpénoïdes

II.3.3.1. Définition

Le terme terpène inventé par Kekulé, vient de leur origine historique de l'arbre de terebinth : « PistaciaTerebinthus » (Ayad, 2008). Le terme de terpénoïde est attribué à tous les composés possédant une structure moléculaire construite d'un monomère à 5 carbones appelé isoprène, ces composés sont majoritairement d'origine végétale (Malecky, 2005). Synthétisés par les plantes, organismes marins, les champignons et même les animaux (Benaissa, 2011). L'exploitation de ces composés s'effectuait sous forme d'huiles extraites de plantes (huiles essentielles) par le moyen de la distillation (Malecky, 2005).

II.3.3.2. Structure

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

squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.) (Malecky, 2005 ; Benaissa, 2011).

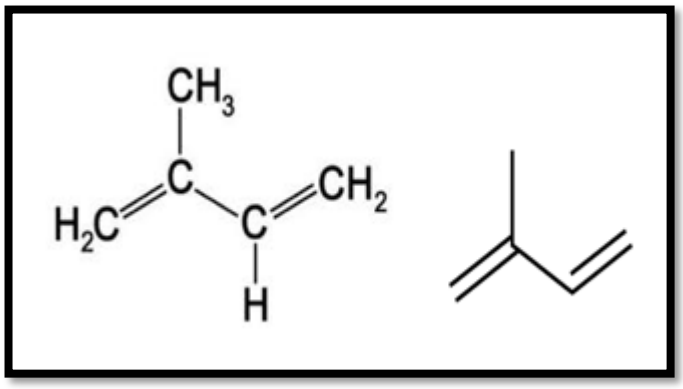


Figure 2.9 : Structure de base de l'isoprène (Khenaka, 2011).

II.3.3.3. Biosynthèse

L'unité isoprénique est synthétisée à partir de la condensation de 3 molécules d'acide acétique le précurseur universel de ce processus et l'acide mévalonique. L'acide acétique subit une phosphorylation suivi d'une décarboxylation aboutit à la formation des terpenoides (Haib, 2011).

II.3.3.4. Classification

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

Tableau 2.3 : Quelques exemples des différents types de terpenoïdes (Belbache, 2003).

N	Squelette carboné	Type de terpenoïdes	Exemple de molécule
2	C10	Monoterpéne	Nérol, citronnelle, huiles essentielles
3	C15	Sesquiterpène	β-Cadinène
4	C20	Diterpéne	Sclaréol, phytol
6	C30	Triterpéne	Lanostérol
8	C40	Tetraterpéne	Caroténoïdes
> 8	>40	Polyterpéne	Caoutchouc

a-Monoterpènes

Ce sont des produits généralement odorants obtenus par entrainement à la vapeur d'eau des végétaux entiers ou d'organes de végétaux , Ils constituent la majeure partie des huiles essentielles, Ils comportent dix (10) atomes de carbones et sont issus de la condensation de deux unités isoprène (Alain, 2015).

b-Sesquiterpènes

Ils se trouvent sous forme d'hydrocarbures comme le β-Cadinène. Les sesquiterpènes forment une série de composés renfermant 15 atomes de carbones (Yahiaoui and Silat, 2018).

c-Diterpenes

Sont des substances de 20 atomes de carbone leur formule moléculaire $C_{20}H_{32,}$ ils ont 4 unités isoprènes, ils renferment des activités biologiques significative (activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anticancéreuse et antifongique) l'exemple le plus commun des diterpenes c'est les vitamines (Perveen, 2018).

d-Triterpénoides et stéroides

Les triterpènes sont des composés en C_{30} issus de la cyclisation de l'époxysqualène ou du scalène (Krief., 2003). Les stéroïdes sont dérivés de triterpènestétracycliques et possèdent un squelette cyclopentaperhydro phénanthrène. Beaucoup de stérols se produisent sous forme de glycosides caractérisés par les saponines stéroïdiennes (Hanson, 2003).

e-Tétraterpènes

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

f- Polyterpènes

En général, les polyterpènes ou polyisoprènes se composent de plus de 8 unités d'isoprène (plus de C_{40}). Ces terpènes se trouvent souvent sous deux formes isomèriques cis- et trans, Le cis-polyisoprène se trouve dans le caoutchouc indien (Malecky, 2005). Ils sont des macromolécules de poids moléculaire très élevé, Sur le plan thérapeutique, ces composés n'ont pas des activités biologiques discutées (Ayad, 2008).

II.3.3.5. Fonctions et propriétés

Les plantes produisent une grande variété de produits formés à base d'isoprène, certains d'entre eux sont des métabolites primaires comme des stéroïdes et des groupes prosthétiques des enzymes et vitamines en chaînes latérales (vitamine K, E). Certains sont des hormones végétales comme l'acide abscisique ou les gibbérellines (di terpènes). Cependant la majorité des composés terpéniques sont des métabolites secondaires sans fonction directe dans la croissance des végétaux. Ces métabolites sont responsables de la couleur et l'odeur des plantes et des épices (piments, curies), certains d'entre eux ont des fonctions écologiques importantes mais la majorité (les mono- et sesquiterpènes) possèdent une activité anti microbienne contre un large éventail des bactéries et champignons. Par ailleurs, un certain nombre de terpènes ont des propriétés toxiques, répulsives ou attractives pour d'autres organismes, ce qui a conduit à la conviction qu'ils ont des rôles écologiques dans les interactions antagonistes ou mutualistes entre les plantes et plantes-animaux (Langenheim, 1994). Ici nous avons évoqué deux rôles principaux des terpénoïdes connus dans la nature :

- ✓ **Défense contre les antagonistes**

Certains terpènes sont toxiques vis-à-vis de certains insectes (Justicia et al., 2005) ou nématodes (Lorimer et al., 1996), cette action pouvant s'effectuer par une action directe sur les récepteurs du goût (Messchendorp et al., 2000). Chez les herbivores, les effets aversifs des terpènes peuvent être médiés par différentes voies. D'abord l'action des terpènes peut s'exercer comme dans le cas des insectes par des flaveurs indésirables qui conduisent à une aversion contre les plantes contenant ces substances. Par ailleurs, les terpènes peuvent influencer l'ingestion indirectement par des voies post-ingestives comme la réduction de la digestion (Robbins et al., 1987), la toxicité générale sur l'animal et l'acidose sanguine (Foley, 1992).

- ✓ **Messages pour les symbiotes**

Dans les écosystèmes naturels, les terpènes peuvent avoir un rôle déterminant en servant de moyens de communication entre les espèces. La plupart des monoterpènes et sesquiterpenes sont des bons vecteurs d'information à distance parce que ces molécules lipophiles ont un faible poids moléculaire et une pression de vapeur elevée à la température ordinaire. En plus une grande variabilité structurelle permet d'avoir un message plus précis. La plupart des communications médiées par les terpènes sont des interactions entre plantes et insectes (Dudareva et al., 2006). De plus les terpènes (phéromones) ont

également des fonctions importantes au sein des espèces animales comme les insectes pour lesquels ils représentent des indicateurs olfactifs servant par exemple à la reproduction.

Les plantes sont immobiles pour la plupart de leur cycle de vie et font souvent appel à d'autres organismes pour disperser le pollen et les graines. A cet effet, des composés volatils libérés des fleurs et des fruits (Knudsen et al., 2006) servent à attirer les pollinisateurs. Depuis l'antiquité, certaines caractéristiques et fonctions biologiques de terpènes étaient connues pour l'homme et celles-ci ont été utilisées indirectement par l'exploitation des épices en tant que parfums et conservateurs (Bauer et al., 2001). Plus tard, la recherche sur les composés actifs a abouti à l'extraction des terpènes notamment volatils à partir des plantes. Ces extraits végétaux dont les composants majeurs sont les mono- et sesquiterpènes s'appellent les huiles essentielles.

Chapitre III

Activités biologiques étudiées

III.1. Activité antioxydante

III.1.1. Stress oxydant

Dans le système biologique, l'oxygène est normalement transformé en molécules d'eau au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale. Cette réaction est cruciale puisqu'elle apporte à la cellule la majorité d'énergie nécessaire (sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) pour assurer ses multiples fonctions (Favier, 2003).

Le stress oxydant se définit comme étant un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants (espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les systèmes de défense (antioxydants), en faveur des premiers avec comme conséquence l'apparition de dégâts irréversibles pour la cellule (Favier, 1997).

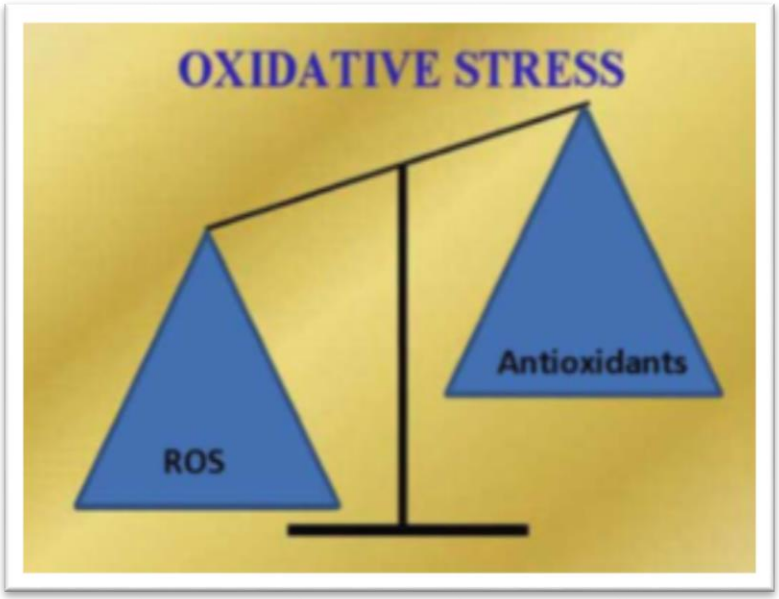


Figure 3.1 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et espèces oxygénées actives (Bentafar and Chaib, 2016). EOA : Espèces oxygénées actives

III.1.1.1. Les marqueurs biologiques de stress oxydant

La production excessive des radicaux libres provoque des lésions directes de molécules biologiques : oxydation de l'ADN, des protéines, de lipides et des glucides, mais aussi des

lésions secondaires dues au caractère cytotoxique et mutagène des métabolites libérés notamment lors de l'oxydation des lipides. La mise en évidence des dérivés de l'oxydation de ces différents substrats seront donc des marqueurs de la présence d'un stress oxydant (Cano, 2007).

III.1.2. 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 (HouéeLevin et al., 2005 ; Koechlin-Ramonatxo, 2006).

Les principales espèces réactives de l'oxygène sont : le radical superoxyde (O_2^-), le radical hydroxyle (OH), le monoxyde d'azote (NO), mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, Roberts et al., 2010).

III.1.2.1. Source des radicaux libres

Les principales espèces réactives oxydantes sont dérivées de l'oxygène et de l'azote, et peuvent être produites par le métabolisme cellulaire normal tout comme pathologique ou par exposition environnementale (ex : tabagisme, ozone, température, etc…) (Bloomer, 2008). Les radicaux libres sont aussi formés par une cascade de réaction chimique dans le corps (phosphorylation, réduction).

III.1.2.1.1. Source endogène

- **Chaine mitochondriale de transport d'électron**

Nécessite l'utilisation de 4 complexes, l'oxygène est convertit par le superoxydedismutase dans la matrice mitochondriale en H_2O_2, ce dernier est réduit en H_2O et O_2, le H_2O_2 réagit avec les métaux pour former le radical hydroxyle OH (Keven et al., 2005).

- **Xanthine oxydase**

C’est une enzyme impliquée dans le métabolisme des purines qui est la principale source de stress oxydant (Wulf, 2002), cette forme est générée par la modification post traductionnelle de la XDH. Elle est incapable d'utiliser le NAD+ comme accepteur d’électrons, elle nécessite l’utilisation de l’oxygène moléculaire comme accepteur d’électrons, produisant ainsi l’anion superoxyde et le peroxyde d’hydrogène (Kether, 2019). La XO catalyse aussi la réduction du nitrate en nitrite et NO• (Terpolilli et al., 2012).

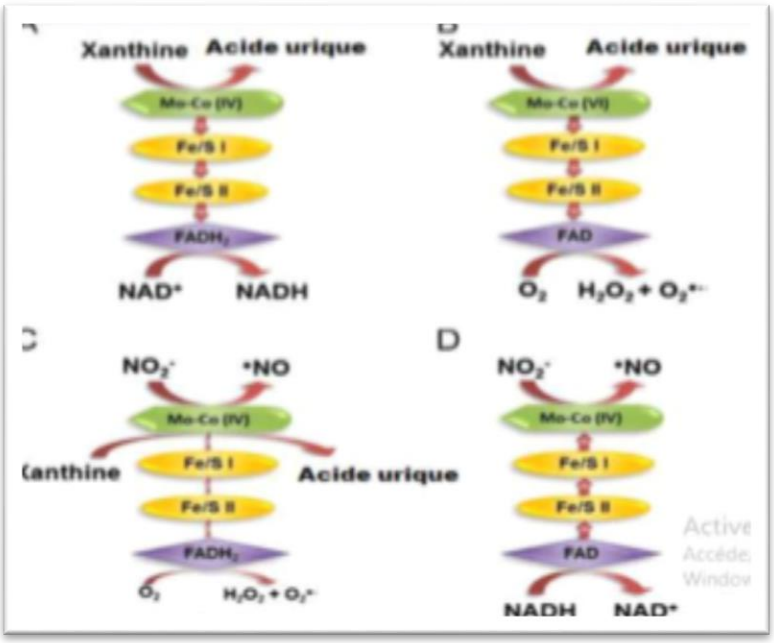


Figure 3.2 : La réaction catalysée par XOR (Cantu-Medellin et Kelley, 2013).

III.1.2.1.2. Les sources exogènes

Le tabagisme, les radiations UV, les médicaments, les réactifs chimiques, les solvants industriels et la pollution (Pastre, 2005) sont les principales sources exogènes de stress oxydant.

Tableau 3.1 : Les principales sources endogène et exogène de stress oxydant (mesmoudi, 2014).

Source endogène	**Source exogène**
Mitochondrie	ultraviolet
peroxysomes	Radiation ionisante
Lip oxygénases	Agent chimiothérapie
NADPH oxydase	Toxine environnement
Cytochrome p450	Cytokines inflammatoires

III.1.2.2. Origine des formes réactives de l'oxygène chez les plantes

La production de formes réactives de l'oxygène est une réponse cellulaire commune à de nombreux stress chez les végétaux qui se localise au niveau de différentes sources, notamment, qu'il s'agisse d'un stress d'origine biotique ou abiotique (Dat et al., 2000 ; Van Breusegem, 2006).

Chez les plantes, il existe plusieurs sources cellulaires d'espèces réactives de l'oxygène localisées à divers endroits de la cellule et qui sont produits de façon permanente durant le métabolisme normal et les périodes de stress, ces sources incluent (figure3.3**)** :

- Les chaines de transport d'électron(CTE) des chloroplastes.
- Les chaines de transport d'électron(CTE) des mitochondries.
- La photo respiration dans les peroxysomes.
- Les molécules photo sensibilatrices comme la chlorophylle.

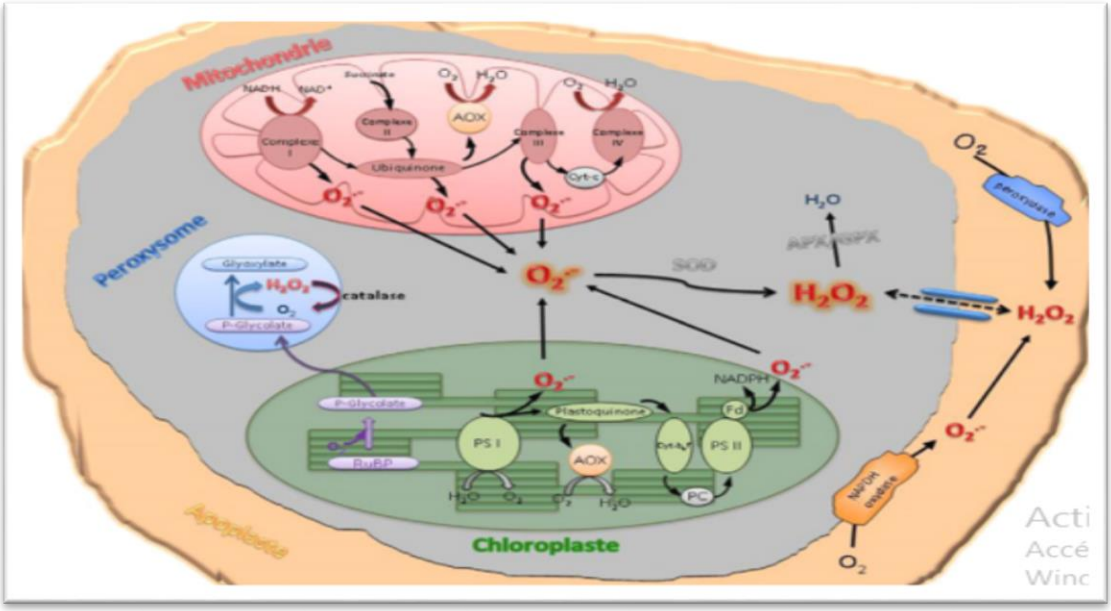


Figure 3.3 : Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule végétale (Bolwell,2002).

III.1.2.3. Nature des radicaux libres

III.1.2.3.1. Espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

L'oxygène doit sa grande réactivité à sa structure particulière. En effet, il possède deux électrons célibataires non appariés sur sa couche orbitale externe. Cette molécule est essentielle au bon Fonctionnement de l'organisme (Bouhadjra, 2011).

a- Ion superoxyde : $-O_2^{\bullet}$

L'ion super oxyde $-O_2$ est un dérivé très réactif de l'oxygène, relativement stable, il n'est pas très toxique pour l'organisme, mais il est à l'origine de cascades de réactions conduisant à la production de molécules très nocives (Bouhadjra ,2011).

b-Radical libre hydroxyle : $(OH)^{\bullet}$

Le radical libre hydroxyle $(OH)^{\bullet}$ est très réactif. Il peut réagir avec de nombreuses molécules comme l'ADN, les glucides, les nucléotides, les protéines et être à l'origine de lésions de nécrose. C'est un dérivé de l'ion super oxyde (Bouhadjra , 2011).

c- Oxygène singulet : $^1O_2$

Lorsque l'énergie est apportée à l'oxygène, celui-ci passe à l'état singulet qui représente la forme activée. C'est une forme très énergétique de grande réactivité qui peut oxyder de nombreuses molécules. Il est formé à partir de l'ion superoxyde (Bouhadjra ,2011).

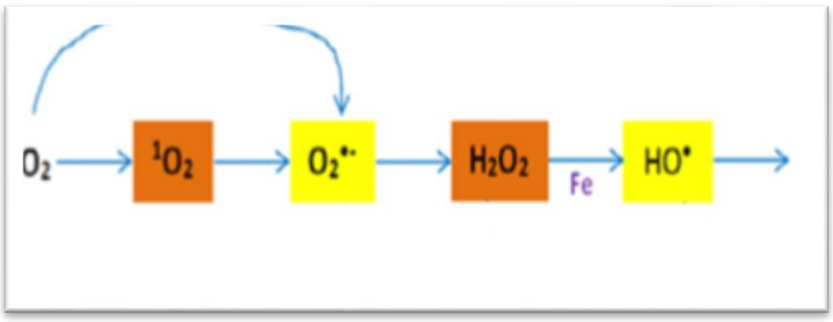


Figure 3.4 : Cascade de production des principales ERO : en orange ERO non radicalaires et en jaune ERO radicalaires (Favier, 1997).

III.1.2.3.2. Espèces libres non oxygénées

Les espèces libres non oxygénées sont les produits des réactions de certaines molécules avec les espèces réactives dérivées de l'oxygène. Ils peuvent à leur tour réagir avec d'autres molécules et être à l'origine de la multiplication des réactions d'oxydation et de la propagation de dommages oxydatifs. Nous citerons, par exemple les acides gras peroxydés qui sont les résultats de l'action des espèces oxygénées sur les membranes biologiques. Les fractions protéiques, les acides aminés et les acides nucléiques peuvent aussi réagir avec les ERO générant des molécules réactives et nocives (Bouhadjra, 2011).

III.1.2.4. Rôle des radicaux libres chez les plantes

Les ERO sont continuellement produites chez les plantes selon le métabolisme aérobie. En fonction de leur nature, certaines, très toxiques sont rapidement détoxifiées par divers mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques. Alors que les végétaux génèrent de processus pour combattre la croissance des ERO produites dans les conditions de stress abiotique (chocs thermiques, irradiation excessive, couche d'ozone, sécheresse, salinité…), dans d'autres circonstances, ils peuvent tout aussi engendrer délibérément des ERO au titre de molécules signal afin de contrôler de nombreux phénomènes comme la défense contre des pathogènes (stress biotique), la mort cellulaire programmée (apoptose) et le comportement stomatique (Apel et Hirt, 2004 ; Smirnoff, 2005).

III.1.3. Les antioxydants

Un antioxydant par définition est toute substance capable de retarder ou de prévenir de manière significative l'oxydation du substrat par neutralisation ou réduction des dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et de maintenir un niveau non cytotoxique de ROS, tant que la quantité d'antioxydants disponibles est suffisante les radicaux libres ne constituent pas un réel problème pour l'organisme, mais en cas de production excessive de radicaux libres non gérables par l'organisme, toutes les structures biologiques deviennent la cible de lésions (Basharat, 2015). Il existe plusieurs mécanismes d'antioxydation, à savoir des mécanismes endogènes et exogènes (nutritionnels) qui ont les mêmes effets bénéfiques contre les oxydants.

Les antioxydants les plus connus sont le β-carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol, la quercétine, la rutine et le picnogénol. La plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles (OH) et superoxydes ($O_2^{\bullet}$) (Antolovich et al., 2002 ; Bartosz, 2003 ; Burda et Oleszek, 2001 ; RiceEvans et al,. 1995).

III.1.3.1. Classification des antioxydants

III.1.3.1.1. Systèmes d'antioxydants endogènes

Ce sont des molécules qui sont produites par les cellules de notre organisme, on peut distinguer :

✓ **Système enzymatique**

Les principaux systèmes enzymatiques antioxydants les plus efficaces chez les mammifères ainsi que chez les plantes sont au nombre de trois et de fonctionnement complémentaires (Figure3.5**)**. Elles réagissent très rapidement avec les espèces réactives afin de les neutraliser (Sharma et al., 2012 ; Boubekri, 2014).

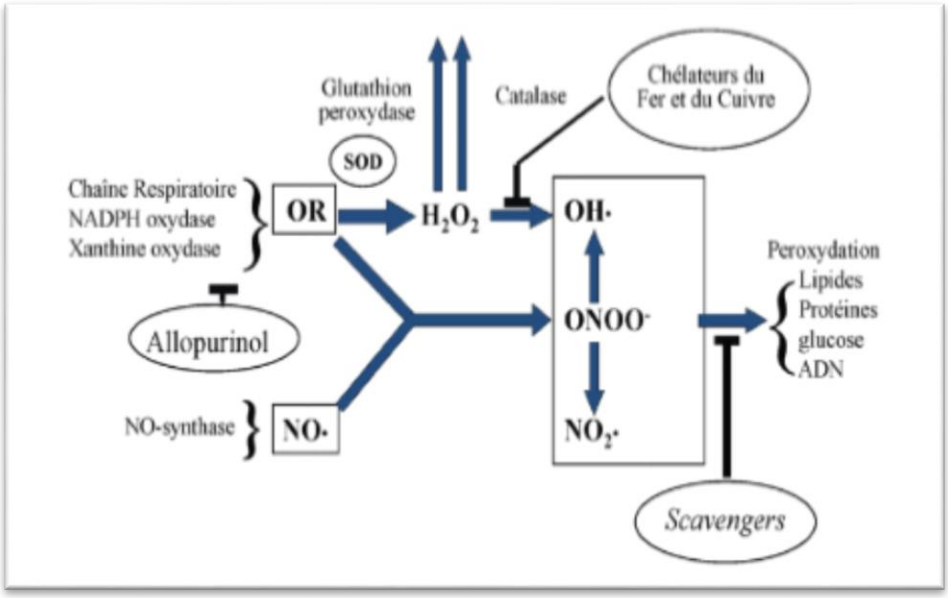


Figure 3.5 : Action des antioxydants au cours du métabolisme des espèces réactives

(Leverve,2009)

a. La superoxydedismutase (SOD)

Elle catalyse la dismutation des ions superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire par la réaction suivante (Papa et al., 2014; Ighodaro and Akinloye, 2018).

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

b. La catalase

Elle transforme le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Rousselot and Collin 2010 ; Ighodaro and Akinloye 2018).

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2\ H_2O + O_2$$

c. La glutathion peroxydase (GPX)

Elle détoxifie le peroxyde d'hydrogène et d'autres hydroperoxydes d'origine lipidique selon les deux réactions suivantes (Lobo et al., 2010 ; Jacquot 2013 ; Lonn et al., 2012).

$$-ROOH + 2GSH \rightarrow ROH + H2O + GSSH \quad \text{(reaction 1)}$$

-H_2O_2 + 2 GSH $\rightarrow$ 2H_2O + GSSG (reaction 2) dont :

ROOH : Peroxyde organique

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

Système non enzymatique

a-Glutathion (GSH/GSSG)

-Il intervient dans la détoxication des xénobiotiques,

-Il se débarrasse des toxines et des polluants indésirables (métaux lourds, médicaments, solvants et pesticides),

-Il protège les lipides, les protéines et les acides nucléiques contre l'oxydation (Beaudeux and Geneviève, 2011).

b-Acide lipoïque

-Il piège des E.R.O,

-Il régénère des antioxydants endogènes et exogènes tels que le glutathion, la vitamine C et E,

-Il chélate les des métaux de transition tels que le fer et le cuivre. (Valkoetal., 2006 ; Kurutas 2016).

c-Bilirubine

-Elle est capable de piéger les ROO• et l'oxygène singulet.

-Ainsi, elle protège l'albumine et les acides gras liés à l'albumine vis-à-vis les attaques radicalaires. (Haleng et al., 2007 ; Kurutas, 2016).

d-Acide urique

-Il piège le HO•, ROO•, HOCl• et $^1O_2$,

-Il peut également régénérer d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E (David ,2015 ; Kurutas, 2016).

III.1.3.1.2. Systèmes antioxydants exogènes

En plus des substances propres à l'organisme, l'alimentation et les plantes sont également d'importantes sources d'antioxydants. L'organisme peut tirer profit de nombreux

antioxydants exogènes naturels présents dans son alimentation (Pham-huyet al., 2008 ; Kalam et al., 2012).

Bien que non indispensables à la vie, ces substances jouent un rôle majeur dans la lutte contre le stress oxydant. Les plus importantes parmi eux sont :

Les vitamines (E et C), les caroténoïdes, les polyphénols les acides gras (oméga-3 et oméga-6) ainsi que des traces des métaux (sélénium, manganèse, et zinc). Contrairement aux antioxydants enzymatiques, ces substances ne permettent l'élimination que d'un seul radical libre à la fois. Pour pouvoir fonctionner à nouveau, ces antioxydants doivent être donc régénérés par d'autres systèmes (Pham-Huy et al., 2008).

III.1.3.1.3. Les antioxydants de synthèse

Le butylhydroxyanisole (BHA), le butylhydroxytoluène (BHT), les esters de l'acide gallique (gallate de propyle, gallate d'octyle et gallate de dodécyle) sont des antioxydants synthétiques lipophiles. Le BHA et le BHT sont les plus fréquemment utilisés. Ceux-ci sont principalement employés comme conservateurs, à faible concentration, dans les produits cosmétiques et alimentaires afin de protéger les lipides du rancissement. Néanmoins, leur utilisation reste controversée, les produits de dégradation du BHA et du BHT étant suspectés d'être cancérogènes (Ito et al., 1983 ; Chen et al., 1992). De plus, dans le domaine alimentaire, des réactions d'hypersensibilité ont été recensées pour les gallates, le BHA et le BHT.

Enfin, des réactions allergiques (de type urticaire) ont été observées chez certains sujets sensibles au BHA et BHT (Schrader and Cooke, 2000 ; Baur et al., 2001)

Parmi les polyphénols de synthèse, on peut citer à titre d'exemple : la 3,3′, 5,5′-Tetra-t-butyl-biphenyl4, 4′-diol (Figure 3.6) qui a montrer un effet protecteur des cellules neuronales (Duong et al., 2008).

Cependant, il a été montré que ces antioxydants de synthèse pouvaient être toxiques (Yu et al., 2000 ; Ahmad et al., 2017).

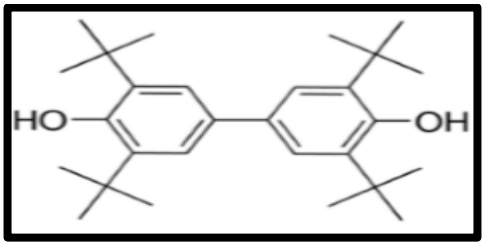


Figure 3.6 : Structure chimique d'un polyphénol de synthèse (3,3′, 5,5′-Tetra-t-butylbiphenyl4, 4′-diol)

III.2. Activité antifongique

III.2.1. Les antifongiques

Les antifongiques sont des substances (naturelles) capables de détruire sélectivement ou non les différents champignons rencontrés en mycologie. Ils s'administrent par voie locale ou générale (O'fel, 1982).

III.2.2. Mécanismes d'action antifongiques

- **Inhibition de la formation de paroi cellulaire**

La paroi cellulaire fongique est principalement constituée de β-glucanes. Si la synthèse de ces composés est inhibée, l'intégrité de la paroi cellulaire va se perturber (Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009).

- **Rupture de la membrane cellulaire**

Les ergostérols sont essentiels pour la membrane cellulaire. Si ces stérols sont liés par des médicaments antifongiques, ou si leur synthèse est inhibée par des inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol, l'intégrité de la membrane cellulaire va se rompre. La membrane devient alors étanche. **(**Walker et White, 2011 ; Clanahan, 2009).

- **Dysfonctionnement de la mitochondrie fongique**

L'inhibition du transport d'électrons mitochondrial entraînera une réduction du potentiel membranaire mitochondrial. L'inhibition peut se produire via l'inhibition des pompes à protons dans la chaîne respiratoire, entraînant une réduction de la production d'ATP et la mort cellulaire subséquente. (Walker et White, 2011 ; Kim et al. 2013).

- **Inhibition de la division cellulaire**

L'inhibition de la division cellulaire peut se produire par l'inhibition de la polymérisation des microtubules, inhibant ainsi la formation du fuseau mitotique (Walker et White, 2011 ; Mc Clanahan, 2009).

- **Inhibition de la synthèse ARN / ADN ou synthèse protéique**

Si l'agent antifongique pénètre dans la cellule, par exemple via un transport actif sur des ATPases, et interfère avec l'ARN, il peut provoquer une synthèse d'ARN défectueuse et une inhibition de la transcription de l'ADN. L'inhibition de la synthèse des protéines est également une cible antifongique connue **(**Clanahan, 2009).

- **Inhibition des pompes d'efflux**

Les pompes à efflux sont présentes dans toutes les cellules vivantes et leur fonction est de transporter des substances toxiques hors de la cellule (Kang et al., 2010). Ce transport inclut souvent le transport du médicament accumulé hors de la cellule fongique. La surexpression des pompes d'efflux peut conduire à une pharmaco résistance. En inhibant les pompes d'efflux, on pense que la résistance aux médicaments peut être réduite (Kang et al., 2010).

III.2.3. Relation entre l'activité antifongique et les métabolites secondaires

Différentes espèces de végétaux sont connues depuis longtemps pour leurs effets antimicrobiens. Les plantes aromatiques et médicinales (PAM) constituent une richesse naturelle très importante dont la valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur. Les propriétés médicales des plantes médicinales dépendent de la présence d'agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques.(Ouraïni et al., 2005).Les végétaux produisent des composés secondaires (terpènes, composés soufrés, alcools etc.), souvent considérés comme étant un moyen de défense de la plante contre divers organismes dépréciateurs (Aauger et al., 1999). Ces composés secondaires appelés les métabolites secondaires. Les extraits de plantes semblent être l'une des méthodes alternatives les plus efficaces de lutte contre les maladies des plantes, moins nocives pour l'homme et l'environnement. (Hanafey et Sabry, 2013).

III.3. Activité antibactérienne

III.3.1. Généralités

Les bactéries sont des micro-organismes unicellulaires classés parmi les procaryotes, car ils ne possèdent pas de membrane nucléaire. Ce caractère les distingue des autres organismes unicellulaires classés parmi les eucaryotes (champignons, algues, protozoaires).elles sont divisées en bactéries proprement dites (Bacteria) et bactéries primitives (Archaea). Toutes les bactéries rencontrées en pathologie appartiennent aux Bacteria. Les bactéries ont généralement un diamètre inférieur à 1µm. On peut les voir au microscope optique, à l'état frais ou après coloration. Leur forme peut être sphérique (cocci), en bâtonnet (bacilles), incurvée (vibrions) ou spiralée (spirochètes). Les détails de leur structure ne sont visibles qu'en microscopie électronique (Nauciel et Vildé, 2005).

III.3.2. Infections bactériennes

Les infections bactériennes sont causées par différents micro-organismes et sont la cause des maladies les plus fatales et des épidémies les plus répandues. De nombreux antibiotiques sont développés pour les traiter, cependant leur utilisation abusive est à l'origine de l'apparition de la multi résistance bactérienne. (Yala et al. 2001).

III.3.2.1. L'antibiotique

Un antibiotique est une substance antibactérienne produite par des micro-organismes (champignons et bactéries) ou de synthèse chimique capable d'inhiber la multiplication ou détruire les microorganismes. Les antibiotiques peuvent être classés selon l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. La classification des antibiotiques selon leurs mécanismes d'action est cependant la plus répandue. (Yala et al., 2001).

III.3.2.2. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent traiter les infections bactériennes par 4 modes d'action principaux (Tenover, 2006) :

a. L'interférence avec la synthèse de la paroi cellulaire : carbapénèmes, vancomycine, β lactamines.

b. L'inhibition de la synthèse des protéines microbiennes : en se liant avec la sous-unité 50S ou 30S du ribosome : macrolides, le chloramphénicol, la clindamycine, aminoglycosides, les tétracyclines ou encore avec l'enzyme bactérienne isoleucyl-ARNt synthétase : chloramphenicol, tetracyclines.

c. L'interférence avec la synthèse des acides nucléiques : en inhibant la synthèse de l'ADN ou d'ARN : fluoroquinolones, la rifampicine.

d. L'inhibition des voies métaboliques : les sulfamides, les analogues de l'acide folique.

Les cibles décrites jusqu'à présent sont la paroi, la membrane, l'acide nucléique et les ribosomes des micro-organismes que la (figure 3.7) met bien en évidence.

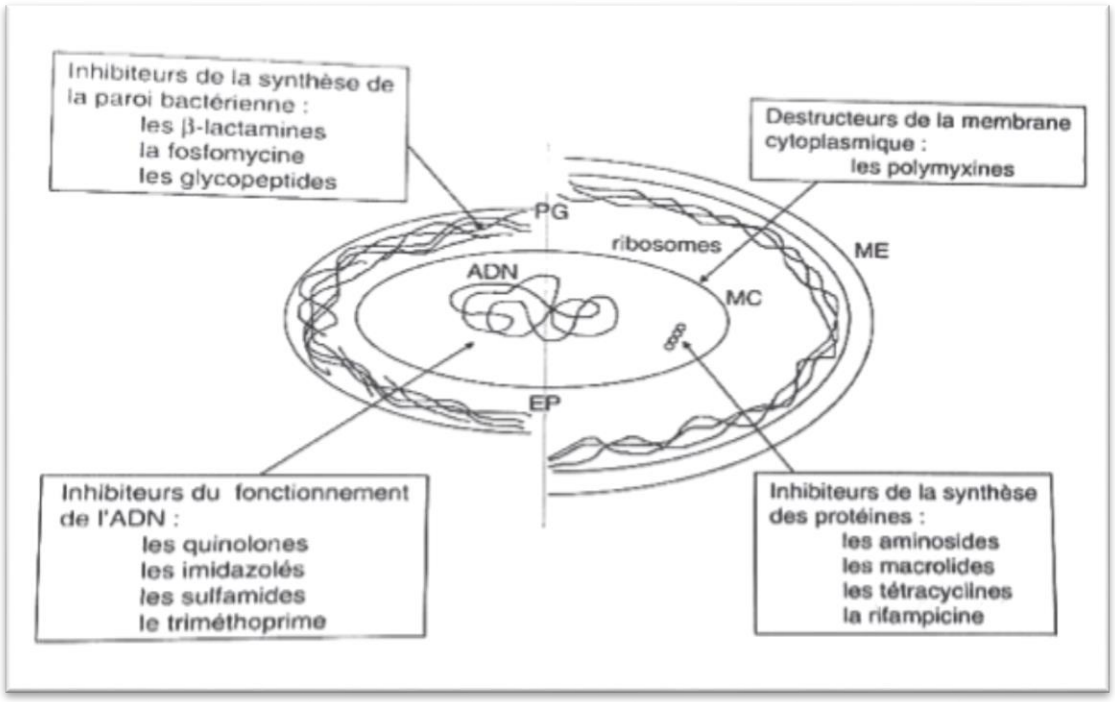


Figure 3.7 : Schéma représentatif des mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques sur une bactérie à Gram positif (gauche) et à Gram négatif (droite). EP : espace périplasmique ; ME : membrane externe ; MC : membrane cytoplasmique ; PG : peptidoglycane (TANDÉ, 2005 in : « GAUDY et BUXERAUD, 2005 »).

III.3.3. Activité antibactérienne des polyphénols :

Les polyphénols sont reconnus par leur toxicité vis- à -vis des microorganismes (Cowan, 1999). Une contamination des végétaux par des microorganisme pathogènes entraine une forte augmentation des teneurs en composés phénoliques, ce qui correspond à la mise en place de mécanisme de défense de la plante (Macheix et al. 2006). Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhesines microbiennes, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

Le mécanisme d'action des polyphénols est sans doute très complexe, parmi les hypothèses avancées :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes ;
- Inhibition de la synthèse d'acide nucléique (Hilliard, 1995),
- Inhibition des fonctions de la membrane cytoplasmique (Tsuchiya et al. 2000)

- la séquestration du substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer
- l'inhibition du métabolismeénergétique microbien (Mila et Scalbert, 1994).

Aussi les tanins sont très connus par leurs propriétés inhibitrices des microorganismes et des enzymes grâce à leur capacité de former des complexes stables avec les protéines fongiques et virales et de les précipiter (Nguz et al. 1996).

Ils exercent une activité antibactérienne par interaction avec la membrane cellulaire qui induit un changement morphologique de la bactérie, en inhibant l'activité des protéases, des protéines de transport et des adhésines (Cowan, 1999).

Les coumarines Exercent plusieurs activités antimicrobiennes : inhibitions de la croissance des bactérie et de la germination des spores **(**Benidicte et Hooper, 1998).

Partie expérimentale

Chapitre I

Matériel et Méthodes

Notre travail consiste en une étude phytochimique des deux plantes du genre d'Eucalyptus et évaluation in vitro des activités biologiques des extraits de feuilles qui en issus.

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de biologie, département des sciences de la nature et de la vie, Faculté des sciences, Université de docteur Yahia Fares, Médea.

I.1. Présentation de la région d'étude :

La récolte des feuilles des deux espèces d'Eucalyptus a été effectuée dans la forêt de Baïnem située dans la commune d'Elhammamet (Alger, 36°45'37''N et 3°25'55''E) dont l'altitude est de 50m (Figure 1.1).

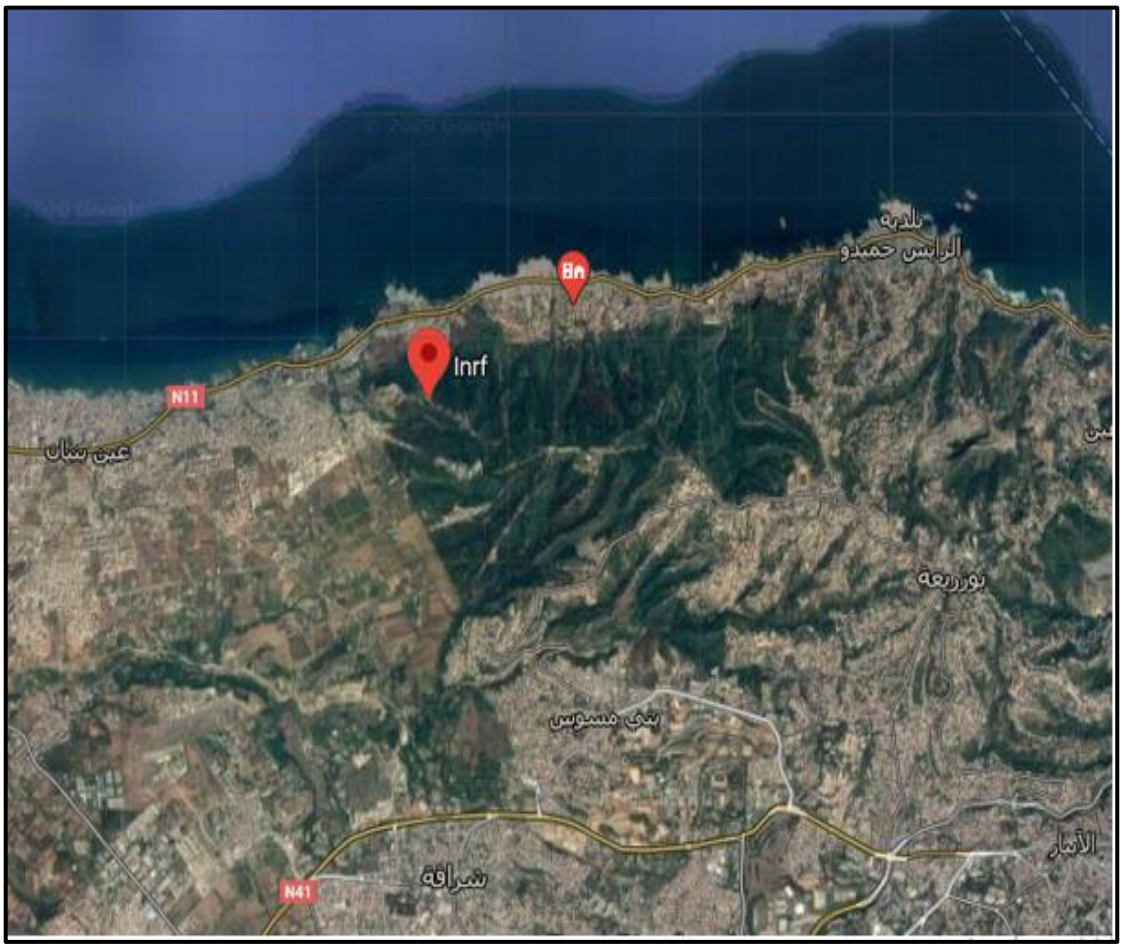


Figure 1.1 : Localisation du site de récolte (Forêt de Bainem)

I.2. Matériel utilisé

I.2.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal est constitué de deux espèces : *Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx*. La récolte des feuilles adultes des deux espèces a été pratiquée le matin durant le mois de juin pour *Eucalyptus blakelyi* et juillet pour *Eucalyptus cladocalyx* où la floraison a eu lieu. Elles sont débarrassées des impuretés puis séchées à une température ambiante pendant deux semaines dans un endroit sec et aéré à l'abri de la lumière et l'humidité afin de préserver au maximum l'intégrité de leurs molécules, puis réduites en poudre fine qui est soigneusement conservée dans un bocal en verre jusqu'à son utilisation.

L'identification botanique des espèces a été faite sur un spécimen d'herbier par l'équipe de recherche de botanique de l'Institut National de la Recherche Forestière de Bainem.

L'*Eucalyptus blakelyi* est un arbre qui pousse généralement jusqu'à 20 m de haut et dépasse rarement 50 m. Il se caractérise par une écorce blanchâtre lisse se répandant en bandes ou en flocons irréguliers.

Les feuilles juvéniles sont pétiolées, ovales à largement lancéolées, atteignant 26 cm de long et 8 cm de large, vertes, gris-vert ou bleu-vert, légèrement décolorées. Les feuilles adultes sont lancéolées, lamines de 8-30 cm de long et de 0,7-2 cm de large, vertes ou gris-vert (Figure 2.2).

L'inflorescence est axillaire renfermant 7-11 (parfois jusqu'à 13) fleurs, t de couleur blanche, avec pédoncules minces, cylindriques ou quadrangulaires, de 6-15 mm de long; les pédicelles sont minces de 5-12 mm de long, l'hypanthium est hémisphérique de 2-3 mm de long et 3-6 mm de large, l'opercule est globulaire-rostre (typique) ovoïde conique en forme de corne comme *E. tereticornis*, de 4-6 mm de long et 3-6 mm de large (Figure 2.2).

Les fruits sont hémisphériques ovoïdes, de 5-8 mm de long, présentant 3 à 4 valves, les graines sont de couleur noire.

Eucalyptus cladocalyx est un arbre à hauteur moyenne de 20 m, mais il peut atteindre jusqu'à 35 m. Le diamètre est environ 75cm. Typiquement, ces arbres sont classés comme étant de bonne forme (Florabank Retrieved). Son écorce est lisse, l'excrétion dans les grandes taches irrégulières produisant un jaune marbré coloré à l'orange, surface gris et bleu-gris (Florabank Retrieved, Figure 2.2).

Les jeunes feuilles sont opposées, elliptiques à orbiculaires, de couleur vert foncées. Les feuilles adultes sont larges lancéolées, avec une surface supérieure vert foncée, brillante et une surface inférieure terne, plus pâle, de 11-15 cm de long et 2-2,4cm de large. Les inflorescences sont axillaires, renfermant 7ou plus de fleurs, ces dernières sont de couleur blanches. Les fruits sont urcéolés, nervurés, de 9-15mm de long et 6-10 mm de large avec 3-4 valves qui sont profondément enfermés. La graine est gris-brun clair, ovoïde comprimée, souvent pointue à une extrémité, légèrement bridée et presque lisse, hémisphérique, souvent légèrement plus large que l'hypanthium (Florabank Retrieved, 2017, Figure 1.2).



Figure 1.2 : Branches feuillées et inflorescences

a.*Eucalyptus blakelyi*, **b & c.***Eucalyptus cladocalyx*

I. 2. 2. Souches microbiennes

Deux espèces fongiques redoutables des céréales ont été obtenus du laboratoire de recherche « Amélioration Intégrative des productions végétales » de l'Ecole Nationale Supérieurs Agronomique. Ces agents fongiques sont :

- ✓ Bipolaris sorokiniana isolé du blé, l'agent causal de l'helminthosporiose sur Blés
- ✓ Pyrenophora teres isolé de l'orge, l'agent causal de l'helminthosporiose sur Orge

I.2.3. Matériel et réactifs des tests biologiques

Les réactifs et produits utilisés pour le screening phytochimique et l'étude des activités biologiques (antimicrobienne et antioxydante) sont reportés en annexe (**Annexe 1**).

I.3. Méthodes adoptées

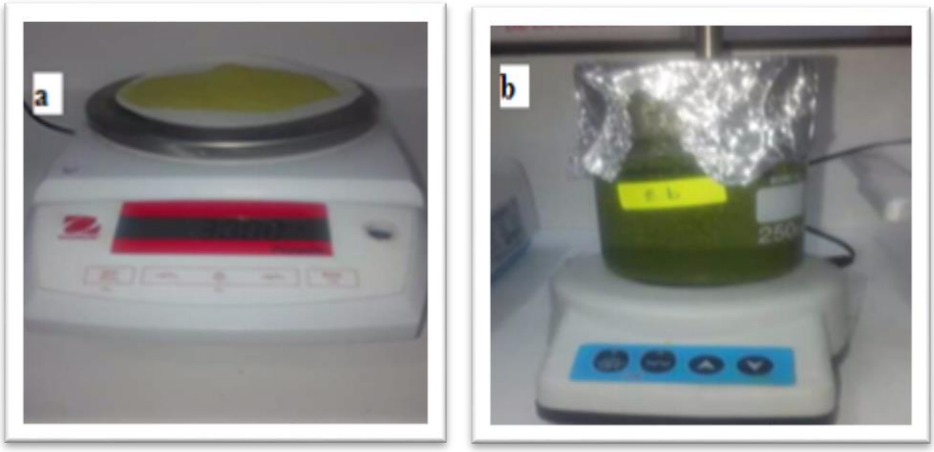
I.3.1. Préparation des extraits :

I.3.1.1. Préparation des extraits aqueux :

I.3.1.1.1. Mode opératoire :

La technique appliquée pour l'extraction est celle utilisée par (Gaston et al., 2014).

Une quantité de 30g de poudre des feuilles d'Eucalyptus est mise à macérer dans 100 ml d'eau distillée, le mélange obtenu a été régulièrement agité pendant quatre jours à température ambiante, puis filtré en utilisant du papier filtre, le filtrat récupéré est évaporé à sec sous pression réduite à 65 C° dans un évaporateur rotatif, afin d'obtenir un extrait caractérisé par une couleur brunâtre qui sera stocké à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation ultérieure (Figure 1.3).



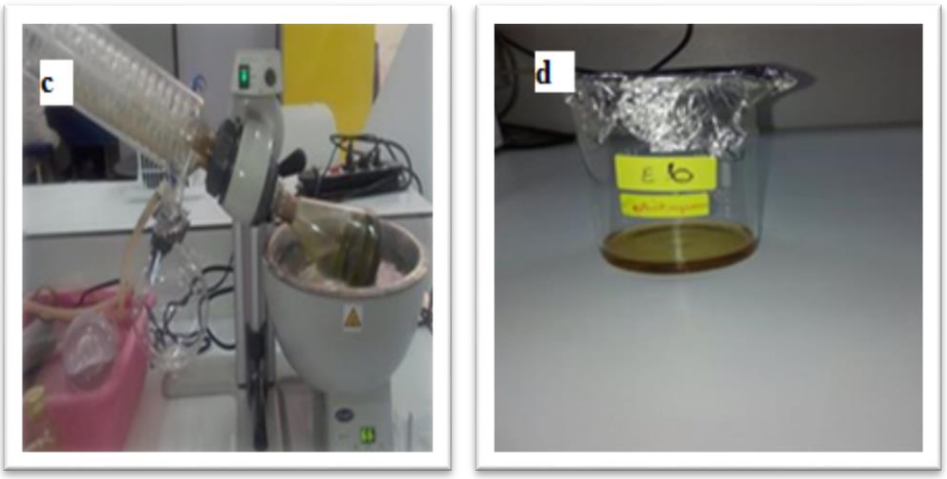


Figure 1.3 : Etapes de préparation de l'extrait aqueux

a. Pesée de 30g de poudres des feuilles. **b.** Macération dans 100 ml d'eaux pendant 4 jours. **c.** Evaporation à sec, sous pression réduite à 65 C° dans un évaporateur rotatif. **d.** Extrait aqueux préparé d'Eucalyptus blakelyi.

I.3.1.2. Préparation des extraits organiques : méthanolique, éthanoliqueetacétonique :

I.3.1.2. 1. Mode opératoire :

La technique appliquée pour l'extraction est celle utilisée par Gaston et al, 2014.

Une quantité de 30 g de poudre est mise à macérer dans 100 ml de solvant organique (méthanol, éthanol, acétone). Après 4 jours d'agitation continue à la température ambiante, la solution obtenue a été filtrée en utilisant un papier filtre, le filtrat récupéré est évaporé à sec sous pression réduite à 65 C° dans un évaporateur rotatif, pour obtenir un extrait caractérisé par une couleur noirâtre qui sera stocké par la suite dans un bocal à l'abri de la lumière jusqu'à utilisation ultérieure.

I.3.1.3. Préparation d'un décocté

I.3.1.3. 1. Mode opératoire :

100g de poudre végétale sont portés à ébullition pendant 60minutes dans 2 litres d'eau distillée. Le décocté refroidi a été filtré deux fois sur coton hydrophile et une fois sur papier filtre whatman N°1. Le filtrat obtenu ensuite séché à l'étuve à 55C°, pour donner le décocté de qui se présente sous forme d'une poudre marron très hygroscopique.

I.3.2. Détermination du rendement des extraits secs :

Le rendement en extrait aqueux et organique est le rapport entre la masse de l'extrait et la masse de la matière végétale utilisée. Il est calculé par la formule suivante :

$$R = P_e / P_p * 100$$

D'où

R : Rendement

P_e : Poids de l'extrait utilisé en g

P_p : Poids de la plante en g

I.3.3. Extraction des flavonoïdes :

I.3.3.1. Mode opératoire :

Pour extraire les flavonoïdes, nous avons suivi la méthodologie décrite par Bruneton, (1999), les flavonoïdes sont extraits à partir des feuilles sèches d'Eucalyptus à laide des alcools éthanol ou méthanol.

I.3.3.1.1. Macération et évaporation :

30g de matière végétale pulvérisée sont mis dans 100ml de méthanol et laisser macérer pendant 72h. Après la filtration, l'extrait alcoolique doit être évaporé par un rota vapeur. La température d'évaporation de méthanol est 60 C° sous vide. Le résidu sec obtenu est traité par 50ml d'eau distillée tiède pour l'obtention d'un extrait aqueux.

I.3.3.1.2. Extraction liquide – liquide :

I.3.3.1.2.1. Elimination de la chlorophylle et les lipides par l'éther de pétrole :

Verser l'extrait aqueux dans l'ampoule à décanter, et ajouter 30 ml d'éther de pétrole ou chloroforme, laisser décanter jusqu'à la formation de deux phases bien séparées. Éliminer la phase organique, refaire sur plusieurs reprises jusqu'à l'élimination totale de la fraction lipidique et chlorophyllienne puis la récupération de la phase aqueuse.

I.3.3.1.2.2. Elimination des génines libres :

Ajouter à la phase aqueuse obtenue 30ml d'éther di éthylique, et laisser décanter jusqu'à la formation de deux phases, récupérer l'hypo phase aqueuse avec élimination de l'epiphase

(éther di éthylique et quelques genines libres), refaire sur plusieurs reprises jusqu'à élimination totales des genines.

I.3.3.1.2.3. Elimination des mon osides :

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

I.3.3.1.2.4. Récupération des flavonoïdes :

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

I.3.3.1.2.5. Evaporation sous vide de butanol

Le résidu sec est obtenu par évaporation du n-butanol à 55C°.

I.3.3.2. Calcul du poids de résidu des flavonoïdes :

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

$$MF=P2-P1$$

MF : masse de l'extrait sec des flavonoïdes.

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

P1 : poids du ballon vide.

I.3.4. Extraction des tanins :

I.3.4.1. Mode opératoire :

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

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

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

Le filtrat méthanolique est soumis à une évaporation sous vide à laide d'un évaporateur rotatif à une basse température 40 à 50C°, le résidu sec contient un extrait pur de tanins

I.3.4.2. Calcul du poids de résidu destannins :

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

$$MF=P2-P1$$

MF : masse de l'extrait sec des tannins.

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

P1 : poids du ballon vides.

I.3.5. Screening phytochimique des extraits végétaux :

I.3.5.1. Détection des stérols et poly terpènes :

Les stérols et les poly terpènes ont été mis en évidence par la réaction de Liebermann.

Un aliquote de résidu est dissous à chaud dans 1ml d'anhydride acétique dans une capsule, Puis repris dans un tube à essai dans lequel sont coulés 0,5ml de H_2SO_4 concentré.

L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive.

I.3.5.2. Détection des tanins :

Les tannoïdes (tannins hydrolysables) et les tannins vrais (tannins non hydrolysables) sont des polymères de poly phénols. Ces derniers ont été mis en évidence comme suit :

A 2ml d'extrait brut sont additionnées quelques gouttes d'une solution aqueuse de $feCl_3$ à 2%.

L'apparition d'une coloration bleu noir ou vert noir indique respectivement la présence de tannoïdes ou de tannin vrais.

Les tannins vrais ont été mis en évidence par le réactif de stiasny

A un aliquote de résidu repris au MeOH puis évaporé, sont additionnés 15ml du réactif de stiasny (30% CH_2O dans HCl concentré 2/1). La formation de précipité sous forme de flocons après refroidissement, indique une réaction positive.

I.3.5.3. Détection des flavonoïdes :

Le test consiste à ajouter à 2ml de l'extrait quelques gouttes d'HCl concentré et environ 0,5g de magnésium métallique. L'apparition d'une coloration rose- orange indique une réaction positive.

I.3.5.4. Détection des saponines :

Les saponines ont été mises en évidence par le test de mousse.

Les résidus sont repris dans 5ml d'eau distillée puis introduits dans un tube à essai. Ce dernier est agité vigoureusement. La formation d'une mousse (hauteur supérieure à 1cm) stable, persistante pendant 1h indique la présence abondante de saponines.

I.3.5.5. Détection des coumarines :

Les coumarines ont été mises en évidence par la réaction sur le cycle lactonique.

Dans 2 tubes à essai sont introduits 2ml de solution éthanolique obtenue à partir de chaque résidu .Dans un des tube à essai, sont additionnés 0,5ml de NaOH à10%, puis les tubes à essai sont chauffés au bain marie jusqu'à ébullition. Après refroidissement, sont rajoutés dans chaque tube 4ml d'eau distillée. Si le liquide du tube à essai dans lequel l'on a ajouté la soude est transparent par rapport au liquide du tube à essai témoin, alors la réaction est positive. En acidifiant la solution transparente avec quelque gouttes de HCl concentré, elle perd sa coloration jaune se trouble où il se forme un précipité.

I.3.5.6. Détection des protéines :

Les protéines ont été mises en évidence dans les résidus par la réaction de biuret. A un aliquote de résidu dissout dans 2ml de NaOH aqueux à 20% dans un tube à essai sont ajoutées 2-3 gouttes d'une solution aqueuse de $CuSO_4$ à 2%. L'apparition d'une coloration violette indique une réaction positive.

I.3.5.7. Détection des alcaloïdes :

Les alcaloïdes ont été détectés avec le réactif de Dragendorff : 0,1g de résidu est repris dans 6ml d'éthanol à 60%. L'ajout de deux gouttes de réactif de Dragendorff sur la

solution alcoolique provoquait un précipité rouge-orangé ou brun- rougeâtre et indiquait un test positif.

I.3.5.8. Détection des sucres réducteurs :

Les sucres réducteurs ont été mis en évidence par le réactif de Fehling. A 5ml d'extrait brut sont additionnés 5ml de liqueur Fehling. La formation d'un précipité rouge brique après 2-3 minutes de chauffage au bain marie à 70C°, indique une réaction positive.

I.3.5.9. Détection des quinones libres :

A 2ml de chacun de nos extraits, sont ajoutées quelques gouttes de NaOH 1%.

L'apparition d'une coloration rouge ou violette indique un test positif.

I.3.5.10. Détection des anthraquinones :

Pour rechercher les anthraquinones, nous avons versé dans un tube à essai 10ml de l'extrait et 5ml de NH_4OH à 10% .Le tube était agité. La formation d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinones.

I.3.2.11. Détection des substances phénoliques :

La caractérisation des poly phénols est basée sur une réaction au chlorure ferrique ($FeCl_3$).

A 2ml de l'extrait, une goutte de solution alcoolique de chlorure ferrique à 2% est ajoutée, l'apparition d'une coloration bleu noirâtre ou verte plus ou moins foncée fut le signe de la présence des poly phénols.

I.3.6. Etude des activités biologiques des extraits utilisés :

I.3.6.1. Activité antioxydante :

I.3.6.1.1. Réduction du fer : FRAP (FerricReducingAntioxidant Power) :

I.3.6.1.1.1. Principe :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. L'activité réductrice est déterminée selon la méthode décrite par Pan et al. (2008), elle est basée sur la réaction chimique de réduction du Fe^{3+} présent dans le complexe $K_3Fe(CN)_6$ en Fe^{2+} (Figure 1.4). La réaction est révélée par le virement de couleur jaune du fer ferrique (Fe^{3+}) en couleur bleu vert du fer ferreux (Fe^{2+}). Cette capacité réductrice peut servir comme un indicateur significatif de l'activité anti-oxydante potentielle d'un composé. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700nm.

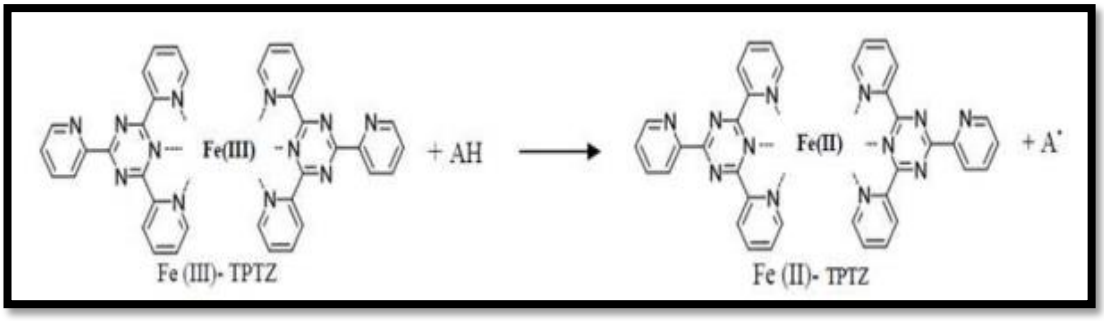


Figure 1.4 : mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe tripyridyltraizine ferrique Fe^{3+} -TPTZ et un antioxydant (AH).

I.3.6.1.1.2. Mode opératoire :

Pour le test de FRAP, Nous allons suivre la technique de karagozler et al. (2008) qui consiste à Prélever 1ml de L'extrait brut méthanolique, flavonoidique, tannique etc. à différentes concentration (solution mère 0.5mg /ml) diluées dans l'eau distillée et les mélanger avec 2.5 ml d'une solution tampon phosphate à 0,2 M (pH-6,6) et 2,5ml dune solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. Le tout est incubé à 50C° pendant 20 min, puis refroidi à la température ambiante. Un volume de 2,5ml d'acide trichloracétique à 10% est ajouté pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 tr /min pendant 10min. 2,5ml de surnageant sont ajoutés à 2,5ml d'eau distillée et 500µl d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3$, 6H2O) à 0,1%. La lecture des absorbances se fait par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 700nm. Des témoins de contrôle utilisant l'acide ascorbique sont inclus dans l'expérimentation.

I.3.6.1.1.3. Expression des résultats :

Pour explorer les résultats obtenus, la manière la plus commune utilisée par la majorité des auteurs est de tracer les graphes des absorbances obtenues en fonction des différentes concentrations utilisées. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur de l'extrait testé.

I.3.6.1.2. Piégeage par le radical libre DPPH :

I.3.6.1.2.1. Principe :

L'évaluation du pouvoir antioxydant est réalisée en utilisant le radical libre DPPH (2,2-Diphenyl 1-picrylhydrazyl) (Lee et al., 2003).

Le DPPH est pratiquement, le radical libre le plus stable, en solution (méthanol ou éthanol), il est caractérisé par une couleur violette dont l'intensité est mesurée à 515 nm

(Figure 2. 12). En présence d'un donneur d'hydrogène, le DPPH est réduit à la forme non radicalaire de couleur jaune pâle (forme d'hydrazine, Figure 1.5). Ce passage à la deuxième forme est accompagné d'une diminution de l'absorbance (DO) qui peut s'exprimer par le pourcentage de réduction de DPPH, conventionnellement une grande capacité de piégeage (réduction) des radicaux libres est considérée comme une grande activité antioxydante (Lee et al., 2004).

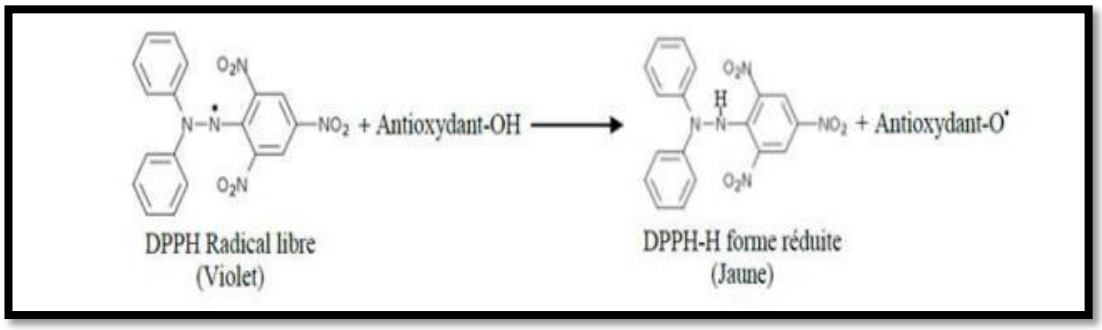


Figure 1.5 : Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH entre l'espèce radicalaire DPPH et un antioxydant.

I.3.6.1.2.2. Mode opératoire :

L'activité antioxidante a été mesurée par la méthode de DPPH (2,2-Diphenyl 1-picrylhydrazyl) selon le Protocol décrit par Sanchez-Moreno et coll., (1998). 50 µl de chaque solution des extraits testés à différentes concentrations (de 0,03125 à 1 mg/ml) ont été ajoutés à 1950 µl de solution méthanolique du DPPH (0,025g/l) fraichement préparée, Après agitation par un vortex.

Le contrôle négatif contient uniquement la solution de DPPH et le contrôle positif ou antioxydant standard « la vitamine C ou l'acideascorbique »à été préparé selon la même méthode, les échantillons et les témoins ont été incubés dans les mêmes conditions et l'absorbance a été mesurée après 30 min à 515nm contre un blanc contenant du méthanol absolu seulement, pour chaque concentration le test est répété 3 fois.

I.3.6.1.2.3. Expression des résultats :

- Calcul des pourcentages d'inhibition :

Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante :

$$I\ \% = 100 \times (A\ témoin - A\ test) / A$$

Avec :

A témoin : est l'absorbance du témoin (contenant tous les réactifs sans le produit à tester)

A test : est l'absorbance du test.

Le graphique de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration des extraits permet de déterminer les valeurs IC50.

- **Calcul des IC50 et de l'activité antiradicalaire (Scavengingactivity) :**

L'IC50 ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC50 pour Efficient concentration of 50%), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH. Les IC50 sont calculées graphiquement par les régressions linéaires ou logarithmiques des pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations de chacun des extraits testés (Bertoncelj et al., 200 ; Marxen et al., 200 ; Scherer et al., 2009 ; Fabri et a.l, 2009). Ainsi, l'activité antiradicalaire (A_{AR}) est déterminée en calculant l'inverse des valeurs des IC50 (Maisuthisakul et al., 2007) selon la formule suivante :

$$A_{AR} = 1/ IC50$$

I.3.6.2. Activité antifongique :

-Technique de contact direct

-Principe

Afin d'évaluer l'activité antifongique, nous avons adopté la méthode de contact direct, décrite par Singh et al., (2008) où les diamètres de la zone de croissance du mycélium sont mesurés.

Mise en œuvre pratique

Les extraits méthanoliques des deux espèces étudiées sont préparés par solubilisation de 5, 10, 15 et 20 mg dans 500 microlitres de méthanol.

Des concentrations finales de 0,5, 1, 1,5, et 2 mg/ml pour ces extraits méthanoliques sont obtenues par addition de 0,5 ml de solution préalablement préparée dans un tube contenant 9,5 ml du milieu PDA à une température comprise entre 45 et 50C°.

Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, le contenu des tubes est coulé dans des boites de pétri. On laisse sécher les boites pendant 15 à 20 min.

Une boite de pétrie contenant 10 ml de milieux PDA sans extrait méthanolique est utilisée comme contrôle négatif.

Deux boite de pétri avec 10ml de milieu PDA, l'une contenanantifongiquetpropineb (1,59mg /boite de pétrie) et l'autre vapcotop (2mg/ml/boite de pétri) sont utilisées comme contrôles positifs.

L'inoculationa été effectuée par le dépôt au centre de la boîte d'un disque mycélien d'environ 9mm de diamètre, coupé de la périphérie de pré- culture de 5 jours.

Toutes les boites de pétrie sont scellées avec du para filme stérile puis incubées à 28C° Pendant 9 jours.

- Expression des résultats :

L'efficacité du traitement est évaluée quotidiennement pendant neuf jours en mesurant la moyenne des deux diamètres perpendiculaires de chaque colonie.

Le pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons testés, par rapport au témoin, est calculé au 9éme jour, en utilisant la formule suivante (Albuquerque et al., 2006) Pourcentage d'inhibition mycélienne = [(dc-dt)/dc] ×100

Où

dc : le diamètre de la croissance mycélienne du contrôle négatif,

dt : le diamètre de la croissance mycélienne en présence du traitement à l'extrait méthanolique.

Tous les tests sont effectués en triplicata.

Chapitre II

Résultats et Discussion

II.1. Rendements en extraits bruts

Les résultats obtenus montrent que les extraits méthanoliques et aqueux de l'*Eucalyptus blakelyi* présentent les rendements respectives de 10.12 et 15.85%, tandis que pour *Eucalyptus cladocalyx*, les rendements enregistrés étaient de l'ordre de 11 et 19%. Au sein de la même espèce, le rendement obtenu de l'extrait aqueux est beaucoup plus meilleur que l'extrait méthanolique (Figure 2.1).

La différence observée de rendement entre les extraits méthanoliques et aqueux pourrait s'expliquer par le fait que l'eau est un solvant polaire, capable d'extraire énormément de molécules.

Les extraits méthanolique et aqueux des Eucalyptus ont fait objet de quelques études dont les valeurs de rendement étaient plus faibles comparativement à celles trouvées dans le présent travail. Une étude effectuée sur *Eucalyptus saligna* où Gaston et al. (2014) ont montré un rendement de 9.29% pour l'extrait méthanolique. Autre étude faite par Shayoub et al. (2015) a révélé que le rendement en extrait aqueux pour *Eucalyptus camaldulensis* est de l'ordre de 6.54%.

D'une manière générale, les teneurs en extraits bruts varient non seulement d'une plante à une autre mais également en fonction des paramètres de l'extraction, le solvant utilisé, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant.

Lee et al. (2003) ont mentionné que la méthode et les conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée, influencent le rendement des extraits. Ainsi la méthode de macération sous agitation réalisée dans la présente étude permet d'accélérer le processus d'extraction et de minimiser le temps de contact du solvant avec l'extrait tout en préservant la bio activité de ses constituants. De même le déroulement de cette extraction à température ambiante ainsi que l'épuisement du solvant à pression réduite permet d'extraire le maximum des composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probable due aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

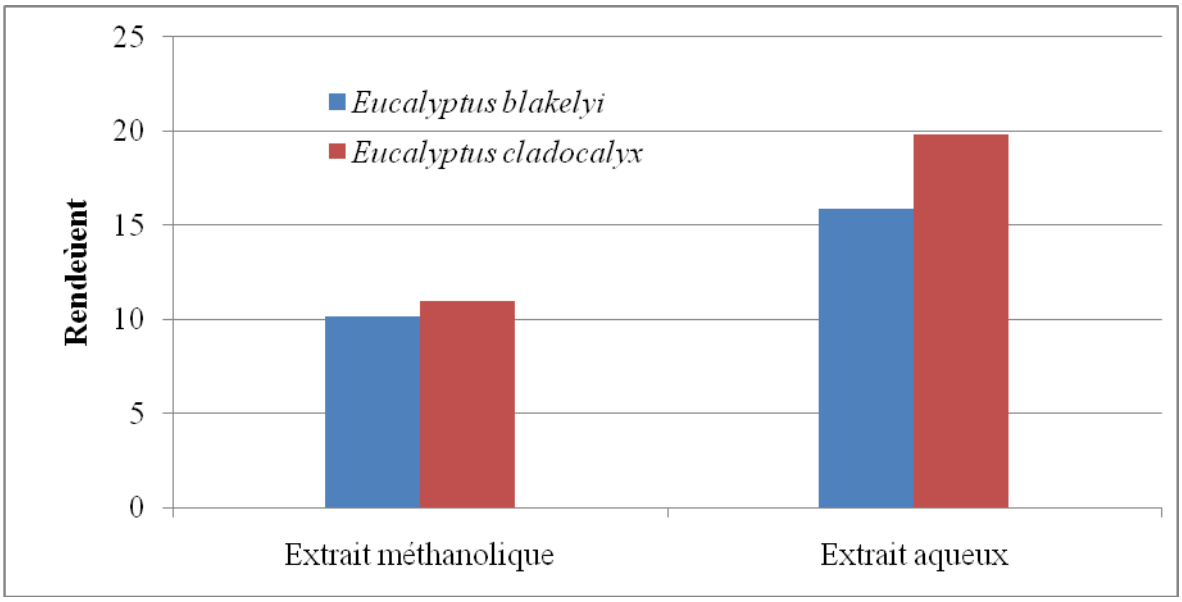


Figure 2.1: Rendements des extraits méthanolique et aqueux *d'Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx*

II.2. Tests biochimiques préliminaires

Le criblage phytochimique des extraits reconstitués à partir de la poudre des *Eucalyptus blakelyi*et *Eucalyptus cladocalyx* a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des tissus végétaux de ces espèces. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilité des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité, un examen sous la lumière ultraviolette ou un changement de couleur.

Les résultats de l'analyse phytochimique préliminaire des extraits des deux espèces sont groupés dans le tableau 2.1. Il est à signaler que les sucres réducteurs, les quinones libres et les anthraquinones se présentent abondamment dans les extraits méthanoliques et aqueux des deux espèces étudiées *Eucalyptus cladocalyx* et *Eucalyptus blakelyi*. En effet, les extraits méthanoliques des deux espèces sont fortement riches en d'autres métabolites secondaires tels que: les saponines, les flavonoïdes, les coumarines et les tanins et moyennement riches en alcaloïdes, cependant les extrait aqueux des deux espèces sont moyennement riches en flavonoïdes, coumarines et en tanins et dépourvus en saponines et en alcaloïdes. Tous les extraits sont aussi caractérisés par leur appauvrissement en stérols, en poly terpènes et en protéines.

Des travaux antérieurs similaires ont été réalisés sur les tests phytochimiques. Une étude réalisée par Shagal et al. (2012) a montré l'absence des saponines et des alcaloïdes dans

l'extrait aqueux des feuilles d'*E camaldulensis*. Sani et al. (2014) ont signalé la présence des anthraquinones en quantité importante sur l'extrait aqueux des feuilles d' *E camaldulensis*. TeklitAmabye et al. (2016) confirment la présence des tanins dans l'extrait aqueux de l'*E globulus*.

Tableau 2.1 : Résultats du screening phytochimique des extraits d'*E blakelyi*et *E cladocalyx*

Composés chimiques	*Eucalyptus cladocalyx*		*Eucalyptus blakelyi*	
	Extrait aqueux	Extrait méthanolique	Extrait aqueux	Extrait méthanolique
Les stérols et les poly terpènes	-	-	-	-
Les saponines	-	++	-	+++
Les flavonoïdes	+	++	+	+++
Les coumarines	+	++	+	++
Les tanins	+	++	+	++
Les protéines	-	-	-	-
Les alcaloïdes	-	+	-	+
Les sucres réducteurs	++	+++	++	+++
Les quinones libres	++	++	++	++
Les anthraquinones	+++	+++	+++	+++

Le signe + traduit la présence du groupe de composés chimiques, les signes ++ et +++ indiquent la présence du métabolite en quantité supérieure et le signe – montre l'absence du groupe de composés.

Des différences ont été démontrées en comparaison avec des études antérieures, en effet, des tests phytochimiques faits par Aleruchi et al. (2016) sur l'extrait méthanolique des feuilles d'*E camaldulensis*révèlent l'absence des alcaloïdes et des anthraquinones. Ces deux composés ont été détectés dans les deux espèces étudiées. Ces différences enregistrées dans les extraits sont probablement liées à l'espèce.

A l'issue de cette analyse phytochimique, on peut conclure que l'extrait méthanolique est plus riche en métabolites secondaires en quantité et en qualité par rapport à l'extrait aqueux pour les deux espèces étudiées.

La présence de ces métabolites secondaires au niveau de deux espèces étudiées justifie leur utilisation dans la médecine traditionnelle par la population locale.

Conclusion

Un grand nombre de plantes aromatiques contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes. Plusieurs travaux de recherche ont été focalisés sur les extraits des plantes aromatiques. Les différents résultats publiés indiquent qu'elles sont douées de plusieurs propriétés biologiques. Cependant, les travaux de recherche sur les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes de certaines plantes sont rares. Par conséquent, l'évaluation de telles propriétés demeure une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources d'agent antioxydant et antimicrobien naturel.

Le travail que nous avons entrepris a pour but de valoriser les ressources végétales, ainsi que de trouver de nouveaux produits naturels qui peuvent substituer les produits chimiques utilisés pour le traitement de diverses maladies.

Les espèces végétales étudiées appartenant à la famille des Myrtacées : *Eucalyptus blakelyi* et *Eucalyptus cladocalyx*. Le choix de ces plantes a été basé sur la rareté des études sur leurs extraits.

La préparation des extraits aqueux et méthanolique de deux plantes a été réalisée par macération. Les résultats obtenus montrent qu'au sein de la même espèce, Le rendement de l'extrait aqueux est beaucoup plus meilleur que celui de l'extrait méthanolique.

Les résultats du screening phytochimique indiquent que les sucres réducteurs, les quinones libres et les anthraquinones se présentent abondamment dans les extraits méthanoliques et aqueux des deux espèces étudiées. En effet, les extraits méthanoliques sont fortement riches en d'autres métabolites secondaires tels que : les saponines, les flavonoïdes, les coumarines et les tanins et moyennement riches en alcaloïdes, cependant les extrait aqueux sont moyennement riches en flavonoïdes, coumarines et en tanins et dépourvus en saponines et en alcaloïdes. Tous les extraits sont caractérisés par leur appauvrissement en stérols, en poly terpènes et en protéines.

La présence de ces métabolites secondaires au niveau de deux espèces étudiées justifie leur utilisation dans la médecine traditionnelle par la population locale.

Par ailleurs, ces résultats qui restent préliminaires, devront être confirmés et approfondies par des essais en plein champ et par des études de fractionnement ciblant l'indentification et le profilage des substances responsables de l'activité anti-oxidante et anti-microbien.

Les références bibliographiques

Abdulazim S S, Salah O A T, Munir N G M and Shomaf S. (1998). The Abortifacient effects of Castor Bean Extract and Ricin-A Chain in Rabbits. Contraception. V.58: 193–197.

Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan L A, Favela-Torres E and Aguilar C N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodégradation of ellagitannins. Applied Microbiology and Biotechnology.V.78: 189-199.

Ahmad, H, Khalique, A., Naveed, S., Zia, M.W., Rasool, Z., Zahid, U., & Moeed, A. (2017). Efficacy of a synthetic antioxidant treatment in stabilizing poultry byproduct meal and subsequent impact of the treated meal on selected growth parameters of broilers. Brazilian Journal of Poultry Science, 19, 3: 471-480.

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

Alain B. (2015). Etude De L'effet Antimicrobien Des Extraits Et De L'huile Essentielle D'une Plante Médicinale (Eucalyptus camaldulensis) De La Région de Ain Temouchent.mémoire de master université Belhadj Bouchaib d'Ain temouchent, 13p.

Al-Sayed E, Martiskainen O, Bobrowska-Hägerstrand M, Sinkkonen J, Törnquist K, Pihlaja K, Ayoub N and Singab A N. (2010). Phenolic compounds from *Eucalyptusgomphocephala* with potential cytotoxic and antioxidant activities. Natural Product Communications. V.5 (10):1639-1642.

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 foodadditive. Food Chemistry, 77, pp: 47.

Anosike E O, Chibogwu K E. (1981). Biochemical changes during the fermentation of castor oil (Ricinus communis) seeds for use as a seasoning agent. Plant Fd. Hum. Nutr. 30: 181-185.

Antolovich M, Prenzler D, Patsalides E, McDonald,Robards S. (2002). Methods for testing antioxidant activity. Analyst, 127.Pp183-198.

Appel K and Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology. V. 55: 373-399.

Arbez M et Lacaze JF. (1999). Les ressources génétiques forestières en France Tome 2 : les feuillus, INRA Editions, 408 p.

Atta AH, Alkofahi A. (1998). Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of some Jordanian medicinal plant extracts. J Ethnopharmacol, Mar ; 60 (2) :117-24.

Ayad R. (2008).recherche et détermination structurale des métabolites secondaires de l'espèce zygophyllum cornutum, Mémoire magister,université Mentouri Constantine. p 35-39, 40, 47.

Aziza A and B Hamida. (2018). Etude De L'effet Antimicrobien Des Extraits Et De L'huile Essentielle D'une Plante Médicinale (Eucalyptus camaldulensis) De La Région de Ain Temouchent,mémoire de masteruniversitaire Belhadj Bouchaib d'Ain- Temouchent 10p.

Baba Aïssa F. (1999). Encyclopédie des plantes utiles : flore d'Algérie et du Maghreb. Plus de 800 plantes de la flore d'Algérie et du Maghreb, ainsi que des substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident. Ed. : Librairie Moderne –Rouiba, pp : 101.

Badiaga M. (2011). Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de Nauclea latifolia (smith). Une plante médicinale africaine récoltée au Mali, Thèse de Doctorat, Université de Bamako, 137 p.

Balasundram N, Kalyana S and Samman S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. Food Chemistry. V. 99: 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.

Bartosz G. (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. Comments onToxicol. 9, pp5-21.

Basharat S. (2015). Le pouvoir antioxydant des additifs phytogéniiques. BIOMIN Holding GmbH. Austria. pp 1-5.

Bauer K, D Garbe, and H Surburg. (2001). Métabolisme des terpénoides chez les caprins, Thèse doctorat, université paris, p29-30

Baur AK, Dwyer-Nield L.D, Hankin J.A, Murphy RC and Malkinson AM. (2001). The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotionsensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. Toxicology, 169(1), 115.

Beaudeux J L & Geneviève, D. (2011). Biochimie médicale : Marqueurs actuels et perspectives. 2ème édition. Edition Lavoisier Chantal Arpino, p 130, 131.

Belbache H. (2003). Investigation phytochimique de l'extrait chloroforme de CentaureaParvifloraDesf, mémoire de magister, université Mentouri Constantine. p 16-20.

Belyagoubi N. (2012). Etude phytochimique et l'activité antioxydante de la plante Eucalyptus camaldulensis,mémoire de master,universitaié Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent p25.

Benaissa O. (2011). Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres Chrysanthemum et Rhantherium. Activité Biologique, Thèse Doctorat, université Mentouri Constantine. 63p.

Benidicte F, Hooper D C. (1998). Effect of mutation in GRIA of topoisomerase IV, from staphulococcus aureus on quinplene. 42(8): 2109- 2112P.

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

Bentafar et Chaib. (2016). Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques de Curcuma longa L. et Zingiber officinale (Rosc.) commercialisés dans la région de M'sila. P40-108.

Bigendako J. M. (2004). Identification et zonage des Eucalyptus globulus au Rwanda. pp : 1- 2.

Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. (2008). Blood oxidative Stress Biomarkers: influence of sex. Training Status, and dietary Intake. Gender Medicine.5 (3):218-228.

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.

Boubekri N, Belloum Z, Boukaabache R, Amrani A, Kahoul N, Hamama W, Zama D, Boumaza O, Bouriche H, Benayache F, & Benayache S. (2014). In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Genista quadriflora Munby extracts.Der Pharmacia Lettre, 6, 1: 1-7.

Bouchama. (2014). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-enzymatique des extraits foliaires de l'espèce Eucalyptus globulus Labill, mémoire de master Université Mentouri Constantine, 12p.

Boudjouref M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L. mémoire de Magister. Université Ferhat Abbes Sétif. 99 p.

Boudy P. (1952). Guide du forestier en Afrique, du Maroc, de Tunisie. Ed librarie agricole. Horticole forestier et Ménagére, Paris, 496p.

Bouhadjra K. (2011). Etude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge. Mémoire de Magister, Université Mouloud Mammeri tizi-ouzou : 40-41.

Boukhalfoun L, Kirouani A, Behidj N and Gana S. (2020). Assessment of some biological activities of *Eucalyptus blakelyi* Maiden using the essential oil, methanolic and aqueous extracts. Journal of Essential oil- bearing plants. V.23 (2): 266-275.

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

Bruneton J. (1999). phenolics schikimat acétate. In "pharmacognosy phytochemistry medicinal plants".Ed: technique et documentation .ISBN:1-898298-63-7, pp : 227-459.

Bruneton J. (1999). Tannins. In : Pharmacognosie, phytochimie, Plantes Cannas A. www.ansci.cornell.edu/plants/ toxicagents/tannin/pos_effects.html – 6

Bruneton J. (2015). Pharmacognosie (5° Éd.) Phytochimie - Plantes médicinales, Tec and Doc, Lavoisier, Paris.1504pp.

Burda S, Oleszek W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J. Agric. Food Chem.49 (6), Pp2774-2779.

Cano N, Barnoud D, Schneider SM, Vasson MP, Hasselmann M, Leverve X. (2007). Traité de nutrition artificielle de l'adulte 3ème édition, XVII, pp 1189.

Cantu-Medellin N, Kelley EE. (2013) b. Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how. NitricOxide. 34: 19-26.

Chaouche T. (2014). Contribution à l'étude des activités antioxydantes et antimicrobienne des extraits de quelques plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université Abou-Bakr-Benlkaid, Tlemcen. P 12.

Chen A, Pearson M and Gray J I. (1992) Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. Food Chemistry, 43, 177-183.

Chira K, suh J-H et teissède P-L(2008) Les polyphénols de raisin. phytothérapie, 6, pp : 75-82.

Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. (2010).2T 2T15TFruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies15T.2T 2TBr J Nutr, 2T 2T104 (Suppl 3):S28-S39.

Cowan N. M. (1999). Plant products as anti-microbial agents. Clinicalmicrobiology Reviews. Vol. 12(4) : 564-582.

Dat F. (2000),Van Breusegem S,Vandenabeele E, Vranová M, Van Montagu, D. Inze .(2006). Dual action of active oxygen species during plant stress responses, Cell. Mol. Life Sci. 57 779– 795.

Davide GW. (2015). Encyclopedia of Mind Enhancing, Foods, Drugs and Nutritional Substances.Second edition. Edition Mcfarland & Company, Iuc, Publishers Jefferson, North Carolina, p 166.

De Rijke E, Out P, Niessen W M A, Ariese F, Gooijer C, Brinkman U A T (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids,Journal of Chromatography A, 1112, 31–63.

Dewick PM. (1995). The biosynthesis of shikimate metabolites. Nat. Prod. Rep. p12, 579-607.

Donatien K. (2008). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinalesmaliennes - extraction, Identification d'alcaloïdes - caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Thèse de Doctorat.Université Paul Verlaine de METZ –UPV- M. France. 150 p.

Dudareva N F,NegreD A,Nagegowda and I. Orlova. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. Critical Reviews in Plant Sciences 25: 417-440.

Duong TTH, Chami B, McMahon AC, Fong GM, Dennis JM, Freedman S.B & Witting PK. (2008). Pre-treatment with the synthetic antioxidant T-butyl bisphenol protects cerebral tissues from experimental ischemia reperfusion injury. Journal of neurochemistry, 130, 6: 733-747.

Eldridge K, Davidson J, Harwood C ET van Wyk G. (1993). Eucalypt domestication and breeding, Oxford University Press Inc., New York, p 288

Favier A. (2003). Le stress oxydant Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité Chimique. Pp108-115.

Favier. (1997). Etude de l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques de Curcuma longa L. et Zingiber officinale (Rosc.) commercialisés dans la région de M'sila.p21.

Fogliani B. (2002).De la connaissance physiologique des Cunoniaceae endémiques de la nouvelle-Calédonie, à la recherche des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de leurs substances bioactives d'intérêt. Thèse de Doctorat université de la nouvelle-calédonie, pp 42-52.

Foley W J. (1992). Nitrogen and energy retention and acid-base status in the common ringtail possum (Pseudocheirus peregrinus): evidence of the effects of absorbed allelochemicals. Physiological Zoology 65: 403-421.

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

George W. (1981). Wallace's line and plate tectonics, Oxford University Press, Oxford and New York, p 91.

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

González A G, Barrera J B, García T Z and Rosas F E. (1984). Sesquiterpene lactones from Centaure a species. Phytochemistry. V. 23(9) :2071–2072.

Gorham J. (1977). Lunularic acid and related compounds in liverworts, algManallah, A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive Olea europaea L.mémoire magister, Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.

Govaerts R., Sobral M,Ashton P, Barrie F,Holst B K. (2008). potentiel aphicide des huiles essentielles d'Eucalyptus globulus et de Myrtus communis (Myrtaceae) sur le puceron farineux du prunier (Hyalopterus pruni), p 33/123.

Grêté P. (1965). Précis de botanique, Systématique des angiospermes Tome II ; 2ème édition révisée, Faculté de Pharmacie de Paris – Masson, 429p.

Guenfis l e. (2018). Etude De L'effet Antimicrobien Des Extraits Et De L'huile Essentielle D'une Plante Médicinale (Eucalyptus camaldulensis) De La Région de Ain Temouchent,Universitaire Belhadj Bouchaib d'Aïn-Témouchent.p12.

Guignard JL. (1996). Biochimie végétale. Ed. Masson, Paris. France. 274 p.

Guillaume J. (2008). Contribution à l'étude de l'activité antioxydante, antimicrobienne et anti-enzymatique des extraits foliaires de l'espèce : Eucalyptus globulus Labill.mémoire de master,Université des Frères Mentouri Constantine,10p.

Gurib - Fakim A. (2006) . Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine.V. 27: 1-93.

Haib E A. (2011). Valorisation de Terpenes natureles issus de plantes marocaines par transformation catalytiques,these de doctorat université toulouse,paul sabatier ,pp :6-25.

Haleng J, Pincemail J, Defraigne J O, Charlier C & Chapelle J P. (2007). Le stress oxydant. Revue Médicale de Liège, 62, 628 – 638.

Hanafey F, Sabry A. (2013). In vitro Antifungal Activity of Three Geophytic plant Extracts against Three Post-harvest Pathogenic Fungi, 16, 23, p.p. 1698-1705.

Hanson J. R. (2003). Natural products: the secondary metabolites. Ed.Royaume-Uni : Royal society of chemistry, Italy. 137 p.

Haslam E. (1994). Natural polyphenols (vegatable tannins) : Gallic Acid metabolism. Nat. Prod. p11, 41-66

Herzi N. (2012). Extraction et purification de substances naturelles : comparaison del'extraction au CO2-supercritique et des techniques conventionnelles (Doctoraldissertation, INPT).

Hill KD et Johnson LAS. (1995). Systematic studies in the eucalypts. A revision of the bloodwoods, genus Corymbia (Myrtaceae). Telopea 6, 185-504

Hilliard J J, Krause H M, Bernstein J I. (1995). A comparison of active site binding of 4- quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. Adv. Exp. Med. Biol, 390, 59-69P.

Hopper SD et Moran GF. (1981). Bird pollination and the mating system of Eucalyptus stoatei. Australian Journal of Botany 29, 625-638.

Hostettmann K. (1992). Les plantes sources de médicamentsphlébotropes, la lettre de la phlébologie. Ed. Zyma SA, Nyon. Switzerland. 25p

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.

Hoult J R S, Paya M. (1996). Pharmacological and Biochemical actionsof simple coumarine: Natural Products with Therapeutic potential. GenPharmacol. Vol (27): 711-722.

Ighodaro OM & Akinloye OA. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine, 54, 4: 287-293.

Ignat I, Volf I, Popa V I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables, Food Chemistry, 126, 1821-1835.

Ito N, Fukushima S, Hagiwara A, Shibata M and Ogiso T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. Journal of the National Cancer Institute, 70, 343-352.

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.

Jacquot J P, Dietz K J, Rouhier N, Meux E, Lallement P A, Selles B and Hecker A. (2013). Redox regulation in plants: glutathione and "redoxin" related families. In: Oxidative stress and redox regulation. Springer Science Business Media Dordrecht, pp; 213-291.

Justicia J J E, Oltra A F, Barrero A,Guadano A, Gonzalez-Coloma and J M. Cuerva.(2005). Total synthesis of 3-hydroxydrimanes mediated by titanocene (III) - evaluation of their antifeedant activity. European Journal of Organic Chemistry 4: 712-718.

Kalam S,Singh R, Mani A, Patal J, Naem K F et Pandey A. (2012). Antioxidants: elixir of life. International Multidisciplinary Research Journal. 1: 18.34.

Kang K., Fong W et TsangP. (2010). Novel antifungal activity of purpurin against Candida species in vitro. Medical Mycology, 48, p.p. 904-911.

Kevin LG, Fcarcsi, Novalija E, Stowe D F. (2005). Reactive oxygen species as mediatorsofcardiac injury and protection: The relevance to anesthesia practice. Anesthesia and Analgesia. 101:1275–1287.

Khenaka K. (2011). Effet de diverses plantes médicinales et de leurs huiles essentielles sur la méthanogénèse ruminale chez l'ovin, mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, p19-24.

Khither. (2019). Etude phytochimique et l'activité antioxydante de la plante Eucalyptus camaldulensis, université Belhadj Bouchaib d'Ain- Temouchent, 06p

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.

Kim J, Haff R, FariaN, MartinsM, Chan K et al. (2013). Targeting the Mitochondrial Respiratory Chain of Cryptococcus through Antifungal Chemo sensitization: nA Model for Control of Non-Fermentative Pathogens. Molecules, 18, p.p. 8873-8894.

Knudsen J T, R Eriksson, J Gershenzon and B Stahl. (2006). Diversity and distribution of floral scent (Appendix I: Distribution of Floral Scent Compounds at the Level of Plant Family). The Botanical Review 72: 1-120.

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.

Koyama T, Goto D, FujiiS, Tarikuz, Zaman. A K M, Sakuma I, Gao.M, Mitchell J. (1999). Woodcock-Mitchell. J, Sobel.BE, and Kitabatake. A. Longterm blockade of nitricoxide synthesis in rats modulates coronary network remodeling. Angiogenesis 3:137-46.

Krief S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. Pp : 32-17.

Ksouri R, Megdiche W, Jallali I, Debez D, Magné M, Hiroko I, Abdelly C H (2012) Medicinal halophytes: potent source of health promoting biomolecules with medical, nutraceutical and food applications,Critical Reviews inBiotechnology, 32(4),289-326.

Kurutas E B. (2016). The importance of antioxidants, which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutrition journal, 15, 1: 71.

Langenheim J H. (1994). Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. Journal of Chemical Ecology 20: 1223-1280.

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

Leverve X. (2009). Stress oxydant et antioxydants ? Cahiers de Nutrition et de Diététique, 44, 5: 219-224.

Litvak M E, Monson R K. (1998). Patterns of induced and contitutive monoterpène production in conifer needles in relation to insect herbivory. Oecologia. Vol. (114): 531-540.

Lobo V, Patil A, Phatak A & Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews, 4, 8: 118.

Lonn M.E., Dennis J.M., Stocker R. (2012).Actions of,„„antioxidants in the protection against atherosclerosis. Free Radical Biology and Medicine, 53; 863-884.

Lorimer S D, N B Perry, L M Foster and E J Burgess. (1996). A nematode larval motility inhibition assay for screening plant extracts and natural products. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 2842-2845.

Lovegrove J A, Stainer A & Hobbs D A. (2017). Role of flavonoids and nitrates in cardiovascularhealth. Proceedings of the Nutrition Society, 13p.

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.

Macheix J J,Fleuriet A and Jay-Allemand C. (2006). Les composés phénoliques des végétaux. Sciences des aliments, 26: 189-190.

MaleckyA, Samochocki M, Jostock R, Fehrenbacher A, Ludwig J, Albuquerque E X, Zerlin M.(2005). Allosteric sensitization of nicotinic receptors by galantamine, a new treatment strategy for Alzheimer's disease. Biol. Psychiat., 49, pp 279288.

Manallah A. (2012). Activités antioxydante et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive Olea europaea L. Diplôme de magister, Université Ferhat Abbas- sétif, 87p.

Mauro N M. (2006). Synthèse d'alcaloïdes biologiquement actifs : la (+)-anatoxine-a et la (±)-camptothécine, thèse doctorat, l'université Joseph Fourier Grenoble, p13, 16-28.

Mayer A M. (2004). Resistance to herbivores and fungal pathogens: Variations on a common theme? A review comparing the effect of secondary metabolites, induced, constitutive, on herbivores, and fungal pathogens. Isrel Journal Of Plant Sciences. Vol. (52) : 279-292.

Mehani M. (2006). Diagnostic sur les essais d'introduction de quelques essences forestières dans la région d'Ouargla Mém. Ing.eco. univouargla.69p.

Mesmoudi. (2014). Etude phytochimique et l'activité antioxydante de la plante Eucalyptus camaldulensis, université Belhadj Bouchaib d'Ain- Temouchent, 07p.

Messchendorp L G JZ, Gols and J J A, van Loon. (2000). Behavioural observations of Pieris brassicae larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. Entomology Experimental Applied 95: 217-227.

Métro A (1955). Les eucalyptus dans le monde méditerranéen. Ed.masson et cie.Paris. 513p.

Mila I. et Scalbert A. (1994). Tannin antimicrobial properties through iron deprivation a new hypothesis. International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, 381 (2): 749-755.

Moran GF, Bell JC ET,Griffin AR. (1989). Reduction in levels in inbreeding in a seed orchard of Eucalyptus regnans F. Muell. Compared with natural populations. Silvae genetica 38, 32- 36.

Nacoulma AP. (2012). Reprogrammation métabolique induite dans lestissus hyperplasiques formés chez le tabac infecté par Rhodococcus fascians : aspects

fondamentaux et applications potentielles. Thèse de Doctorat .Université Libre de Bruxelles Europe. Belgique. 92p.118.

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

Nauciel C et Vildé J L. (2005). Bactériologie médicale, 2èmeEd. Masson . Paris. Pp 510.

Newman D J, Cragg G M. (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. J. Nat. Prod. Vol. (75) : 311-335. Of Food Microbiology, 56(1): 3-12.

Nguz K. (1996). Evaluation de la dégradation des tannins. Phytochimiques. 225-230.

O'fel A. (1982). Parasitologie, Mycologie : Maladies parasitaires et fongiques, Association des professeures de parasitologie. Paris : E.Crouan et Roques, p.p. 349. Ozenda. P., 1977. Flore du Sahara, Ed du CNRS, p.p. 312-322.

Odile C and Daniel R. (2007). Botanique Pharmacognosie Phytothérapie. 3 eme Edition, Wolters Kluwer France : 14p.

Ounis R, D Boumaza et al. (2018). Etude De L'effet Antimicrobien Des Extraits Et De L'huile Essentielle D'une Plante Médicinale (Eucalyptus camaldulensis) De La Région de Ain Temouchent.unuiversité Ain temouchent, 09p.

Ouraïni D, Agoumi A, Ismaïli-AlaouiM, Alaoui K, Cherrah Y, Amrani M et Belabbas M A. (2005). Etude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermaphytes. Phytothérapie, 3, 4, p.p. 147-157.

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

Pandey KB et Rizvi SI. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants inhuman health and disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Vol. 2(5) : 270 – 278.

Papa L, Manfredi G, Germain D. (2014). SOD1, an unexpected novel target for cancer therapy. Genes and Cancer, 5 (1-2); 15-21.

Paris M. (1983).L'aubépine, Crataegus oxyacantha L.Phytotherapy. « les plante médécinale » 09p.

Pastre J O C. (2005). Intérêt de la supplémentassion en antioxydants dans l'alimentation des carnivores domestiques. Thèse de doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. 120p.

Peeking A, Picand B, Hacene K, Lokiec F, Guerin P. (1987). Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. Publications médicales AGCF. Vol. (6): 512-513.

Pelletier S W. (1983), the nature and definition of an alkaloid,In "alkaloids chemical and biological perspectives"opt,1pp.26sq.

Perret C. (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydaseproduite par Botrytis cinerea. Thèse de Doctorat .Université de Neuchâtel.Suisse. 184 p.

Perveen S. (2018). Terpenes and Terpenoids Introductory Chapter:01

Pham-Huy L A, He H et Pham-Huy C. (2008). Free radicals, antioxidant in disease and health. International Journal of Biomedical Medicine. 4: 89-96.

Pryor LD et Johnson LAS. (1971). Isolement et caractérisation chez l'Eucalyptus de gènes codant les facteurs de transcription CBF impliqués dans la réponse au froid, These de doctorat,université de toulouse,06p.

Pryor LD. (1976). The biology of eucalypts, Arnold, London, 82p.

Quézel P & Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome 2. CNRS. Ed. Paul Le chevalier, Paris.

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.

Rakotonanahary M. (2012). Peumus boldus M. De la botanique à la thérapeutique thèse de doctorat, université Joseph Fourier. p16, 19, 27, 28.

Rice-Evans C A, Miller N J, Bolwell P G, Bramley P M and Pridham J B. (1995). The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Radic. Res., 22.Pp 375-383.

Richter G. (1993), Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

Robbins C T, T A Hanley, A E Hagerman, O Hjeljord, D L Baker, C C. Schwartz and W W. Mautz. (1987). Role of tannins in defending plants against ruminants: reduction in protein availability. Ecology 68: 98-107.

Roberts RA, Smith RA, Safe S, et al. (2010). Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species. ToxicologyVol. 276; pp 285-94.

Rufini L, Sampaolo G. (1977). Plants Off. Aromi. Saponi., Cosmétol.Aerosol. Vol. (59) :9-75.

Šaponjac V T, Canadanovic-Brunet J, Cetkovic G, Djilas S. (2016). Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products. In: Nedovic, Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food. Food Engineering Series. Springer International Publishing, Switzerland. Chapter 06.

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

Scehovic J. (1990). Tannins et autres polymères phénoliques dans les plantes de prairies : détermination de leur teneur et de leur activité biologique. Revue Suisse de l'Agriculture, 22 (3) : 179-184.

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

Schrader T J and Cooke G M. (2000). Examination of selected food additives and organochlorine food contaminants for androgenic activity in vitro. Toxicological Sciences, 53(2), 278-88.

Sharma P, Gujral H S & Singh B. (2012). Antioxidant activity of barley as affected by extrusion cooking. Food Chemistry, 131, 4: 1406-1413.

Smirnoff N. (2005). Antioxidants and reactive oxygen species in plants.Black well Publishing Ltd., Oxford, UK. 53-86.

Sofowora A. (2010). Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Edition Karthala. 22p.

Stöckigt J, Sheludko Y, Unger M, Gerasimenko I, Warzecha H, Stöckigt D. (2002). Highperformance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoreticelectrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups, Journal of chromatography A, 967, 85-113.

Taiz. (2006). Lincoln et Eduardo Zeiger, Secondary métabolites and Plant Defense in : Plant Physiology, Fourth Edition, Sinauer Associates, ch. 13.

Takahashi T, Kokubo R &Sakaino M. (2004). Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from Eucalyptus maculata. Letters in AppliedMicrobiology, 39(1), 60–64

Tandé D. (2005). Mécanismes d'action et de résistance des antibiotiques ; in : "Gaudy C. et Buxeraud J. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique". Edition ELSEVIER, Paris. 15p.

Tenover F C. (2006).l'activité antioxydante et antibactérienne des extraits méthanoliques de Curcuma longa L. et Zingiber officinale (Rosc.) commercialisés dans la région de M'sila ,35p.

Terpolilli NA, Moskowitz MA, Plesnila N .(2012). Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 32: 1332-1346.

Treiner J. (2000). Extrait du Bulletin officiel n° 6 du 12 août 1999, France. 39-143.

Tsuchiya H, Iinuma M. (2000). Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from Sophora exigua. Phytomedicine 7, 161–5P.

Valkoet M, Rhodes C J, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. (2006). Free radicals, metals and antioxydants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 160: 1-40.

Van Breusegem F. (2006). Reactive oxygen species in plant cell death, Plant Physiol. 141 .384–390.

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

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: 20-2.

Verpoorte R, Alfermann A W. (2000). Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism. Ed. Kluwer Academic, Dordrecht. Netherlands, 286 p.

Vincieri F F, Celli S, mulinacci N, speroni E. (1988). An approach to the study of the biological activity of Eschscholtzia californica Cham. Pharmacol Res Commun; 20 Suppl 5:41-4.

Walker G, White N. (2011). Introduction to Fungal Physiology. In: Fungi: Biology• and Applications, Kavanagh K (ed) John Wiley and Sons, Ltd, UK.

Wollgast J, Anklam E .(2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification, Food Research International, 33, 423-447.

Wulf D. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function Physiological Reviews Published 1 January Vol. 82 no. 1, 47-95.

Yahaioui et Silat, l a. (2018). Contribution à l'étude des extraits de l'espèce Ephédra alata Alanda de la région de Sigus.p15-16.

Yala D, Merad A S, Mohamedi D. and Ouar Korich M N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb, n° 91.

Yezza S et Bouchama S. (2014). métabolismes secondaires des végétaux.P47.

Yu R, Mandlekar S. & Tony Kong A N. (2000). Molecular mechanisms of butylated hydroxylanisole-induced toxicity: induction of apoptosis through direct release of cytochrome C. Mol. Pharmacol. 58: 431- 437.

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