

N° d'ordre :



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE & POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

THESE

DE DOCTORAT EN SCIENCES

Présentée par:

Mme BESSAM Fatima Zohra

Spécialité : Sciences de l'environnement

Option : Biodiversité végétale et valorisation

Intitulé

*Caractérisation de quelques composés flavonoïques des
graines du chardon Marie (*Sylibum marianum* L.) et
évaluation de leur pouvoir antimicrobien*

Soutenue le.....

Devant le jury composé de :

Président : M. Latrache Ali

Professeur UDL de Sidi bel abbés

Examineurs : M. Lotmani Brahim

Professeur Université de Mostaganem

M. Hasnaoui Okkacha

Professeur Université de Saïda

M. Chadli Rabah

MCA Université de Mostaganem

Directeur de thèse :

M. Mehdadi Zoheir

Professeur UDL de Sidi Bel Abbés

Année universitaire 2014-2015

REMERCIEMENTS

Monsieur Mehdadi Zoheir

Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Djillali Liabes de Sidi Bel abbés.

Nous lui adressons toute notre reconnaissance pour l'honneur qu'il nous a fait de diriger cette thèse, pour son dévouement, sa disponibilité, sa patience, ainsi que ses qualités humaines et l'intérêt accordé pour la réalisation de ce travail.

Monsieur Latrache Ali

Professeur à la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Djillali Liabès de Sidi Bel abbés.

Nous lui exprimons tous nos remerciements pour l'honneur qu'il nous a fait d'assurer la présidence de ce jury. Nous lui adressons également toute notre reconnaissance pour l'intérêt accordé à notre travail. Qu'il soit assuré de toute notre gratitude et de notre plus profond respect.

Monsieur Lotmani Brahim

Professeur à l'université Ibn Badis de Mostaganem.

Qu'il soit remercié pour le plaisir et pour l'immense privilège qu'il nous a fait d'accepter de participer au jugement de cette thèse. Nous lui adressons notre profonde gratitude et nos remerciements les plus intenses.

Monsieur Chadli Rabah

Maître de conférences à l'université de Mostaganem.

Nous lui adressons nos sincères impressions de gratitude et de respect. Qu'il trouve ici l'expression de notre profonde reconnaissance de nous avoir fait l'honneur d'être examinateur et de participer au jury de ce travail.

Monsieur Hasnaoui Okkacha

Professeur à l'université Moulay Tahar de Saïda

Nous sommes particulièrement reconnaissants et honorés pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger en qualité de membre de jury. Nous lui adressons nos remerciements les plus sincères.

Enfin, que tous ceux qui ont collaboré et contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et dont les noms ne figurent pas ici, trouvent à travers ce travail l'expression de ma profonde gratitude.

Résumé

L'objectif de ce travail consiste à évaluer quantitativement et qualitativement les flavonoïdes contenus dans les graines (akènes) de *Silybum marianum* L. en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC); ainsi que l'évaluation du pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques sur des souches fongiques et bactériennes.

Les résultats obtenus montrent que le rendement en flavonoïdes varie selon le solvant d'extraction utilisé. En effet, le rendement le plus important est obtenu par l'extrait brut (4.09%), suivi de l'extrait chloroforme (1.16%), l'extrait acétate d'éthyle (0.67), l'extrait butanol (0.58%). Le plus faible rendement est celui obtenu par l'extrait aqueux (0.23%).

La chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide à haute performance ont révélé l'existence dans les solvants organiques de certaines classes flavonoïques (silybine, catéchine et naringine) en se référant aux standards disponibles.

L'activité biologique des quatre extraits flavonoïques issus des graines de *S. marianum* a été évaluée sur trois souches bactériennes (*B. cereus* ATCC 10876, *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 35659) et deux souches fongiques (*C. albicans* ATCC 10231 et *A. brasiliensis* ATCC 16404).

Parmi les extraits flavonoïques testés, seul l'extrait acétate d'éthyle présente un pouvoir antibactérien et antifongique sur les souches testées. En effet, cet extrait a induit des diamètres d'inhibition compris entre 12 et 16 mm sur *B. cereus*, 8 et 12 mm sur *E. coli* et 2 et 4 mm sur *p. mirabilis*. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) varient entre 12.5 et 50 µg/ml pour les souches utilisées.

Les classes flavonoïques (silybine, catéchine et naringine) révélées par CCM et HPLC pourraient être responsables du pouvoir antimicrobien de *S. marianum* sur les souches testées.

Mots clés: *Silybum marianum* L., graines ; flavonoïdes ; rendements ; CCM, HPLC ; pouvoir antimicrobien.

Abstract

The objective of this work is to evaluate quantitatively and qualitatively flavonoids contain in seeds (achenes) of *Silybum marianum* L. by using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC); and the evaluation of the antimicrobial power of flavonoïques extracts on fungal and bacterial strains.

The results obtained show that the yield of flavonoids varies according to the extraction solvent used. Indeed, the largest yield is obtained by the crude extract (4.09%), followed by chloroform extract (1.16%), the ethyl acetate extract (0.67), the butanol extract (0.58%). The lower yield is obtained by the aqueous extract (0.23%).

The thin layer chromatography and high performance liquid chromatography revealed the existence certain classes flavonoïques (sylibine, catechin and naringin) in the organic solvents with reference to the available standards.

The biological activity of four flavonoïques extracts from *S. marianum* seeds was evaluated on three bacterial strains (*B. cereus* ATCC 10876, *E. coli* ATCC 25922, *P. mirabilis* ATCC 35659) and two fungal strains (*C. albicans* ATCC 10231 and ATCC 16404 *A. brasiliensis*).

Among flavonoïques extracts tested, only the ethyl acetate extract has an antibacterial and antifungal power on the strains tested. Indeed this extract induced inhibition diameters between 12 and 16 mm on *B. cereus*, 8 and 12 mm on *E. coli* and 2 and 4 mm on *p. mirabilis*. The minimum inhibitory concentrations (MIC) vary between 12.5 and 50 µg / ml for used strains.

Flavonoïques classes (sylibine, catechin and naringin) revealed by TLC and HPLC may be responsible of the *S. marianum* antimicrobial capacity on the strains tested.

Keywords: *Silybum marianum* L., seeds; flavonoïds; yields; TLC, HPLC; antimicrobial power.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو كميا ونوعيا لتقييم الفلافونويد في البذور (achenes) من سلبين الماريانية L. باستخدام رقيقة اللوني طبقة (TLC) وعالية الأداء اللوني السائل (HPLC)؛ وتقييم القدرة المضادة للميكروبات من فلفونويك مقتطفات من الفطرية والسلالات البكتيرية.

لاحظنا أن العائد من الفلافونويد يختلف المذيب استخراج المستخدمة. وبالفعل يتم الحصول على الأداء أهم من استخراج مستخرج أجمالى (4.09%)، يليه مستخرج الكلوروفورم (1.16%)، واستخراج خلات الإيثيل (0.67)، واستخراج بيوتانول (0.58%). يتم الحصول على انخفاض العائد من المستخلص المائي (0.23%).

للوني طبقة رقيقة (TLC) وعالية الأداء اللوني السائل (HPLC) كشفت وجود في المذيبات العضوية لبعض فلفونويك فصول (كاتشين سلبين و نرجين) وفقا لمعايير المتاحة.

م تقييم النشاط البيولوجي لأربعة فلفونويك مقتطفات من S. الماريانية L. البذور على ثلاثة سلالات بكتيرية (B. الشمعية ATCC 10876، E. القولونية ATCC 25922، B. الشمعية ATCC 10876) واثنين من سلالات فطرية (C. البيض ATCC 10231 و A. البرازيلية ATCC 16404).

بين مقتطفات فلفونويك اختبار، إلا أن مستخرج خلات الإيثيل لديه قوة مضادة للجراثيم والفطريات على السلالات التي تم اختبارها. والواقع أن هذا مستخرج يسببها أقطار التثبيط بين 12 و 16 ملم على B. cereus. و 8 و 12 ملم على E. coli و 2 و 4 ملم على P. mirabilis.

تركيزات الحد الأدنى المثبتت تختلف بين 12.5 و 50 µg / مل لالسلالات المستخدمة. فلفونويك الطبقات (كاتشين سلبين و نرجين) التي كشفت عنها TLC و HPLC قد تكون مسؤولة قدرة مضادة للميكروبات الماريانية سلبين. على السلالات التي تم اختبارها.

كلمات البحث: سلبين الماريانية L، البذور. مركبات الفلافونويد. العوائد. TLC، HPLC. قوة مضادة للميكروبات.

Figure N°	Titre	Page
1	Squelette de base des flavonoïdes	9
2	Structure d'une flavanone	10
3	Structure d'une flavanone (naringine, naringétole)	10
4	Structure d'une flavone	11
5	Structure d'une flavone (apiine, apigénine)	11
6	Structure d'une flavonol	11
7	Structure d'une flavonol (quercétole, rutoside)	12
8	Structure d'une flavanonol	12
9	Structure d'une flavanonol (dihydroquercétole)	12
10	Structure d'une isoflavone	13
11	Structure d'une flavane -3-ols	13
12	Structure d'une chalcone	14
13	Dérivés des chalcones (isoliquiritigénine, butéine)	14
14	Structure d'une aurone	14
15	Structure d'un anthocyane	15
16	Flavonolignane de la sylimarine	17
17	Biosynthèse des flavonoïdes	18
18	Hydroxylation du cycle B	19
19	Méthoxylation	20
20	Structure de l'apigénine -7- api glucoside	20
21	O-glycosylation	21
22	Principe de l'HPLC	30
23	Chromatographie d'exclusion	32
24	Paroi des bactéries à Gram négatif	35
25	Paroi des bactéries à Gram positif	35
26	Localisation géographique des monts de Tessala	50
27	Diagramme ombrothermique de la région de Tessala (1913-1938)	54
28	Diagramme ombrothermique de la région de Tessala (1980-2010)	54
29	Protocole d'extraction des flavonoïdes	57
30	Chromatogramme de la CCM après révélation	62
31	Chromatogramme du système éther diéthylique / éther de pétrole (50/50)	71

32	Chromatogramme du système éther diéthylique / éther de pétrole (60/40)	73
33	Chromatogramme du système éther diéthylique / éther de pétrole (80/20)	74
34	Chromatogramme du système toluène /butanol / méthanol /éther de pétrole	75
35	Chromatogramme du système acétate d'éthyle / méthanol / eau	77
36	Chromatogramme du système butanol / acide acétique / eau	78
37	Chromatogramme des standards (a) et des extraits (b) par le système chloroforme / acétone / acide formique	79
38	Chromatogramme des standards (a) et des extraits (b) par le système chloroforme / méthanol / eau	79
39	Profil du chromatogramme du standard de la sylibine	81
40	Profil du chromatogramme du standard de la catéchine	81
41	Profil du chromatogramme du standard de la naringine	81
42	Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle	82
43	Chromatogramme de l'extrait chloroforme	83
44	Chromatogramme de l'extrait butanol	84
45	Chromatogramme de l'extrait aqueux	85
46	Représentation des diamètres d'inhibitions des différents extraits vis-à-vis des souches bactériennes testées	87
47	Différenciation des bactéries selon leurs sensibilités	89
48	Classification des extraits selon leurs effets antibactériens	90
49	Représentation des diamètres d'inhibitions des zones d'inhibitions de l'antibiogramme	91
50	Représentation des diamètres d'inhibitions des différents extraits vis-à-vis des souches fongiques testées	94
51	Classification des champignons selon leurs sensibilités	96
52	Classification des extraits selon leurs effets antifongiques	97

Tableau n°	Titres	Page
1	Anthocyanidines les plus souvent rencontrés chez les végétaux supérieurs et leurs structures	16
2	Précipitations moyennes mensuelles de la région de Tessala (1913-1938)	51
3	Variations des précipitations moyennes annuelles (1980-2010)	52
4	Moyennes mensuelles de la vitesse des vents en m/s (1987-2003)	52
5	Fréquences moyennes mensuelles des gelées (1985-2007)	53
6	Moyennes mensuelles du taux d'humidité relative (1985-2007)	53
7	Les différents systèmes de solvants utilisés pour la CCM	59
8	Relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes	62
9	Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes	63
10	Composés phénoliques identifiés par CCM	64
11	Rendements des flavonoïdes	70
12	Résultats de la CCM du système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (50 /50)	71
13	Résultats de la CCM du système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (60 /40)	72
14	Résultats de la CCM du système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (80 /20)	73
15	Résultats de la CCM du système de solvant toluène / butanol / méthanol / éther de pétrole	75
16	Résultats de la CCM du système de solvant acétate / d'éthyle / méthanol / eau	76
17	Résultats de la CCM du système de solvant butanol / acide acétique / eau	77
18	Composés identifiés par CCM des témoins avec le système de solvant chloroforme / acétone / acide formique	78
19	Rf des standards et des extraits utilisés par le système de solvant chloroforme / méthanol / eau	79

20	Résultats de l'analyse de l'extrait acétate d'éthyle	82
21	Résultats de l'analyse de l'extrait chloroforme	83
22	Résultats de l'analyse de l'extrait butanol	84
23	Résultats de l'analyse de l'extrait aqueux	85
24	Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'activité antibactérienne et sensibilité des souches vis-à-vis des extraits testés	86
25	Classification des bactéries selon leurs sensibilités (nombre de tests et pourcentages)	88
26	Classification des extraits selon leurs sensibilités (nombre de tests et pourcentages)	89
27	Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'antibiogramme et sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques commercialisés	90
28	Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'activité antifongique et sensibilité des champignons vis-à-vis des extraits testés	93
29	Classification des champignons selon leurs sensibilités (nombre de tests et pourcentages)	95
30	Classification des extraits selon leurs effets antifongiques (nombre de tests et pourcentages)	96
31	Diamètre d'inhibition de l'antifongogramme et sensibilité des champignons vis-à-vis de l'antifongique commercialisé	97
32	Variation de la turbidité en fonction de la concentration de l'extrait acétate d'éthyle sur les souches étudiées	98

Table des matières

Remerciements

Résumés (Français, Anglais, Arabe)

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

Partie I : Étude bibliographique

Chapitre I : Présentation de l'espèce *Sylibum marianum* L.

1-Historique..... 3

2-Systématique.....3

3-Habitat et origine..... 4

4-Caractéristiques morphologique et botanique..... 4

5-Constituants chimiques des graines..... 6

6- Propriétés de la plante..... 6

7-Utilisation pharmaceutique..... 7

8-Utilisation cosmétique..... 7

Chapitre II : Composés phénoliques

1-Introduction..... 9

2-Structure chimique des flavonoïdes..... 9

3-Classification des flavonoïdes..... 10

3-1- Flavane.....10

3-2- Flavanone.....10

3-3- Flavone..... 11

3-4- Flavonol..... 11

3-5- Flavanonol..... 12

3-6- Isoflavone..... 13

3-7- Les flavane-3-ols..... 13

3-8- Les chalcones..... 13

3-9- Aurones..... 14

3-10- Les anthocyanines ou anthocyanosides..... 14

3-11- Les flavonolignanes.....16

4- Biosynthèse des flavonoïdes..... 17

5- Substitution du squelette flavonique.....18

5-1- L'hydroxylation.....	18
5-2- La méthylation.....	19
5-3- La glycosylation.....	20
5-3-1- La O-glycosylation.....	21
5-3-2- La C-glycosylation.....	21
6- Localisation et distribution.....	21
7- propriétés des flavonoïdes.....	22
7-1- Propriétés antioxydante.....	23
7-2- Propriétés pro-oxydante des flavonoïdes	23
7-3- Inhibition enzymatique des flavonoïdes.....	24
7-4- Mécanisme d'action antitumorale des flavonoïdes.....	24
7-5- Propriétés antibactériennes.....	25
7-6- Propriétés anti-inflammatoire.....	25
7-7- Propriétés antivirale.....	25
7-8- Propriétés antiallergique.....	26
8- Biodisponibilité des flavonoïdes.....	26
8-1- Absorption.....	26
8-2- Métabolisme.....	26
8-2-1- Les tissus (foie et reins).....	26
8-2-2- Colon.....	27
• Les flavonols.....	27
• Les flavanols.....	27
• Les flavones et les flavanones.....	27
9- Techniques instrumentales d'analyses des flavonoïdes.....	28
9-1- Chromatographie : Aspects généraux.....	28
9-1-1- Définition.....	28
9-1-2- Nature des phases.....	28
9-1-2-1- Phase fixe.....	28
9-1-2-2- Phase mobile.....	28
10-1- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	28
10-1-1- Définition et appareillage.....	28
10-1-2- Principe de la technique.....	29
10-1-3- Application de la CCM.....	29
10-2- Chromatographie liquide à haute performance.....	29

10-2-1- Généralités.....	29
10-2-2- Principe de la méthode.....	30
10-2-3- Sélection des solvants utilisés en HPLC.....	30
a-1-Propriétés des solvants.....	30
a-2- Solvant et élution.....	30
a-3- Sélection des solvants.....	31
a-4- Optimisation.....	31
10-3- Chromatographie de partage.....	31
10-4- Chromatographie ionique.....	32
10-5- Chromatographie d'exclusion.....	32
10-6- Chromatographie de partage en phase gazeuse.....	33

Chapitre III : Étude de l'activité biologique

1-Activité antibactérienne.....	34
1-1-Généralités.....	34
1-2-Types de bactéries.....	34
1-2-1- Bactéries à Gram négatif.....	34
1-2-2-Bactéries à Gram positif.....	35
2- Culture des bactéries.....	35
3- Antibiotiques.....	36
4- Activité antimicrobienne des extraits de plantes.....	37
5- Mécanisme d'effet antimicrobien des polyphénols.....	37
6- Description des bactéries étudiées.....	37
6-1- Escherichia coli.....	37
6-1-1- Caractéristiques.....	37
6-1-2- Pathogénicité et toxicité.....	38
6-1-3- Mode de transmission.....	38
6-1-4- Période d'incubation.....	38
6-1-5- Transmissibilité.....	38
6-1-6- Sensibilité aux médicaments.....	38
6-1-7- Inactivation physique.....	38
6-1-8- Survie à l'extérieur de l'hôte.....	38
7-1- Proteus mirabilis.....	39
7-1-1- Caractéristiques.....	39
7-1-2- Pathogénicité et toxicité.....	39

7-1-3- Epidémiologie.....	39
7-1-4- Période d'incubation.....	39
7-1-5- Transmissibilité.....	40
7-1-6- Sensibilité aux médicaments.....	40
7-1-7- Inactivité physique.....	40
7-1-8- Survie à l'extérieur de l'hôte.....	40
8-1- Bacillus cereus.....	40
8-1-1 Caractéristiques.....	40
8-1-2- Pathogénicité.....	40
8-1-3- Gamme d'hôte.....	41
8-1-4- Source du danger.....	41
8-1-5- Mode de transmission.....	41
8-1-6- Période d'incubation.....	42
8-1-7- Transmissibilité.....	42
8-1-8- Sensibilité aux médicaments.....	42
8-1-9- Résistance aux médicaments.....	42
8-1-10- Inactivation physique.....	42
2-2 Généralités sur les champignons.....	42
2-2-1- Définition.....	42
2-2-2- Caractéristiques structurales.....	43
2-2-3-Reproduction.....	43
2-2-3-1- Reproduction asexuée.....	43
- Le bourgeonnement et la fission binaire.....	43
- La fragmentation et la sporulation.....	43
2-2-3-2- Reproduction sexuée.....	44
2-2-4- Classification.....	44
2-2-4-1- Zygomycètes.....	44
2-2-4-2- Hyphomycètes.....	44
2-2-4-3- Ascomycètes.....	45
2-4-4-4 Basidiomycètes.....	45
2-2-5-Importance des champignons.....	45
2-2-5-1- Utilité des champignons.....	45
2-2-5-2- Méfaits des champignons.....	45
2-2-6- Les antifongiques.....	46

2-2-6-1- Les antifongiques moderne.....	46
2-2-6-2- Les antifongiques traditionnels.....	46
2-3- Description des champignons étudiés.....	47
2-3-1- Généralités sur Candida albican.....	47
2-3-1-1- Définition.....	47
2-3-1-2- Epidémiologie.....	47
2-3-1-3- Sensibilité aux médicaments.....	47
2-3-1-4- Inactivation par des moyens physiques.....	47
2-3-1-5- Survie à l'extérieur de l'hôte.....	47
2-4-2- Généralités sur Aspergillus.....	47
2-4-2-1- Définition.....	47
2-4-2-2- Répartition.....	48
2-4-2-3- Les incidences.....	48
2-4-2-4- Maladies et dégâts.....	48
2-4-2-5- Localisation de la graine.....	48
2-4-2-6- Fréquence d'apparition.....	48

Partie II : Etude expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

1-Matériel biologique.....	49
2- Présentation du site de prélèvement.....	49
2-1- Situation géographique.....	49
2-2- Aspect lithologique.....	50
2-3- Aspect pédologique.....	50
3- Caractères climatiques.....	51
3-1- Pluviométrie.....	51
3-2- Température.....	52
3-3- Les vents.....	52
3-4- La gelée.....	52
3-5- L'humidité.....	53
3-6- Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausсен.....	53
4- Méthodes d'étude.....	55
4-1- Méthodes d'extraction des flavonoïdes.....	55
4-1-1- Préparation du matériel végétal.....	55
4-1-2- Technique d'extraction des flavonoïdes.....	55

a- Macération.....	55
b- Evaporation.....	55
c- Extraction par des solvants	55
4-2- IDENTIFICATION DES FLAVONOÏDES PAR (CCM) ET (HPLC).....	58
a- Chromatographie analytique sur couche mince (CCM).....	58
a-1- Le principe	58
a-2- Choix des conditions opératoires.....	58
• Choix de la phase stationnaire.....	58
• Choix de l'éluant.....	58
a-3- Solution d'essai.....	59
a-4- Dépôt de l'échantillon.....	60
a-5- Développement de la plaque.....	60
a-6- Révélation.....	60
• Révélation aux UV.....	61
• Révélation par méthode chimique.....	61
a-7- Calculs et interprétation.....	61
a-8- Structure des Rf.....	62
a-9- Structure et fluorescence.....	63
b- Analyse qualitative par la chromatographie liquide haute performance.....	64
b-1- Description du système RP-HPLC utilisé.....	64
b-2- Préparation des solutions standards.....	64
b-3- Préparation des échantillons.....	65
b-4- Expression des résultats.....	65
4-3- Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits.....	65
4-3-1- Préparation des solutions de la plante.....	65
4-3-2- Les germes testés.....	66
4-3-3- Repiquage des souches bactériennes et fongiques.....	66
4-3-4- Préparation des inoculums bactériens.....	66
4-3-5- Technique utilisée.....	66
4-3-6- Ensemencement.....	67
4-3-7- Préparation des disques.....	67
4-3-8- Expression des résultats.....	67

4-4- Etude de l'antibiogramme et de l'antifongigramme	67
4-4-1- Principe.....	67
4-4-2- Antibiogramme.....	67
4-4-3- Antifongigramme.....	68
4-5- Evaluation de l'activité antifongique	68
4-6- Classement des souches testées selon leur sensibilité aux antibiotiques et aux extraits	68
4-7- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	68
4-7-1- Principe.....	68
4-7-2- Technique classique.....	69

Partie III : Résultats et discussion

1-Résultats	70
1-1- Rendement des extractions	70
1-2- Chromatographie analytique sur couche mince	70
1-2-1- Identification par rapport à la littérature	71
1-2-1-1- Système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (50/50).....	71
1-2-1-2- Système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (60/40).....	72
1-2-1-3- Système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (80/20).....	73
1-2-1-4- Système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (20/80).....	74
1-2-1-5- Système toluène / butanol / méthanol / éther de pétrole.....	74
1-2-1-6- Système acétate d'éthyle / méthanol / eau.....	76
1-2-1-7- Système butanol / acide acétique / eau.....	77
1-2-2- Essai d'identification selon les standards disponibles	78
- Système de solvant chloroforme / acétone / acide formique.....	78
- Système de solvant chloroforme / méthanol / eau.....	79
1-3- Analyse qualitative par HPLC	80
1-3-1- Analyse des standards	80
1-3-1-1- Identification du pic du standard sylibine.....	80
1-3-1-2- Identification du pic du standard catéchine.....	81
1-3-1-3- Identification du pic du standard naringine.....	81
1-3-2- Analyse des extraits	81
- Analyse de l'extrait acétate d'éthyle.....	81
- Analyse de l'extrait chloroforme.....	82
- Analyse de l'extrait butanol.....	83

- Analyse de l'extrait aqueux.....	84
1-4- Activité antibactérienne et antifongique.....	85
1-4-1- Test du pouvoir antibactérien des différents extraits.....	85
1-4-1-1- Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits.....	85
1-4-1-2- Pourcentage de l'effet antibactérien et de la sensibilité des bactéries....	88
1-4-1-3- Sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques.....	90
- Antibiogramme.....	90
1-4-2- Test du pouvoir antifongique des différents extraits.....	92
1-4-2-1- Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits.....	92
1-4-2-2- Pourcentage de l'effet antifongique et de la sensibilité des champignons.....	95
1-4-2-3- Pourcentage de l'effet antifongique des extraits.....	96
1-4-2-4- Antifongigramme.....	97
1-4-3- Evaluation la concentration minimale inhibitrice.....	98
2-Discussion.....	99
2-1- Rendement.....	99
2-2- Étude phytochimique par chromatographie sur couche mince.....	99
2-3- Étude phytochimique par chromatographie liquide à haute performance.....	100
2-4- Activité microbiologique des extraits.....	101
3-Conclusion générale.....	107
Référence bibliographiques.....	110

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les vertus médicinales attribuées aux plantes orientent les chercheurs sur la présence de principes actifs. Ces molécules qui proviennent du métabolisme secondaire des plantes, sont utilisées par l'homme dans son arsenal thérapeutique. Parmi ces nouveaux composés potentiellement intéressants, les antioxydants tels que les flavonoïdes ont été particulièrement étudiés en raison de leur utilisation dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires pour leurs effets bénéfiques pour la santé. C'est pour cela que les industriels développent de plus en plus des procédés mettant en œuvre des extraits et des principes actifs d'origine végétale.

De nos jours, plus de 3000 flavonoïdes sont identifiés et se trouvent localiser particulièrement dans les pigments floraux ou dans les feuilles (Marfak, 2003).

Les flavonoïdes sont reconnus essentiellement pour leur action antioxydante, antidiabétique (Marfak, 2003), modulatrice de l'activité de certaines enzymes, vasculoprotectrice (Vitor *et al.*, 2004) et anti-inflammatoire (Chen *et al.*, 2008).

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plantes riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels à des fins thérapeutiques. De nombreuses substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans différentes régions du monde.

Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé. Des avantages économiques considérables dans le développement de la médecine traditionnelle et dans l'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des diverses maladies ont été constatés (Muthu *et al.*, 2006), d'où la nécessité d'une valorisation de la médecine traditionnelle.

Par sa grande superficie, l'Algérie est caractérisée par une diversité bioclimatique qui a engendré une diversité des paysages, d'écosystèmes et de ressources naturelles (Ferka-Zazou, 2006). Avec plus de 3000 espèces, notre pays possède une importante richesse floristique dont 232 espèces à usages médicinal, aromatiques et alimentaires (Chenouf, 2005).

La région de Tessala, zone montagneuse de l'Ouest algérien est connue pour sa richesse floristique. Celle-ci est particulièrement développée dans les forêts de la partie sommitale du massif, le Djebel Tessala. Ce secteur a fait récemment l'objet de nombreux travaux se rapportant à l'évaluation de la biodiversité floristique (Baraka, 2008 ; Bouzidi *et*

al., 2009 ; Cherifi *et al.*, 2011 ; Mokaddem, 2011 ; Bouterfes *et al.*, 2013) et à la valorisation biochimique de certains taxons qui en font partie (Bouterfes *et al.*, 2014).

A titre complémentaire des travaux suscités et dans le cadre du programme de recherche de notre laboratoire portant sur la conservation et la valorisation de la biodiversité végétale en général, nous nous sommes intéressés dans ce présent travail à un autre taxon faisant partie de la phytodiversité des monts de Tessala (wilaya de Sidi Bel Abbès) ; il s'agit de *Sylibum marianum* L., espèce connue communément sous le nom de chardon marie. C'est une plante annuelle appartenant à la famille des Astéracées, courante dans les lieux secs et ensoleillés, très fréquente dans le pourtour méditerranéen.

Les objectifs visés à travers cette thèse consistent à :

- ☀ évaluer quantitativement et qualitativement les flavonoïdes contenus dans les graines (akènes) de *S. marianum* en utilisant la chromatographie sur couche mince (CCM) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC),
- ☀ évaluer le pouvoir antimicrobien des extraits flavonoïques sur des souches fongiques et bactériennes.

Notre travail est subdivisé en deux parties :

- ☀ la première partie est une revue bibliographique, dans laquelle sont développés plusieurs chapitres se rapportant à la monographie de l'espèce étudiée, aux composés phénoliques et à l'activité biologique des plantes,
- ☀ la deuxième partie correspond à l'étude expérimentale, dans laquelle sont présentés le matériel végétal étudié, les techniques d'analyses adoptées ainsi que les résultats et discussion relatifs à:
 - ⊕ l'extraction et l'identification des composés flavonoïques existants, notamment la sylibine, catéchine et naringine et ce, selon les standards disponibles,
 - ⊕ l'étude de l'effet antimicrobien de quatre extraits flavonoïques (chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueux) sur trois souches bactériennes (*E. coli*, *B. cereus* et *P. mirabilis*) ainsi que sur deux souches fongiques (*C. albicans* et *A. brasiliensis*).

Notre travail est sanctionné par une conclusion générale et des perspectives.

PARTIE I
ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
PRÉSENTATION DE L'ESPÈCE
SYLIBUM MARIANUM

1-HISTORIQUE

Sylibum marianum L. ou chardon Marie appartient à la famille des Astéracées ou composées.

Sylibum vient du grec Silybon, nom d'un chardon dont les feuilles étaient consommées. Le nom *chardon Marie* vient d'une légende du moyen âge : la vierge Marie voulant cacher son enfant Jésus aux soldats d'Hérode le Grand, le dissimula sous les larges feuilles d'un chardon. Dans sa hâte quelques gouttes de lait tombèrent de son sein sur les feuilles de chardon, qui en ont gardé une trace héréditaire près de leurs nervures (Vincent, 2000).

Déjà connu dans la Grèce antique pour ses vertus traitant les troubles biliaires et hépatiques, le chardon Marie était aussi réputé au moyen âge pour combattre la bile noire ou encore la mélancolie. A cette époque, les mères s'en servaient aussi pour favoriser la montée de lait.

Au cours du XIXe siècle, le chardon Marie aurait été utilisé par les médecins nord américains pour soigner les affections liées aux reins, aux menstrues, aux varices, au foie et à la bile. Aujourd'hui, le chardon Marie est employé dans la gastronomie et la pharmacopée européennes.

La racine du chardon Marie est utilisée dans la fabrication des boissons énergisantes, tandis que les feuilles sont employées comme ingrédient dans les préparations pharmaceutiques pour le traitement du foie et de la bile. Les nombreuses recherches effectuées sur le chardon Marie attestent d'un vrai intérêt médical dans le cadre de la santé.

Le chardon Marie est également connue sous d'autres appellations bien nombreuses: silybe de Marie, artichaut sauvage, chardon de Notre-Dame, chardon argenté, chardon marbré, épine blanche, lait de Notre-Dame (Messegué, 1975 ; Péris *et al.*, 1996).

2- SYSTÉMATIQUE

La systématique du chardon Marie se résume comme suite (Deysson, 1979 ; Guignard, 1998 ; Spichiger *et al.*, 2000) :

- ✚ Embranchement : Phanérogames.
- ✚ Sous embranchement : Angiospermes.
- ✚ Classe : Magnoliopsida.
- ✚ Ordre : Asterales.
- ✚ Famille : Asteraceae (compositae)
- ✚ Sous famille : Tubuliflores.
- ✚ Genre : *Sylibum*.
- ✚ Espèce : *Sylibum marianum* L.

3- HABITAT ET ORIGINE

S. marianum est une plante méditerranéenne poussant également en Amérique du Nord et en Afrique du sud ainsi qu'en Australie (Sindell, 1991 ; Gabay *et al.*, 1994). C'est une plante cosmopolite qui s'étend de la mer de 700m à 1100m d'altitude sur les terrains incultes secs et rocailleux de toute l'Europe occidentale et méridionale. En Afrique du nord, on la trouve dans les champs, les décombres et les bords des routes (Guittonneau et Huon 1983 ; Beniton, 1984).

En Algérie, *S. marianum* est particulièrement répandue dans les hauts plateaux, la steppe, le sud de l'atlas saharien, les pâturages sablonneux et les lieux un peu humide (Quézel et Santa, 1963). Cette belle plante affectionne les sols pierreux et bien drainés.

4-CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUE ET BOTANIQUE

Plante bisannuelle, robuste, de grande taille, dépassant le plus souvent 1 m. Ses grandes feuilles vert pâle brillantes, pennatilobées et ondulées, sont bordées de dents épineuses à pointe jaune très acérée (Pl. I, fig. A). Celles de la base sont pétiolées, en rosette, très grandes (jusqu'à 40 cm). Les supérieures sont plus petites et plus étroites, engainantes. Toutes présentent à l'avert de nombreuses nervures blanches, donnant l'impression que la feuille est maculée de lait.

Les tiges généralement ramifiées atteignant environ 20 à 150 cm de haut, à leur extrémité portent des touffes bien fournies de fleurs tubulaires.

La fleur est hermaphrodite, c'est une inflorescence parsemée de capitules, la pollinisation est autogame (Guittonneau et Hun, 1983).

Les capitules, souvent solitaires, peuvent aussi être groupés en racèmes. Ils sont entourés de grandes bractées recourbées, à extrémité épineuse fortement recourbées en arrière (Luper, 1998 ; Pepping, 1999 ; Vogel encyclopédie, 2007). Les fleurons, tous tubulés et à cinq lobes, sont de couleur pourpre violacée (fig. B).

Les fruits sont des akènes luisants, de couleur noir ou marbrés de jaune entourés d'une coquille mesurant environ 1 cm (Guittonneaire et Huon, 1983) (fig. C) et possèdent des aigrettes légèrement pendantes avec des poils soyeux et blancs (Sindell, 1991 ; Vogel encyclopédie, 2007) (fig. D). La floraison se fait à la fin du printemps.

Planche I : Caractéristiques morphologiques des différents organes de *S. marianum*



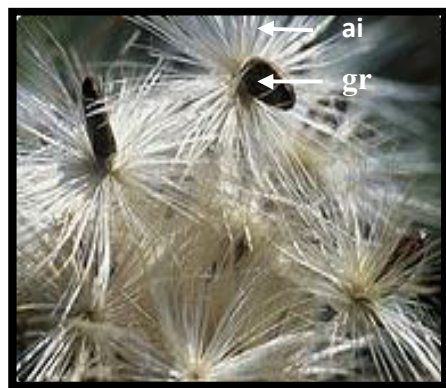
A



B



C



D

A : Feuille ; **B** : Inflorescence ; **C** : Graines ; **D** : Graines avec aigrette ; **ai** : aigrette ; **gr** : graine.

5- CONSTITUANTS CHIMIQUES DES GRAINES

Les principaux composants de la plante sont les flavanolignanes, un mélange de dérivés flavanoniques appelé silymarine (1,5 à 3% de la drogue) et dont les composants majoritaires sont la silybine la silybinine, formée de deux stéréo-isomères A et B, la silydianine et la silychristine et leurs nombreux dérivés stéréoisomériques isosilybine, et dihydrosilybine (Meyer et Bouchteler, 1999).

Les flavonoïdes sont représentés par des flavonols (quercétol et dihydrokaempférol), des flavones (apigénine, chrysoériol), des flavanones (naringine, ériodyctiol) et des dihydroflavonols (taxifoline) (Meyer et Bouchteler, 1999).

Des dérivés phénoliques : tocophérol 0,38% et stérols 0,63% y compris le cholestérol, le campestérol, le sitostérol et le stigmastérol (Meyer et Bouchteler, 1999).

Des lipides (20 à 30%) renfermant des triglycérides d'acides gras insaturés tels que l'acide linoléique (55 à 60%), l'acide oléique 20 à 25%, l'acide palmitique 8 à 10% (Widmer, 2001). L'acide stéarique 4 à 6%, l'acide arachidique 4 à 6%, l'acide béhénique 2 à 3%, environ 1 % d'acide eicosénoïque (Meyer et Bouchteler, 1999).

Des protéines 17 à 30%, des glucides, notamment des oses (glucose) et des osides (mucilage).

6- PROPRIÉTÉS DE LA PLANTE

Les flavanolignanes sont des hépato protecteurs, la silymarine agit par deux mécanismes : c'est un stabilisateur de membrane (elle inhibe les systèmes de transport membranaires des hépatocytes, rendant plus difficile l'absorption des toxines, inhibe la peroxydation des lipides et augmente la captation des radicaux libres produits par les substances hépatotoxiques). Elle contribue au maintien du pool glutathion responsable de la détoxification hépatique (enzymes de phase 2), réduit l'augmentation des transaminases et des phosphatases alcalines (Madani *et al.*, 2008), protège vis-à-vis du stress oxydatif (Haddad *et al.*, 2009, 2010). Elle stimule l'activité de la polymérase A, donc augmente la synthèse des acides nucléiques ribosomiaux et le nombre de ribosomes dans les hépatocytes, ce qui accroît la biosynthèse enzymatique et stimule la capacité de régénération hépatique. Elle contribue également à l'amélioration de la durée de vie dans la cirrhose. C'est un antiviral vis-à-vis de l'hépatite C.

La silymarine a des propriétés anti-cancer, propriétés anti-inflammatoires et activité anti-métastatique par modulation de protéines spécifiques, son effet anti-métastatique est notable.

De nombreuses études cliniques montrent une réduction de la toxicité des agents chimiothérapeutiques en association avec la silymarine.

La silymarine inhibe la prolifération des cellules tumorales de divers cancers (prostate, ovaire, sein, poumon, vessie et peau) (Bathia *et al.*, 1999). Elle diminue la toxicité rénale, a un effet antidiabétique (Hussein *et al.*, 2006). La combinaison avec de la phosphatidyl-choline augmenterait l'absorption et l'efficacité de la silymarine.

Sylibum marianum possède des vertus antispasmodiques, des activités fébrifuges et antihémorragiques, antiémétiques et stomachiques. On lui reconnaît par ailleurs une fonction veinoprotectrice et hypotensive (Tekeshwar *et al.*, 2011).

La plante est de plus galactogène et antidépressive (Campos, 1983 ; Schandalik *et al.*, 1994 ; Venkaraman *et al.*, 2000).

7- UTILISATION PHARMACEUTIQUE

Les semences sont réputées, sous forme de décoction, contre les métrorragies, les hématuries, les saignements de nez. La plante est employée pour lutter contre les troubles circulatoires veineux.

Sylibum marianum et plus précisément la silybine, exerce une action protectrice et curative au niveau du foie (cirrhose, hépatite) et combat par conséquent les affections hépatotoxiques (Compos, 1983 ; Schandalik *et al.*, 1994 ; Venkaraman *et al.*, 2000). C'est pourquoi il est aussi traditionnellement utilisé dans les troubles fonctionnels digestifs attribués à une origine hépatique. Dans tous les cas, la silymarine agit à titre préventif ou même à titre curatif.

Elle protège les cellules hépatiques de plusieurs façons :

- ✚ elle empêche la lyse cellulaire,
- ✚ elle augmente la résistance osmotique des érythrocytes,
- ✚ elle accroît également la résistance des mastocytes par suite d'une modification des propriétés mécaniques des parois.

8- UTILISATION COSMÉTIQUE

S. marianum présente des activités anti-radicalaires, anti-couperose et antioxydante, ce qui en fait un actif anti-âge fort apprécié. D'autre part, il jouit de vertus régénérantes. L'huile de *S. marianum* est un excellent conditionneur cutané et participe, en formulation à l'élaboration de la phase grasse. On lui attribue par ailleurs des propriétés hydratantes et régénérantes.

Les extraits ainsi que l'huile de *S. marianum*. sont particulièrement recommander dans des :

- ✚ soins pour les peaux couperosées et stressées,
- ✚ crèmes de nuits anti-radicalaires,
- ✚ crèmes antirides pour le contour des yeux,
- ✚ laits hydratants pour le corps,
- ✚ crèmes de massage pour les pieds et les jambes lourdes,
- ✚ produits capillaires destinés aux cheveux abîmés et fragiles.

CHAPITRE II
ÉTUDE DES COMPOSÉS
PHÉNOLIQUES

1-INTRODUCTION

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, le terme flavonoïdes désigne une très large gamme de composés naturels ubiquistes des plantes. On trouve que 2% environ de carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 10^9 tonnes par an est converti en flavonoïdes (Lhuillier, 2007).

L'expression flavonoïdes a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner des pigments quasi universels des végétaux ayant un squelette (C6-C3-C6) provenant du mot latin flavus qui signifie jaune (Bouakaz, 2006). Ces pigments sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des feuilles aussi sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement UV (Hadi, 2004).

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavonolignanes, les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins. Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve d'une manière très générale dans toutes les plantes vasculaires, où ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (Macheix, 2005).

Les flavonoïdes sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités 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) (Macheix, 2005).

2- STRUCTURE CHIMIQUES DES FLAVONOÏDES

De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C6 (A et B), reliés par l'hétérocycle oxygéné, que désigne la lettre C (fig.1) (Dacosta, 2003), portant les fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (Milane, 2004).

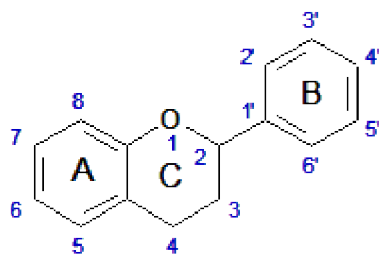


Figure 1: Squelette de base des flavonoïdes.

3- CLASSIFICATION DES FLAVONOÏDES

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

Tous les flavonoïdes possèdent les mêmes éléments structuraux de base. Ils peuvent être regroupés en différentes classes selon l'oxydation du noyau pyranique central, le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2 et 3 (Stefan et Mithöfer, 2006).

3-1- Flavane

Dans la position C2 : le flavonoïde est appelé **Flavane**.

3-2- Flavanone

Si la position C4 de la flavane porte un groupement carbonyle, la flavane est appelée **flavanone**, dérivé de 2,3- dihydro 2- phénylchromen-4-one, elle est caractérisée par l'absence de la double liaison C2-C3 (fig.2).

L'aglycone : naringétole ériodyctyol. Leurs hétérosides : naringine (fig.3).

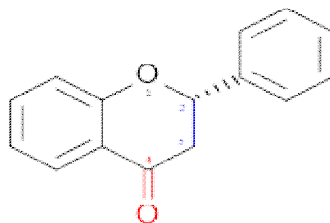


Figure 2: Structure d'un flavanone (Macheix, 2005).

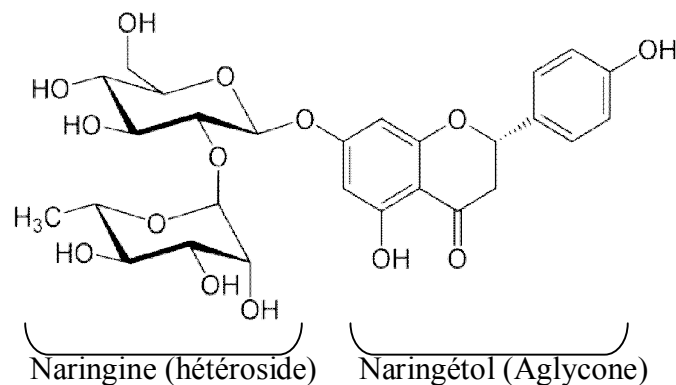


Figure 3 : Structure d'un flavanone (naringine, naringétole)

3-3- Flavone

Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée, le composé est nommé flavone dérivé de 2- phénylchromen-4-one (fig.4).

L'aglycone : Apigénine. Leurs hétérosides : apiine (fig.5).

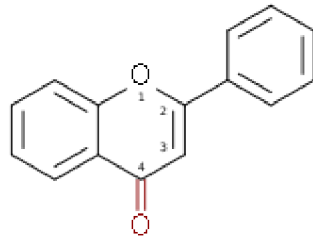


Figure 4: Structure d'un flavone (Macheix, 2005).

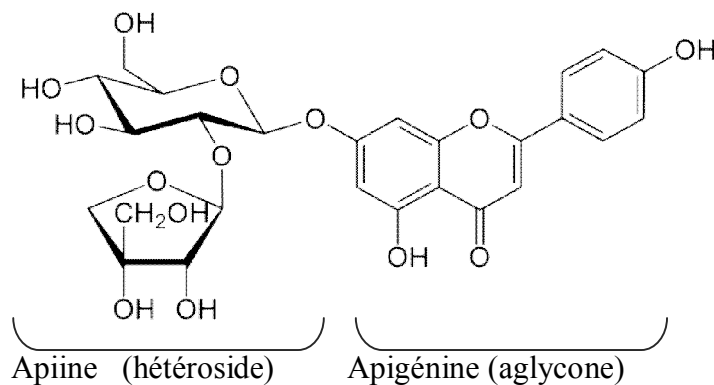


Figure 5 : Structure d'un flavone (apiine, apigénine)

3-4- Flavonol

Si le squelette est substitué en position C3 par un groupement hydroxyle et une fonction carbonyle C=O, il est désigné par le nom flavonol dérivé de 3-hydroxy-2-phényl chromen-4-one (fig.6).

L'aglycone: quercétol, kaempférol, myricétol, fisétol. Leurs hétérosides : rutoside, 3,7,4-O-triglucoside de kaempférol, 3-O-galactoside (fig.7).

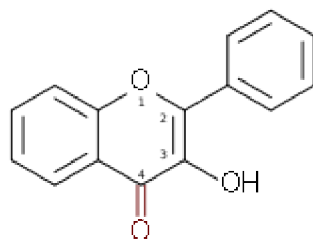


Figure 6 : Structure d'un flavonol (Macheix, 2005).

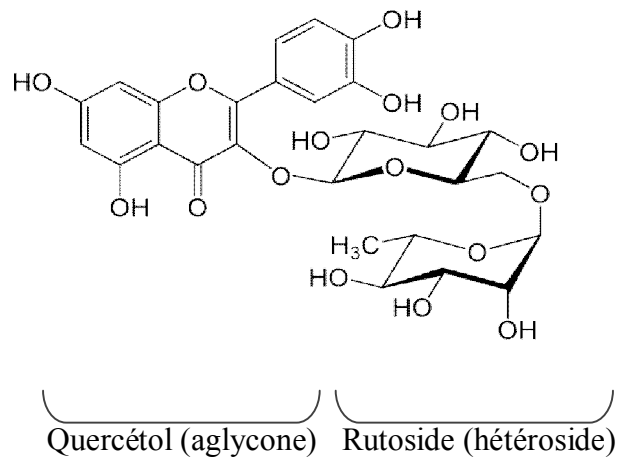


Figure 7 : Structure d'un flavonol (quercétol, rutoside)

3-5- Flavanonol

Dérivé de 3-hydroxy-2-3-dihydro-2-phenylchromen-4-one ; sans double liaison entre C2 et C3 (fig.8).

L'aglycone : dihydroquercétol (taxifoline) (fig.9). Leurs hétérosides : 3-O-rhamnoside de dihydroquercétol.

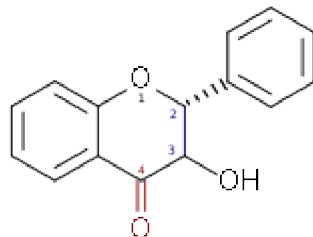


Figure 8: Structure d'un flavanone (Macheix, 2005).

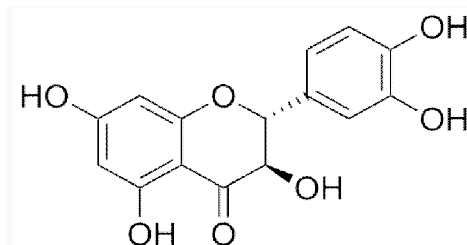


Figure 9 : Structure d'un flavanone (dihydroquercétol)

3-6- Isoflavone

Le flavonoïde est désigné par la position 3, dérivé de 3-phénylchromen 4-one (fig.10). Ce sont des isomères de flavone avec une structure quasi identique, la seule différence étant la position du groupe phényl, lié au carbone 3 au lieu du carbone 2 pour les flavones.

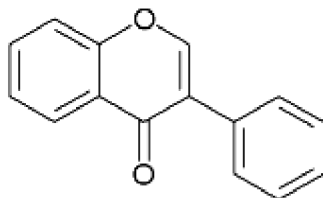


Figure 10: Structure d'une isoflavone (Macheix, 2005)

3-7- Les flavane-3-ols :

Les flavane-3-ols ou flavanols sont des molécules toujours hydroxylées en position C3, et se caractérisent par l'absence du groupe carbonyle en C4, sans double liaison entre le carbone 2 et le carbone 3 dans le cycle central. Ce sont des dérivés de 2-phényl-3-chromanol (fig.11).

Les flavanes-3ols sont à l'origine des polymères flavaniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés.

Leurs aglycone : catéchine. Leurs hétérosides : épicatechines (3-O-b)-D-glucopyranoside 2-phényl-3-chromanol.

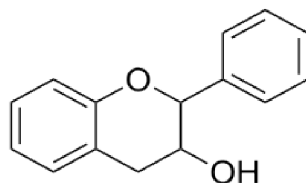


Figure 11: Structure d'une flavane-3-ols (Macheix, 2005)

3-8-Les chalcones

Ce sont des composés organiques aromatiques, qui comprennent une fonction cétone et une double liaison C=C. Très souvent la liaison C=C est conjuguée avec la fonction cétone.

On parle d'énone α et β insaturé (fig.12). Les chalcones peuvent être substituées en plusieurs positions par différents groupes. Ses dérivés sont appelés chalcones ou chalconoïdes ; on peut citer l'isoliquiritigénine (2', 4',4'- trihydroxychalcone), la butéine (4, 5, 4', 6'- tétrahydroxychalcone) (fig.13).

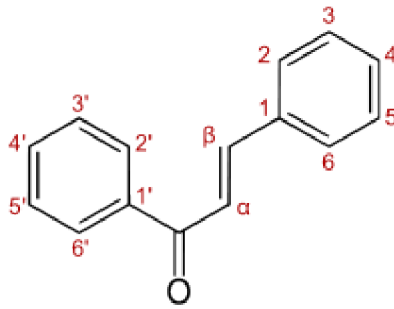
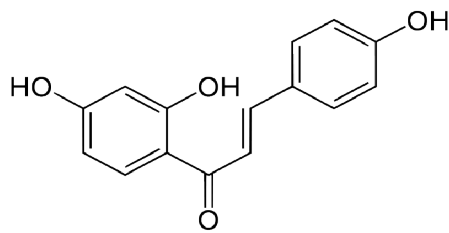
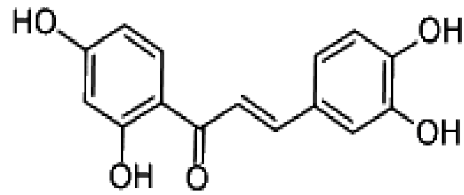


Figure 12 : structure d'une chalcone (Macheix, 2005)



Isoliquiritigénine



Butéine

Figure 13 : Dérivés des chalcones

3-9- Les aurones

Les aurones ont une structure proche, mais différente de la plupart des autres flavonoïdes. En effet, même si ces molécules dérivent aussi de la chalcone (qui se ferme pour former un second cycle). Dans les cas des aurones, la chalcone se ferme en formant un cycle à 5 atomes, alors qu'elle forme un cycle de 6 atomes pour les autres flavonoïdes (fig.14).

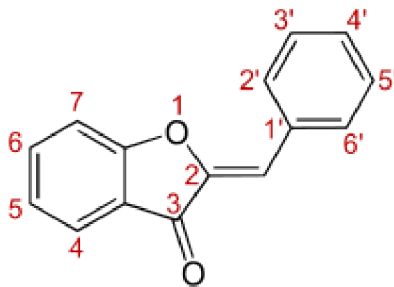


Figure 14 : Structure d'une aurone (Macheix, 2005)

3-10- Les anthocyanines ou anthocyanosides

Ce sont le plus important groupe de pigments végétaux hydrosolubles visibles à l'œil humain. Leur aglycone (partie non glucidique) est appelée anthocyanidine qui constitue le groupement chromophore du pigment. Les anthocyanines sont amphotériques. Par suite de leur ionisation, ils présentent des couleurs différentes pour divers pH. Ainsi la cyanidine est rouge-orange en milieu acide, violette en milieu neutre et bleu mauve en milieu alcalin (Macheix, 2005).

En réalité, la couleur dépend aussi du nombre d'hydroxyles non méthylés portés par le cycle B. Plus ce nombre est grand, plus la coloration bleue est intense (ex : delphinidine), alors que la méthylation des groupements hydroxyles conduit au contraire au rouge (ex : malvidine). La partie glucidique n'intervient pratiquement pas dans la coloration.

Les positions 3 et 5 et plus rarement, la position 7 sont généralement glycosylées par l'intermédiaire de l'hydroxyle (O-glycosylation). Ils se différencient entre eux par la substitution de groupements hydroxyle ou méthoxyle sur les carbones 3', 4', et 5' du noyau B, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule (fig.15), (tab.1).

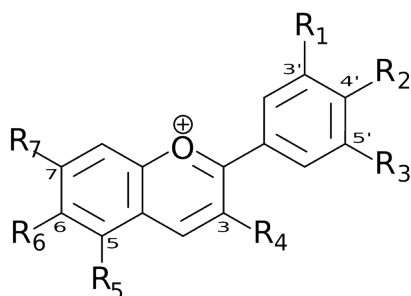


Figure 15 : Structure d'un anthocyane (Macheix, 2005)

Tableau 1: Anthocyanidine les plus souvent rencontrés chez les végétaux supérieurs et leurs structures (Willstitter et Karrer, 1913, 1936).

Noms	Nomenclature	Position de H et OH sur les carbones							Couleur à PH<1
		3	5	6	7	3'	4'	5'	
Apigéninidine	Ap	H	OH	H	OH	H	OH	H	orange
Lutéolinidine	Lt	H	OH	H	OH	OH	OH	H	orange
Tricétinidine	Tr	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	rouge
Aurantinidine	Au	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	orange
Pélargonidine	Pg	OH	OH	H	OH	OH	H	H	orange
Cyanidine	Cy	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange rouge
5-Méthyl cyanidine	5MCy	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	orange rouge
Péonidine	Pn	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	rouge
Rosinidine	Rs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	rouge
6- Hydroxy cyanidine	6OHCy	OH	OH	OH	OH	OH	OH	H	rouge
Delphinidine	Dp	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	violet
Pétunidine	Pt	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	violet
Malvidine	Mv	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	violet
Pulchellidine	Pl	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	violet
Europinidine	Eu	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	violet
Capensinidine	Cp	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	violet
Hirsutidine	Hs	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	violet

3-11- Les flavonolignanes

La silymarine est un mélange de différents flavonolignanes issus de la taxifoline (une flavanone) et de l'alcool coniférylique. Il s'agit notamment de la silybine, de l'isosilybine, de la silychristine et de la silydianine (Saller, 1995) (fig. 16).

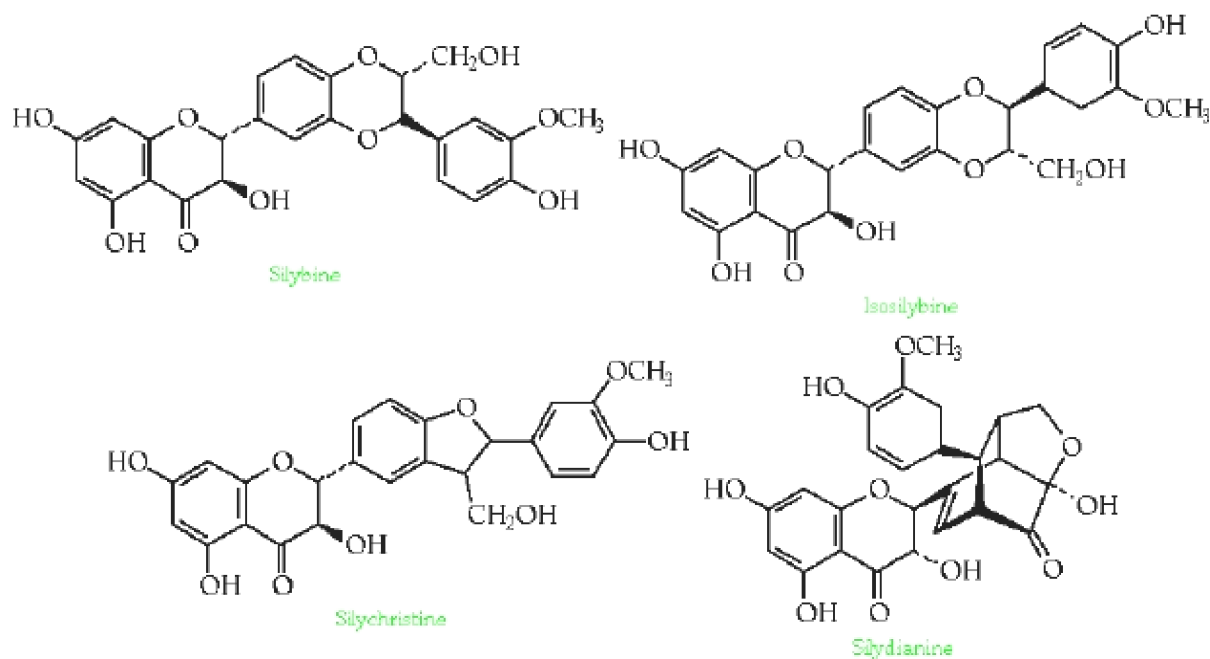


Figure 16 : Flavonolignanes de la silymarine (Saller, 1995)

4- BIOSYNTHESE DES FLAVONOÏDES

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2', 4', 6' tétrahydroxychalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase pour donner la formation de la flavone (2) : apigénine ou le dihydroflavonol (3).

Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kaempférol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol, respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan-3,4-ols (6) et anthocyanidols (7). Le pélargonidol (7), ce dernier sous l'action de la 3-O-glycosyltransférase, se transforme en anthocyanoside (8) : pélargonidol-3-glucoside (7) (Marfèk, 2003) (fig. 17).

La biosynthèse des différents groupes de flavonoïdes implique un ensemble complexe de réactions comprenant des hydroxylations, méthylations, oxydations, réductions, glycosilation (Sarmi et Cheymer, 2006).

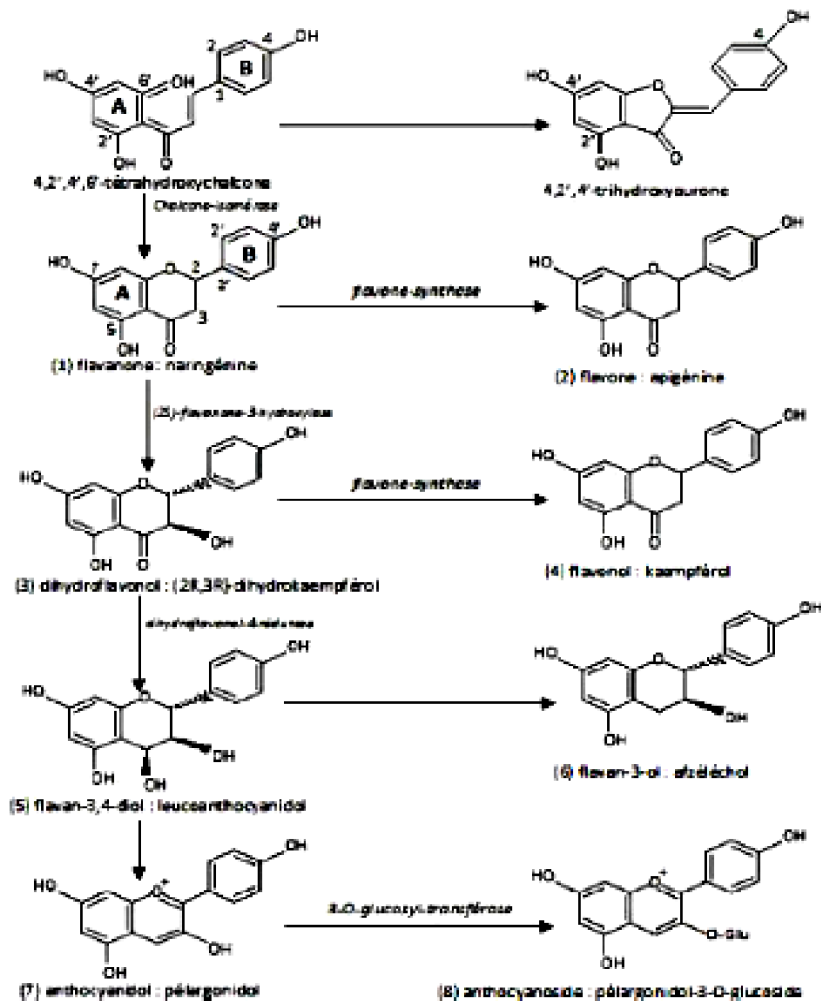


Figure 17: Biosynthèse des flavonoïdes (Marfek, 2003)

5- SUBSTITUTION DU SQUELETTE FLAVONIQUE

Il existe différents processus de substitution du squelette flavonique et qui sont à l'origine de l'extraordinaire diversité des structures flavoniques :

5-1- L'hydroxylation

Dans toutes les classes des flavonoïdes, la biosynthèse justifie la présence fréquente d'au moins trois hydroxyles phénoliques en position C5-C7-C4'. Ils sont introduits avant la formation du noyau chalcone (Harborne, 1973).

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3'se fait après fermeture de l'hétérocycle C, c'est-à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (position 3',4',5') se fait par le biais des enzymes hydroxylases (Deluca et Ibrahim, 1985 ; Heller et Forkmanne, 1988). Enfin les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylés (Linuma et Mizuno, 1989).

Ainsi le cycle B est mono-hydroxylé chez le kaempférol, di-hydroxylé chez la quercétine, tri-hydroxylé chez la myricétine (Marcheix *et al.*, 2005) (fig. 18).

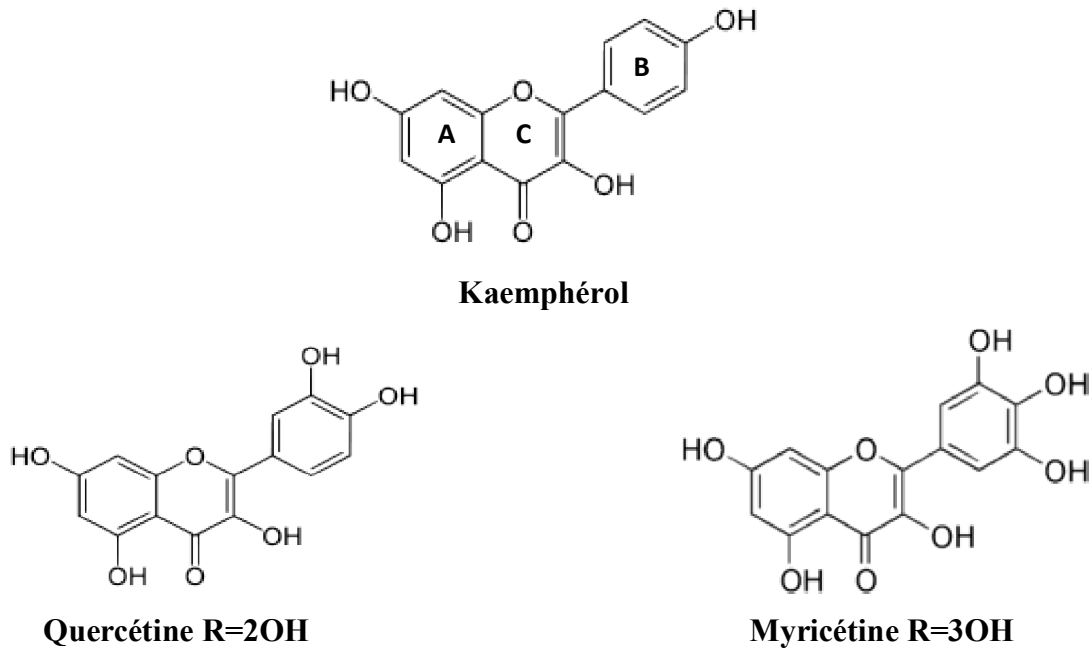


Figure 18 : Hydroxylation du cycle B (Macheix *et al.*, 2005)

5-2- La méthylation

La méthylation des groupes hydroxyles portés par le squelette flavonique se fait sous l'action de l'enzyme O-méthyl transférase en présence de S-Adenosyl-méthionine (SAM) comme donneur du groupement méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone (Ebel et Hahlbrock, 1982 ; Heller et Forkmanne, 1988).

Dans le cas de flavones et flavonols (ex : Nobiletine), cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 4', 5') et peut également se faire sur l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone (Heller, et Forkmanne, 1988) (fig.19).

La méthylation diminue l'hydrosolubilité des molécules, qui dans des cas extrêmes sont alors présentes dans les exsudats de certains bourgeons (peupliers), ou liées à des structures lipidiques, comme les cires des feuilles d'eucalyptus (Marcheix *et al.*, 2005).

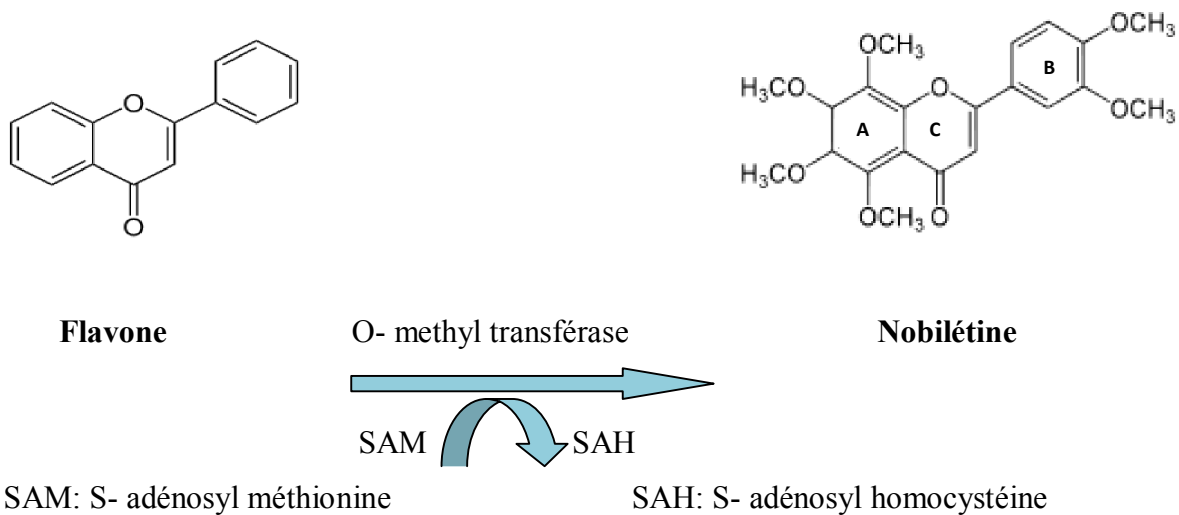


Figure 19 : Méthoxylation (Heller et Forkmanne, 1988)

5-3- La glycosylation

Pas moins de 90% de flavonoïdes isolés des plantes sont glycosylés (Lee *et al.*, 2007). La plupart des flavonoïdes sont glycosylés excepté la catéchine (Rice-Evans, 2001).

La liaison aglycone-sucre s'effectue par le biais d'un hydroxyle phénolique et l'hydroxyle du sucre (glucose, rhamnose, xylose, galactose et arabinose) après perte d'une molécule d'eau créant ainsi un pont oxygéné entre les deux parties (fig. 20).

Un deuxième sucre peut se rattacher à la structure flavonique soit avec un autre OH phénolique soit avec un OH alcoolique du sucre déjà fixé. La partie osidique peut être mono, di ou tri-saccharidique.

Les conséquences de la glycosylation sont multiples : modification de la couleur des pigments, forte augmentation de la solubilité dans l'eau permettant alors une plus grande accumulation vacuolaire, modification des propriétés biologiques des molécules phénoliques, par exemple dans les interactions de la plante avec les microorganismes, ou dans le caractère toxique qu'elles peuvent présenter vis-à-vis de la plante elle-même (Macheix *et al.*, 2005).

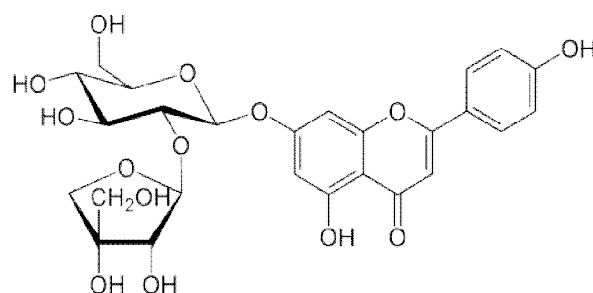


Figure 20 : Structure de l'apigénine-7-apioglucoside (Rice-Evans, 2001).

5-3-1- L'O-glycosylation

L'O-glycosylation se fait en présence de l'enzyme 3-O-glycosyl transférase, et un donneur de sucre comme UDP-GLU (Uridine diphosphate glucose) (Halbrock et Grisebach, 1975).

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire avec n'importe quel des hydroxyles phénoliques de la génine. Mais en règle générale, ce sont surtout l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui ont une plus grande labilité (Bruneton, 1999) (fig.21).

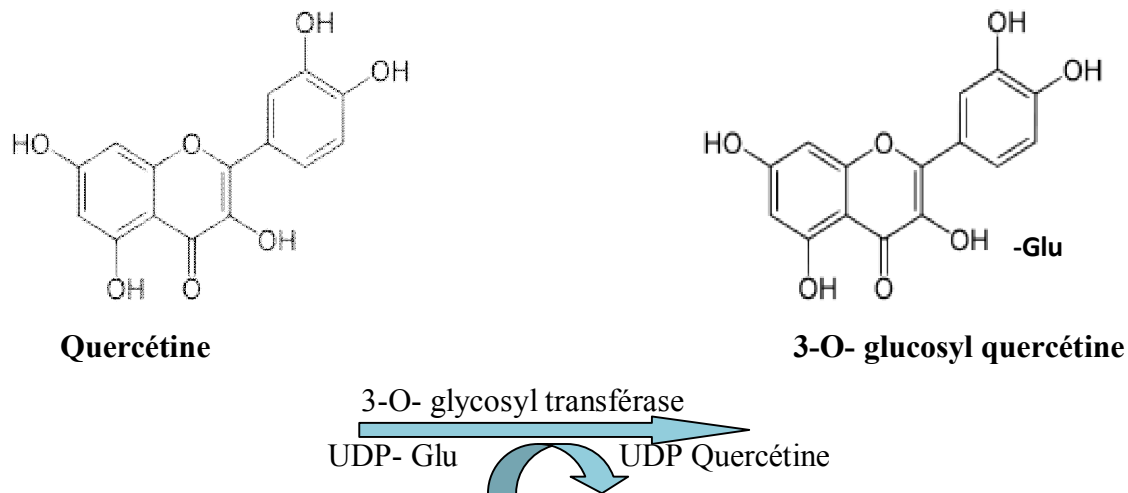


Figure 21: La O- Glycosylation (Bruneton, 1999)

5-3-2- La C- glycosylation

Le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide (Chopin, 1966).

Dans cette glycosylation, la liaison s'établit entre le carbone du sucre et celui en position 6 ou 8 de la génine (Benakacha, 2001).

La rupture de la liaison génine-ose est plus difficile dans le cas des C-hétérosides que dans celui des O-hétérosides (Milane, 2004). Dans certains composés les deux modes de glycosylation coexistent (Benakacha, 2001).

6- LOCALISATION ET DISTRIBUTION

Les flavonoïdes sont impliqués dans de nombreuses interactions des plantes avec les conditions biotiques et abiotiques de leur environnement. Ces substances sont accumulées dans différentes parties cellulaires et tissulaires de la plante durant l'organogénèse, et sous l'influence de plusieurs facteurs stimulants (Hutzler *et al.*, 1998).

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes, puis migrent et se dissolvent dans les vacuoles (Piquemal, 2008). La répartition de ces composés montre des accumulations très localisées généralement en relation avec une fonction

physiologique, ou avec l'interaction de la plante avec son environnement. Ainsi, les flavonoïdes qui ont une localisation épidermique ont un rôle d'écran vis-à-vis des rayonnements solaires. Tandis que ceux qui sont impliqués dans les mécanismes de défense, ont plutôt une localisation sous-épidermique (Boudet, 2000).

Les flavonoïdes sont largement abondants dans les légumes, feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. Ils sont également présents dans le vin rouge et le thé.

Les céréales, les épices et les herbes aromatiques (persil, thym, céleri) sont considérés aussi, comme des sources importantes de flavonoïdes. De nombreux travaux ont montré que certains fruits et légumes sont très riches en flavonols, flavones et flavanones (Brower et Bucher, 1995 ; Grosier *et al.*, 1997).

Les flavones apigénine et lutéoline, sont très spécifiquement détectées dans les herbes aromatiques comme le persil, le thym, le romarin et le céleri. Pour ce dernier, les concentrations de ces deux flavones sont largement supérieures à celles présentes dans les tiges. Dans les tomates, il y a autant de naringénine que de la quercétine. Cette dernière se retrouve de façon majoritaire dans la quasi-totalité des végétaux. Le kaempférol, autre flavonol, y est également largement détecté.

Parmi les autres flavonoïdes souvent étudiés, les anthocyanes confèrent aux fruits et légumes leurs teintes rouges ou bleutées. Ils se trouvent surtout dans les myrtilles, cassis, airelles, groseilles, mais également à un degré moindre dans tous les autres fruits rouges, comme les raisins, les fraises et les framboises. On peut aussi les trouver dans certains légumes comme le chou rouge et les radis.

Le monde animal est aussi concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin, la quercétine et de la galangine dans la propolis des abeilles. Ces insectes les synthétisent à partir des sécrétions de bourgeons de nombreux arbres comme le bouleau, l'aulne, le sapin et les modifient grâce à leurs enzymes salivaires (Marfak, 2003).

On les trouve en abondance dans les familles suivantes : Polygonacées, Apiacées, Rutacées, Astéracées, Légumineuses (Milane, 2004).

Il est à noter que les flavanones et les flavones ont été isolés d'un corail marin, et d'un petit nombre de champignons (Lhuillier, 2007).

7- PROPRIÉTÉS DES FLAVONOÏDES

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs, que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape

fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes.

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes, dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes, en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance (Marfak, 2003). Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoaléxines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

7-1- Propriétés antioxydante

Les flavonoïdes sont des composés qui peuvent empêcher les dommages oxydatifs due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par piégeage de l'oxygène et neutralisation des radicaux libres par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alcoxydes et peroxydes (Hodek *et al.*, 2002) ; soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres (Van Acker *et al.*, 1996 ; Benavente-Garcia *et al.*, 1997).

Ils jouent également un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibant la lipoxigénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols), des allergies et des affections bactériennes et virales (anti-HIV) (Anderson *et al.*, 1996 ; Cowan, 1999 ; Yao *et al.*, 2004). On attribue également aux flavonoïdes des propriétés neurosédatives, antispasmodiques, diurétiques, anti-oestrogènes (isoflavones), contre la sénescence cérébrale et ses conséquences telle l'altération de la mémoire et la confusion.

D'autres parts, les citroflavonoïdes (flavonoïdes provenant de divers *Citrus*) et la fragilité capillaire (insuffisance veino-lymphatique, crise hémorroïdaire) (Hennebelle *et al.*, 2004).

7-2- Propriétés pro-oxydante des flavonoïdes

Nous avons décrit précédemment les propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes, mais il ne faut pas négliger leurs propriétés pro-oxydantes. Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène.

En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*. Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes (Milane, 2004).

7-3- Inhibition enzymatique des flavonoïdes

En règle générale, les flavonoïdes sont « *in vitro* », des inhibiteurs enzymatiques de l'histidine-décarboxylase par le quercétol ou la naringénine ; l'élastase, l'hyaluronidase, par les flavones et surtout par les proanthocyanidols ; la phosphodiésterase de l'AMPc, l'aldose réductase par le quercétiroside, ainsi que par des méthoxy flavones. La protéine-kinase, notamment par le lutéolol. Plusieurs flavonoïdes (cirsiolol, hypolaetine, etc.) sont de puissants inhibiteurs de la 5-lipoxygénase. Cependant la lutéolol, l'apigénol et la chrysin inhibent la cyclooxygénase (Bruneton, 1999).

Quelques flavonoïdes sont des inhibiteurs efficaces de la biosynthèse des prostaglandines. Cet effet est dû à l'inhibition de certains enzymes (lipoxygénase, phospholipase, cyclo oxygénase) impliquées dans leur biosynthèse.

L'activité anti-tumorale de plusieurs flavonoïdes (pinostrobine, quercétine, morine, myricétine) est attribuée à leurs efficacité d'inhiber la topoisomérase I et II (Hodek *et al.*, 2002).

Plus rarement, les flavonoïdes peuvent stimuler une activité enzymatique : c'est le cas de la proline-hydroxylase (Bruneton, 1999).

7-4- Mécanisme d'action antitumorale des flavonoïdes

Depuis longtemps, l'action antitumorale des flavonoïdes est connue. Cette action est différente selon que le facteur carcinogène est varié.

Plus récemment des recherches expérimentales suggèrent que les flavonoïdes sont parmi les substances susceptibles de retarder voire d'empêcher, l'apparition de certains cancers, tout en réduisant d'une manière spécifique les risques d'en avoir chez les sujets humains (Decloitre, 1993 ; Hertog, 1996).

Des études montrent que certains flavonoïdes particulièrement, la lutéoline, la quercétine, le kaempférol, l'apigénine et la taxifoline inhibent d'une façon marquée la lipogénèse des cellules cancéreuses, d'autres flavonoïdes sont plutôt capables d'induire l'apoptose.

Certains flavanols (épigallocatechine-3-gallate) représentent des effets cytotoxiques sur les cellules cancéreuses de la prostate. Ces effets sont corrélés avec leur capacité à inhiber les enzymes clés lipogéniques FAS (Fatty Acid Synthase) (Brusselmans *et al.*, 2005).

Les travaux réalisés par Mahmoud *et al.* (2000) et Depeint *et al.* (2002), montraient que la

curcumine permet de prévenir la formation des tumeurs spontanées induites génétiquement. Ce même flavonoïde, réduit l'apparition des tumeurs de la peau induites chimiquement. La quercétine et la rutine, sont les deux flavonoïdes les plus conseillés pour prévenir l'apparition du cancer de l'appareil gastro-intestinal. Tandis que l'apigénine avec la quercétine, ont la capacité à inhiber la phase de métastase. Toutefois Caltagirone *et al.* (2000) et Depeint *et al.* (2002) signalaient que l'inhibition des différents stades de développement de cancer est plutôt assurée par tous les flavonoïdes.

7-5- Propriétés antibactériennes

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents, a entraîné la sélection de souches multi-résistantes, d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies, qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires, dont les composés phénoliques sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique, et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

Les polyphénols notamment les flavonoïdes et les tannins, sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrases), ou d'autres interactions pour inactiver les protéines microbiennes de transport et d'enveloppe cellulaire (Cowan, 1999).

7-6- Propriétés anti-inflammatoires

De nombreuses études semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, et qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire par inhibition de l'activité des enzymes qui peuvent être responsables des inflammations. Ils peuvent aussi moduler l'adhésion des monocytes durant l'inflammation athérosclérotique, en inhibant l'expression des médiateurs inflammatoires (González-Gallego *et al.*, 2007). D'autres flavonoïdes sont capables d'inhiber l'histamine (Kim *et al.*, 2004).

Les flavones et les flavonols sous forme glycosylés, ou libre comme la quercétine, kaempférol, myricétine ont une activité inhibitrice de COX (Cyclooxygénase) (Tapas *et al.*, 2008).

7-7- Propriétés antivirales

L'activité antivirale des flavonoïdes contre HIV peut être liée directement par leurs effets sur les enzymes responsables de sa réplication (HIV-1 reverse transcriptase ou HIV-1 integrase). Par ailleurs, d'autres flavonoïdes montraient une activité antivirale contre le virus

d'influenza, HIV-1, HIV-2 (Bylka *et al.*, 2004). Quercétine, apigénine, catéchine et hespéridine sont parmi les flavonoïdes caractérisés par leurs propriétés antivirales contre onze types de virus. Les flavonoïdes aglycones pourvus d'un groupement hydroxyle libre en C3 ont montré une bonne activité antivirale, les flavanes sont généralement plus efficaces que les flavones et les flavanones contre HIV-1 et HIV-2 (Tapas *et al.*, 2008).

7-8- Propriétés antiallergiques

Ces effets antiallergiques sont attribués à l'influence des flavonoïdes sur la production de l'histamine. En effet, les flavonoïdes inhibent les enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiésterase et ATP ase Ca^{2+} dépendante, responsables de la libération de l'histamine à partir des monocytes et des basophiles. Par exemple, l'ATP ase Ca^{2+} dépendante dégrade l'ATP produisant ainsi de l'énergie afin de faciliter l'absorption du calcium par les membranes cellulaires, ce qui favorise la libération de l'histamine stockée dans les vésicules. En inactivant cette enzyme, la quercétine a montré un potentiel d'action supérieur à celui du cromoglycate de sodium utilisé comme médicament, en empêchant la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Marfak, 2003).

8- BIODISPONIBILITÉ DES FLAVONOÏDES

Selon Wiseman (1999), la biodisponibilité absolue en pourcentage (%) des flavonoïdes, correspond à la proportion des molécules qui entrent dans la circulation sanguine sous leur forme intacte, après leur consommation en passant à travers la paroi intestinale et le foie.

8-1- Absorption

Tous les flavonoïdes à l'exception de la catéchine (flavanol), sont présents dans les plantes sous forme glycosylés (liés aux sucres par des liaisons β osidiques). Seuls les aglycones peuvent être absorbés par l'intestin grêle, tandis que les glycosides sont hydrolysés tout d'abord en aglycones par l'intermédiaire de la microflore colique, qui dispose des enzymes capables de cliver les liaisons β osidiques (Wiseman, 1999 ; Urquiaga et Leighton, 2000 ; Ming, 2007). Cette même flore microbienne métabolise au même temps les aglycones libérés. Des quantités considérables de catéchines polymériques connus sous le nom de proanthocyanidines, sont présentes dans l'alimentation. Des études montrent que les formes dimères et trimères de catéchine, sont susceptibles d'être absorbés. Tandis que les polymères de degré de polymérisation élevé ne peuvent pas être absorbés par la paroi intestinale, qu'après leurs dégradations (Hollman, 2001).

8-2- Métabolisme

Deux compartiments considérablement importants pour le métabolisme des composés

phénoliques :

8-2-1- Les tissus (foie et les reins).

Des enzymes de biotransformation agissent directement sur les flavonoïdes aglycones, ainsi que sur des métabolites coliques absorbés. Ces enzymes sont principalement localisés au niveau du foie, des reins, ainsi qu'au niveau de l'intestin grêle.

8-2-2- Colon

La microflore colique dégrade les flavonoïdes aglycones libérés (après hydrolyse des glycosides) par ouverture de leur hétérocycle aux différents endroits selon le type de flavonoïde concerné.

✚ les flavonols

Ils sont dégradés en acides phénylacétiques et acides phénylpropioniques,

✚ les flavanols

Produisent les valérolactones (noyau benzénique avec une chaîne latérale de cinq atomes de carbones) et des acides phénylpropioniques,

✚ les flavones et les flavanones

Produisent des acides phénylpropioniques. Ces acides sont encore métabolisés aux dérivés benzoïques. Les groupements hydroxyles des métabolites générés subissent une conjugaison par acide galacturonique sulfate ou par glycine (Hollman, 2001). L'élimination des métabolites des polyphénols se fait par deux voies essentielles d'excrétion : soit par voie biliaire ou par voie urinaire (Mauch, 1998).

CHAPITRE III
ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ
BIOLOGIQUE

9-TECHNIQUES INSTRUMENTALES D'ANALYSES DES FLAVONOÏDES

9-1-CHROMATOGRAPHIE: ASPECTS GÉNÉRAUX

9-1-1- Définition

La chromatographie est une méthode physique de séparation, basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. Selon la technique chromatographique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile résulte soit de leur adsorption et de leurs désorptions successives sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différente dans chaque phase.

On peut classer les méthodes chromatographiques d'après la nature des phases utilisées, ou celle des phénomènes mis en œuvre dans la séparation (Marchal, 1998).

9-1-2- Nature des phases

9-1-2-1- Phase fixe

La phase fixe peut être solide ou liquide. Les solides, silice ou alumine traitées, permettent la séparation des composants des mélanges grâce à leurs propriétés adsorbantes. Ils peuvent être employés comme remplissage d'une colonne (chromatographie par gravité et chromatographie à haute performance ou HPLC), ou étalés en couche mince sur une plaque de verre, d'aluminium, ou sur une feuille de matière plastique (chromatographie sur couche mince ou CCM) (Marchal, 1998).

9-1-2-2- Phase mobile

La phase mobile est soit un gaz (ex: chromatographie en phase gazeuse), la phase mobile est appelée gaz vecteur ou gaz porteur. Soit un liquide (ex: chromatographie sur papier, couche mince ou colonne), la phase mobile est appelée éluant (Marchal, 1998).

10-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

10-1-1-Définition et appareillage

La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre, ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant.

Les principaux éléments d'une séparation chromatographique sur couche mince sont:

- ✚ la cuve chromatographique : un récipient habituellement en verre, de forme variable, fermé par un couvercle étanche.

- ✚ la phase stationnaire : une couche d'environ 0,25 mm de gel de silice ou d'un autre adsorbant.
- ✚ l'échantillon : environ un microlitre (μl) de solution diluée (2 à 5 %) du mélange à analyser, déposé en un point repère situé au-dessus de la surface de l'éluant.
- ✚ l'éluant : un solvant pur ou un mélange, il migre lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon (Marchal, 1998).

10-1-2- Principe de la technique

Lorsque la plaque sur laquelle on a déposé l'échantillon est placée dans la cuve, l'éluant monte à travers la phase stationnaire, essentiellement par capillarité. En outre, chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la plaque stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. L'action de rétention des composés par la phase stationnaire étant principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption. Généralement, en chromatographie sur couche mince, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires.

10-1-3- Applications de la CCM

Lorsque les conditions opératoires sont connues, l'application de la CCM permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé organique. Si l'analyse, réalisée avec divers solvants et différents adsorbants, révèle la présence d'une seule substance, on peut alors considérer que cet échantillon est probablement pur. De plus, étant donné que la chromatographie sur couche mince indique le nombre de composants d'un mélange, on peut l'employer pour suivre la progression d'une réaction.

La chromatographie sur couche mince est également la technique habituellement employée pour rechercher le meilleur solvant, avant d'entreprendre une séparation par chromatographie sur colonne (Marchal, 1998).

10-2- Chromatographie liquide à haute performance

10-2-1- Généralités

La chromatographie liquide haute pression est sans doute la technique d'analyse, de caractérisation d'extraits en composés phénoliques la plus utilisée (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006) car présentant une haute résolution, une reproductibilité élevée et une durée d'analyse relativement courte (Wollgast et Anklam, 2000). Elle peut être employée pour la séparation, la détermination qualitative, quantitative et l'identification des polyphénols.

10-2-2- Principe de la méthode

La méthode HPLC est une technique de séparation, qui implique l'injection d'un petit volume d'échantillon liquide dans une colonne contenant de petites particules de l'ordre de 3 à 5 microns de diamètre appelée phase stationnaire.

Les composants de l'échantillon se déplacent dans la colonne avec la phase mobile de haut en bas par la haute pression exercée par une pompe. Ces composants sont séparés l'un de l'autre par la colonne qui implique des interactions chimiques et/ou physiques diverses entre leurs molécules et les particules de remplissage.

Au niveau du détecteur, chaque composé du mélange sortant de la colonne est détecté donnant un signal ; ce dernier est enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. L'ensemble des pics forme un chromatogramme (Rosset, 1991) (fig.22).

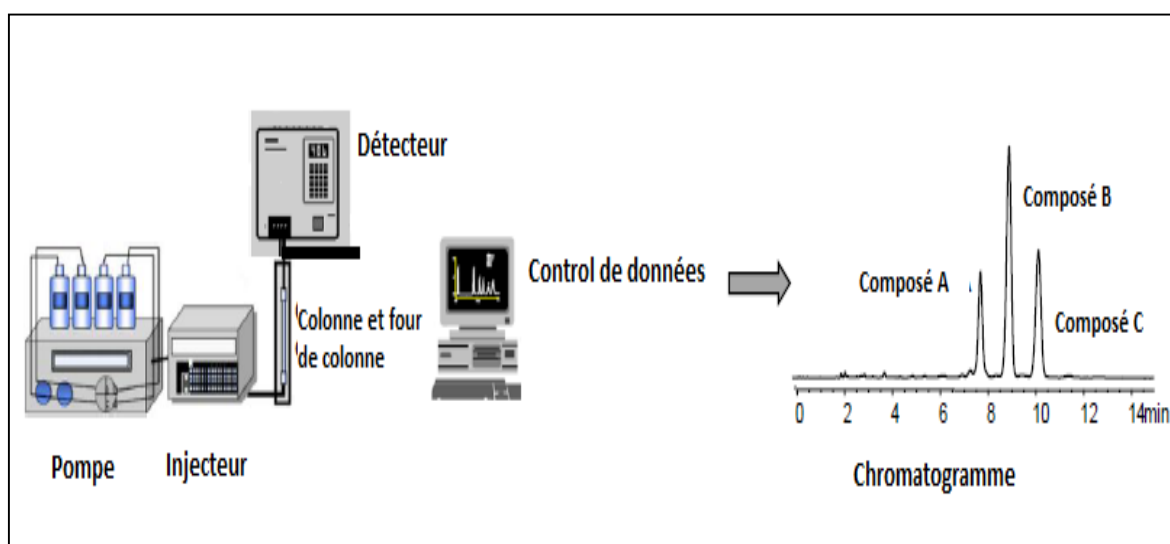


Figure 22 : Principe de l'HPLC

10-2-3- Sélection des solvants utilisés en HPLC

a.1- Propriétés des solvants

La réussite d'une séparation dépend de l'adéquation soluté-phase stationnaire-phase mobile.

En chromatographie, le terme polarité d'un solvant est la résultante des différentes interactions soluté-solvant.

a.2- Solvant et élution

Il est souvent nécessaire en HPLC de faire des mélanges de solvants pour obtenir la polarité souhaitée. Les solvants doivent bien entendu être miscibles entre eux. Il est bon de rappeler que les solvants doivent avoir une qualité HPLC et qu'ils doivent être dégazés.

Lorsque l'eau est utilisée comme solvant, elle doit avoir une résistivité de minimum de 18 Mohms. Le choix du solvant dépend également de la colonne utilisée : type de colonne, domaine pH d'utilisation.

Afin de prévoir l'ordre d'élution des composés, il est nécessaire de connaître le type de colonne, la polarité des produits chimiques, en fonction de leur famille et la force éluante de la phase mobile (classement proche de la polarité du solvant) (Arkanys, 2012).

a.3- Sélection des solvants

Pourtant, en pratique, la plupart des séparations effectuées en chromatographie d'adsorption et de partage sont réalisées avec une dizaine de solvants.

De grandes variations de la sélectivité sont généralement observées lorsque l'on modifie la nature et l'intensité des interactions soluté-solvant. Par exemple, le remplacement dans une phase éluante du méthanol (solvant polaire) par l'éthanol n'entraîne pas de modification notable de la sélectivité, car ces deux solvants sont essentiellement accepteurs de protons, alors que l'addition de chlorure de méthylène (fortes interactions dipôle-dipôle) ou de chloroforme (donneur de protons) provoque d'importantes modifications de la sélectivité.

Les facteurs de capacité sont ajustés en choisissant, dans le premier cas, un solvant de base de type alcane ou cycloalcane n'entraînant aucune sélectivité particulière, et dans le second cas, l'eau qui n'a aucune affinité pour les chaînes alkyle des silices greffées. On peut ensuite, pour une polarité globale fixée, faire varier la sélectivité en sélectionnant un solvant ou des solvants.

a.4- Optimisation

Dans la mise au point d'une séparation, il faut certes, obtenir une résolution satisfaisante, mais aussi prendre en compte certaines contraintes pratiques, telles la durée de la séparation, la perte de charge (généralement limitée vers 200 à 300 bar), la détectabilité (qui doit être aussi bonne que possible dans l'analyse de traces).

10-3- Chromatographie de partage

Elle est fondée sur la différence de solubilité des substances à séparer, dans deux fluides parfaitement miscibles. Elle est mise en pratique en chromatographie sur papier. Un des fluides est un liquide retenu sur un support inerte et constitue la phase stationnaire. L'autre, liquide ou gaz en déplacement, constitue la phase mobile. Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. On peut séparer des solutés dont les coefficients de partage entre les deux phases sont différents. Les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que ceux qui le sont moins. Un autre facteur qui intervient est la polarité de la phase: ainsi en HPLC on peut utiliser des phases stationnaires

peu ou non polaires, la phase mobile étant polaire (eau ou mélange eau - méthanol): on parlera alors de chromatographie de partage à polarité de phase inversée (Marchal, 1998).

10-4- Chromatographie ionique

La phase mobile est une solution tampon aqueuse, et la phase stationnaire la plus courante est constituée de polystyrène sous forme de sphères de quelques micromètres de diamètre, lesquelles ont été chimiquement transformées en surface pour faire apparaître des sites ioniques. Ces phases permettent l'échange de leurs contre-ions mobiles avec des ions, de même signe, présents dans la phase mobile. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases (Marchal, 1998).

10-5- Chromatographie d'exclusion

La phase stationnaire est généralement un polymère poreux, dont les pores ont des dimensions choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise une sorte de tamis à l'échelle moléculaire, dit à perméation sélective. Le coefficient de partition s'appelle dans ce cas le coefficient de diffusion. Cette technique est encore appelée filtration sur gel ou perméation de gel selon la nature de la phase mobile (aqueuse ou organique). Le diamètre des pores est une caractéristique de chaque type de gel.

Un mélange de solutés de masses molaires variables, traverse une épaisseur donnée de gel. Les grosses molécules, celles dont le diamètre est supérieur à celui des pores, sont exclues et éluées les premières. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car incluses, leur migration est freinée en diffusant dans le gel (fig.23).

La séparation est donc réalisée par le fait que les solutés sont élués dans l'ordre inverse des masses molaires (Marchal, 1998).

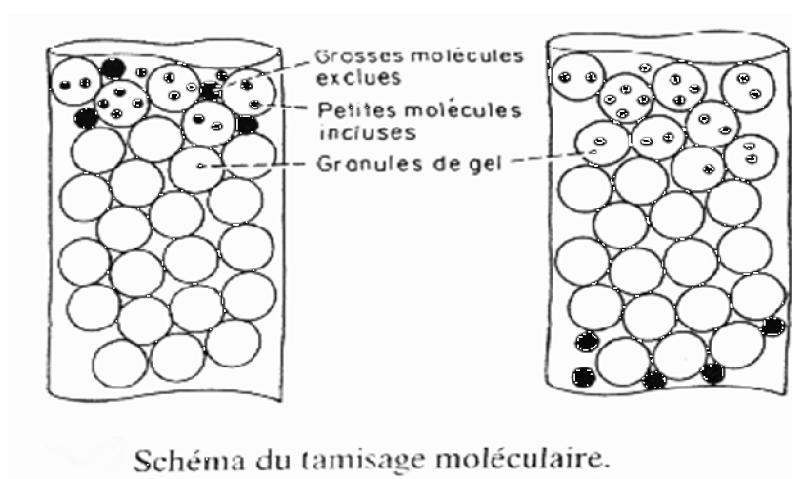


Figure 23 : Chromatographie d'exclusion

10-6- La chromatographie de partage en phase gazeuse

La chromatographie de partage en phase gazeuse utilise comme principe de séparation le partage différentiel des molécules à séparer dans les deux phases stationnaires et mobiles. Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire est un film liquide très fin qui recouvre la surface intérieure d'un tube (la colonne), et la phase stationnaire est un gaz (d'où son nom).

Cette technique nécessite de vaporiser l'échantillon à analyser avant son injection dans la colonne. Pour cela, l'échantillon doit être chauffé. Cela suppose que les molécules d'intérêt ne soient pas dégradées à la température utilisée pour vaporiser l'échantillon. En général, le gaz utilisé est le plus neutre possible. Le plus souvent, on utilise de l'hélium ou de l'azote. L'hydrogène possède également des caractéristiques très intéressantes, mais s'agissant d'un gaz dangereux (risque d'explosion) il est beaucoup moins utilisé (Ladram, 2012).

1-ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE

1-1-GÉNÉRALITÉS

Les bactéries sont des organismes unicellulaires relativement simples de petite taille (0.5 à 1µm de large, à 1 à 3 µm de long), que l'on distingue au microscope optique à fort grossissement. Elles ne possèdent pas de noyau différencié, ce qui les classe dans les procaryotes, mais un chromosome circulaire dépourvu d'une membrane nucléaire.

Ce chromosome qui contient le patrimoine génétique des bactéries, est constitué d'un double brin d'ADN (acide désoxyribonucléique), des plasmides, brin d'ADN cytoplasmique beaucoup plus courts, renferment aussi des informations génétiques qui pourront être échangées avec d'autres bactéries, notamment à la suite de la reproduction sexuée donnant lieu à des conjugaisons bactériennes. Leur reproduction s'effectue plus fréquemment par simple division cellulaire, aboutissant à la formation de deux bactéries filles (reproduction végétative par scissiparité). Ce mode de multiplication très rapide (temps de génération variant d'une vingtaine de minute à quelques heures), permet aux populations bactériennes d'évoluer exponentiellement lorsque les conditions sont favorables.

En fonction des genres, les bactéries présentent une forme variable par leur paroi : sphérique, ellipsoïde, filamenteuse et en bâtonnets. Ces derniers sont mobiles, grâce à la présence de flagelles disposés autour du corps de la bactérie ou à leur extrémités. La présence de ces flagelles et leur localisation contribuent à l'identification des bactéries (Blancard *et al.*, 2003).

1-2-TYPES DE BACTÉRIES

La composition chimique et la structure de la paroi bactérienne permettent de distinguer les bactéries en deux groupes : Gram⁻ et Gram⁺.

1-2-1- Bactéries à Gram négatif

Bactéries qui ne retiennent pas le violet de gentiane dans le procédé de coloration de Gram. Ces bactéries sont enveloppées d'une membrane plasmique, d'une mince paroi de peptidoglycanes, localisés dans le périplasme, entre la membrane cytoplasmique et la membrane cellulaire externe. La paroi donne à la bactérie sa forme, et la protège contre l'éclatement sous l'effet de la très forte pression osmotique du cytosol. Le peptidoglycane assure la rigidité de la paroi. La minceur de la paroi explique le caractère gram-négatif (Mc graw, 2002) (fig. 24).

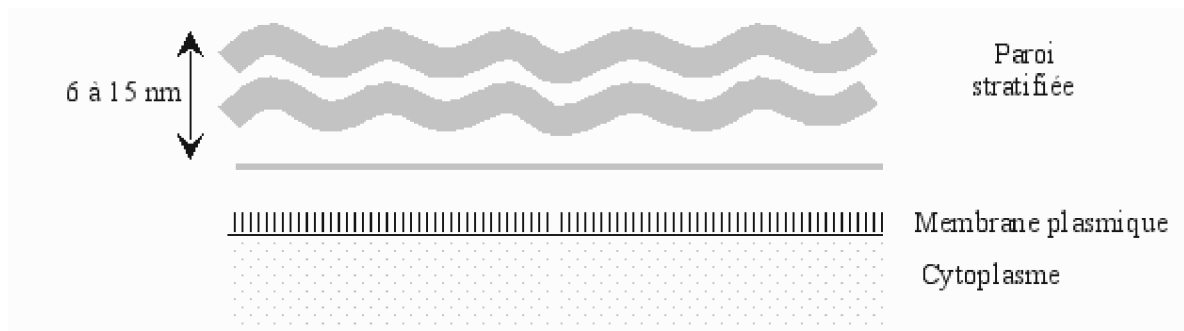


Figure 24 : Paroi des bactéries à Gram négatif (Mc Graw, 2002)

1-2-2- Bactéries à Gram positif

Bactéries qui retiennent le cristal violet dans le procédé de coloration de Gram. Ces bactéries sont enveloppées d'une membrane plasmique doublée d'une épaisse paroi de peptidoglycane (muréine), et dépourvues d'une membrane externe. Le caractère gram-positif est dû à l'épaisseur de la paroi et au taux de pontage élevé du peptidoglycane. La bactérie est néanmoins classée comme gram-positif, si elle n'a pas de membrane externe (fig.25) (Mc Graw, 2002).

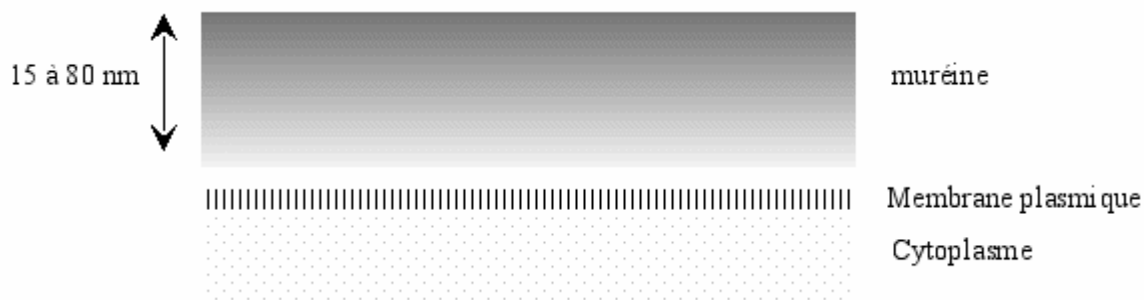


Figure 25 : Paroi des bactéries Gram positif (Mc Graw, 2002)

2- CULTURE DES BACTÉRIES

Au laboratoire, les bactéries peuvent être cultivées en milieu de culture liquide, ou en milieu solide. Le milieu de culture doit apporter les éléments nutritifs, ou nutriments élémentaires à la bactérie. Les milieux de culture gélosés solides sont utilisés pour isoler des cultures pures de cellules bactériennes. Dans le cas des bactéries se divisant rapidement, une cellule bactérienne dispersée sur un milieu gélosé va se multiplier, et au bout de 24 à 48 heures, devenir un amas de bactéries, appelé une colonie bactérienne, visible à l'œil nu.

Le temps de régénération est le temps nécessaire à une bactérie pour se diviser. Le temps de régénération correspond donc au temps nécessaire pour qu'une population de cellules double

en nombre. Ce temps est très variable selon les espèces bactériennes et les conditions environnementales.

La croissance d'une population bactérienne dans un milieu de culture liquide non renouvelé, peut être observée dans le temps. Les cellules se divisent et leur nombre augmente avec le temps. Si on relève le nombre de bactéries à différents intervalles au cours de la croissance, on obtient une courbe de croissance. Elle présente quatre phases principales :

1. la phase de latence correspond à une période d'adaptation de la bactérie au milieu,
2. la phase de croissance exponentielle, durant laquelle les bactéries se développent de façon maximale avec un taux de croissance maximal et constant,
3. la phase transitoire de ralentissement où le nombre de bactéries n'évolue plus : c'est la phase stationnaire. Les divisions bactériennes qui se font encore sont compensées par la mort de bactéries,
4. La phase de mortalité ou de déclin où les bactéries ne se divisent plus, elles meurent et peuvent être lysées. Le milieu de culture n'apporte plus les conditions nécessaires au développement des bactéries. On observe une courbe de décroissance exponentielle progressive (Mc Graw, 2002).

3- LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des substances qui inactivent les bactéries. La plupart des antibiotiques sont produits par des micro-organismes comme les champignons.

Un antibiotique doit:

- ✚ être non toxique ou faiblement toxique.
- ✚ être capable d'atteindre la partie du corps humain où l'infection a lieu.
- ✚ avoir une durée de demi-vie suffisante dans l'organisme.
- ✚ avoir un large spectre d'activité permettant de détruire les bactéries responsables d'infections.

Certains antibiotiques tuent les bactéries (bactéricides), et d'autres inhibent leur croissance (bactériostatiques). Chez les patients avec des défenses immunitaires intactes, l'un ou l'autre type d'antibiotique peut être utilisé, il ne fait qu'aider le système immunitaire à éliminer les bactéries. Par contre, chez les personnes immuno-compromises, les antibiotiques bactériostatiques peuvent se révéler inefficaces (Petignat, 2005).

4-ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS DE PLANTES

Beaucoup de groupes de chercheurs ont étudié l'activité antimicrobienne des extraits de plantes médicinales telles que le Fennel (*Foeniculum vulgare*), Peppermint (*Mentha piperita*), Thym (*Thymus vulgaris*).

Ils ont trouvé que ces extraits sont actifs non seulement contre les bactéries, mais aussi contre les champignons, les levures et les virus (Jürgen *et al.*, 2009).

D'autres groupes de chercheurs ont franchi une étape plus loin. Ils ont isolé et identifié les métabolites responsables de l'activité antimicrobienne des extraits de plantes. Cette étape constitue une plateforme pour plusieurs implications, incluant l'industrie pharmaceutique, la médecine alternative, et la thérapie naturelle (Huang *et al.*, 2008).

5-MÉCANISME D'EFFET ANTIMICROBIEN DES POLYPHÉNOLS

Il est sans doute très complexe, peut impliquer de multiples modes d'actions tels que l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne, ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien (Milane, 2004), dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, ce qui cause une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN (Zhang *et al.*, 2009), des protéines des lipides, la fonction mitochondriale (Balentine *et al.*, 2006) ainsi que la formation des complexes avec la paroi (Gangoué, 2007).

Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être comme conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes, et à l'arrangement de la membrane externe (Shan *et al.*, 2007).

6-DESCRIPTION DES BACTÉRIES ÉTUDIÉS

6-1-ESCHERICHIA COLI

6-1-1- Caractéristiques

Escherichia coli, entéro-invasif, appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'un bacille Gram négatif (Patrick *et al.*, 1988), en forme de bâtonnet, qui peut se déplacer au moyen de flagelles péritriches ou être non mobile, sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm (Steven *et al.*, 2006). Ils peuvent croître dans des conditions aérobiques ou anaérobiques. Les souches d'*E. Coli* ont des caractères biochimiques, génétiques et pathogéniques très proches des espèces du genre *Shigella*.

Les bactéries appartenant à l'espèce *Escherichia coli*, constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches

sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales, des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales.

6-1-2- Pathogénicité et toxicité

E. Coli cause la dysenterie bacillaire, une infection aiguë ulcéreuse du gros intestin (Beylis *et al.*, 2006 ; Hsu *et al.*, 2010). Les bactéries envahissent les cellules du côlon et provoquent une diarrhée aqueuse (qui peut être sanglante), de la fièvre et des crampes abdominales (Nataro, 2007 ; Jones, 2007). Dans les cas graves, la bactérie peut s'attaquer à la muqueuse colique, envahir les cellules épithéliales, se multiplier et provoquer une ulcération de l'intestin. (Beylis *et al.*, 2006).

6-1-3- Mode de transmission

E. Coli est transmis par voie oro-fécale (Wilson *et al.*, 2001 ; Beylis *et al.*, 2006). Les aliments et l'eau contaminés sont les principaux vecteurs de transmission (Wilson *et al.*, 2001 ; Jones, 2007). La transmission de personne à personne peut également se produire (Beylis, 2006).

6-1-4- Période d'incubation

La période d'incubation est de 2 à 48 heures et dure en moyenne 18 heures (Jay *et al.*, 2005).

6-1-5- Transmissibilité

La transmission interhumaine est possible, mais peu courante (Wilson *et al.*, 2001 ; Ryan, 2004 ; Beylis, 2007).

6-1-6- Sensibilité aux médicaments

E. Coli est sensible au carbapénème, à la fosfomycinetrométamol et à la nitrofurantoïne. Les bactéries *E. coli* peuvent être résistantes au chloramphénicol, aux bêta-lactamines, à l'acide nalidixique, à l'ampicilline et à la ciprofloxacine (Beylis, 2007).

6-1-7- Inactivation physique

Les bactéries *E. Coli* peuvent être inactivées par l'ozone (Weavers *et al.*, 2001). Elles sont également sensibles à un traitement par la chaleur, en particulier à des températures de 70 °C ou supérieures (Zhao *et al.*, 2004).

6-1-8- Survie à l'extérieur de l'hôte

Dans les aliments et l'eau, les bactéries *E. coli* peuvent survivre pendant une période allant de 1,5 heure à 16 mois sur des surfaces inertes sèches (Kramer *et al.*, 2006).

7-1-PROTEUS MIRABILIS

7-1-1- Caractéristiques

Les bactéries du genre *Proteus* sont des bacilles (en forme de bâtonnets) Gram négatif, aérobies, mobiles qui font partie de la famille des entérobactéries (Coker *et al.*, 2000 ; Abbot, 2007). Les entérobactéries mesurent habituellement de 0,3 à 1µm de large par 0,6 à 6 µm de long (Abbot, 2007). Il s'agit de bactéries uréase positives, capables d'essaimage lorsqu'elles sont cultivées en milieu solide. Elles font partie de la flore gastro-intestinale normale de l'humain.

7-1-2- Pathogénicité et toxicité

Les espèces du genre *Proteus* sont fréquemment en cause dans les infections des voies urinaires compliquées (Kim, *et al.*, 2003 ; Ronald, 2003 ; Abbot, 2007). Les bacilles sont habituellement observés dans les voies urinaires hautes (siège fréquent de l'infection), et peuvent entraîner des urolithiases (formation de pierres dans le rein ou la vessie) (Coker, *et al.*, 2000 ; Abbot, 2007), des cystites (Coker *et al.*, 2000) et des pyélonéphrites aiguës. Des cas de septicémies et d'infection des plaies imputables à des bactéries du genre *Proteus* ont aussi été signalés (Kim, *et al.*, 2003). Après fixation aux parois et colonisation des voies urinaires, les bacilles libèrent de l'uréase, qui catalyse la conversion de l'urée en ammoniacque et en CO₂ (Ronald, 2003 ; Abbot, 2007). Il en résulte une diminution du pH urinaire et éventuellement, la formation de calculs rénaux ou vésicaux. *P. mirabilis* est l'espèce du genre *Proteus* la plus souvent en cause en présence d'une infection.

7-1-3- Épidémiologie

Les bacilles font partie de la flore intestinale normale de l'humain, et sont aussi ubiquistes dans l'environnement. On les retrouve entre autres chez les animaux de même que dans le sol et l'eau polluée.

Les espèces du genre *Proteus* sont habituellement considérées comme pathogènes chez les jeunes patients, et opportunistes chez les patients âgés (Coker *et al.*, 2000). Le taux d'infection est supérieur chez les personnes âgées, notamment chez les patients porteurs d'une sonde à demeure (cathétérisme de longue durée), ou recevant une antibiothérapie fréquente (Coker, 2000 ; Kim *et al.*, 2003 ; Ronald, 2003). Les autres groupes à risque comprennent les garçons et les filles prépubères, le plus haut taux d'infection étant observé chez les garçons non circoncis.

7-1-4- Période d'incubation

La période d'incubation est inconnue.

7-1-5- Transmissibilité

Il n'y aurait aucune transmission directe entre humains.

7-1-6- Sensibilité aux médicaments

Les espèces du genre *Proteus* sont généralement sensibles aux céphalosporines, aux aminoglycosides et à l'imipénem à large spectre (Abbot, 2007). *P. mirabilis* est aussi sensible à l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole, à l'ampicilline, à l'amoxicilline et à la pipéracilline. *P. mirabilis* est résistant à la nitrofurantoïne, et elle peut aussi développer une résistance à la ciprofloxacine.

7-1-7- Inactivation physique

Les bactéries sont habituellement sensibles à la chaleur humide (121 °C pendant au moins 15 mn) et à la chaleur sèche (160 à 170 °C pendant au moins 1 heure) (Kramer *et al.*, 2006).

7-1-8- Survie à l'extérieur de l'hôte

Les bactéries du genre *Proteus* ne peuvent survivre que quelques jours sur les surfaces inanimées. Leur survie est bonne dans l'environnement, soit dans le sol, l'eau et les eaux usées (Abbot, 2007).

8-1-BACILLUS CEREUS

8-1-1- Caractéristiques

Les souches de *B. cereus* sont constituées de bacilles Gram positif de 1,4 µm habituellement observés en paires ou en chaînettes courtes (Murray, *et al.*, 2007). *B. cereus* est anaérobie facultatif, mobile et capable de former des endospores, et ses colonies blanches d'aspect granuleux font entre 2 et 7 mm de diamètre (Logan, *et al.*, 2006). Une croissance est observée à des températures se situant entre 10-20 °C et 35-45 °C. La température optimale étant d'environ 37 °C (Logan, *et al.*, 2006 ; Murray, *et al.*, 2007). Le bacille peut produire six types de toxines, à savoir cinq entérotoxines et une toxine émétique, qui peuvent être thermostables ou thermolabiles selon les souches (Logan, *et al.*, 2006).

8-1-2- Pathogénicité et toxicité

B. cereus est responsable d'intoxications alimentaires spontanément résolutive (24-48 heures) de deux types (syndrome diarrhéique et syndrome émétique), ainsi que d'infections opportunistes; il est aussi associé à certaines infections cliniques, comme l'endophtalmie et d'autres infections oculaires (Robovitz, *et al.*, 1998 ; Logan, *et al.*, 2006 ; Le Scanff *et al.*, 2006). La forme diarrhéique de l'intoxication à *B. cereus* est caractérisée par la présence de crampes abdominales, d'une diarrhée aqueuse profuse et d'un ténésme rectal parfois associés à de la fièvre et à des vomissements. La forme émétique de l'intoxication

alimentaire à *B. cereus* est quant à elle caractérisée par la présence de nausées, de vomissements et d'une sensation de malaise parfois associés à une diarrhée (Logan *et al.*, 2006). *B. cereus* peut aussi être responsable d'infections des plaies, de bactériémies, de septicémies, de méningites, de pneumonies, d'infections du système nerveux central, d'endocardites, de péricardites, d'infections respiratoires et d'infections périphériques (Drobniewski, 1993 ; Rozovitz, *et al.*, 1998 ; Logan, *et al.*, 2006). Chez les patients immunodéprimés, l'infection peut être mortelle (Le Scannff *et al.*, 2006).

8-1-3- Gamme d'hôtes

Le bacille touche les animaux et les humains en particulier, les patients immunodéprimés, les utilisateurs de drogues par injection et les nouveau-nés (Robovitz, *et al.*, 1998 ; Logan, *et al.*, 2006 ; Murray, *et al.*, 2007).

8-1-4- Sources du danger

B. cereus est retrouvé sous forme de spores dans le sol, à des concentrations de l'ordre de 10⁴ à 10⁵ spores par gramme de sol. Les spores seraient dormantes dans le sol, et se développeraient plutôt dans la faune du sol, par exemple dans le tube digestif d'insectes, d'arthropodes et de lombrics (Guinebretière *et al.*, 2008).

8-1-5- Mode de transmission

La principale voie de transmission de cette bactérie à l'Homme est alimentaire. En effet, de par son abondance dans le sol et la résistance de ses spores, *B. cereus* peut contaminer pratiquement toutes les catégories d'aliments et particulièrement les végétaux.

Le syndrome émétique est fortement associé à la consommation de riz et de pâtes alimentaires, tandis que le syndrome diarrhéique est principalement attribuable à la consommation de produits laitiers, de légumes et de viande.

Des produits secs ou déshydratés tels que les épices, les herbes aromatiques, certains légumes, les céréales et les farines, sont fréquemment contaminés à des niveaux variables par *B. cereus*. Ces matières premières entrant dans la composition d'un produit fini, sont des sources potentielles de contamination. Par ailleurs, les spores de *B. cereus* possèdent de fortes capacités d'adhésion aux surfaces en acier inoxydable, et peuvent s'accumuler dans les équipements de transformation qui peuvent alors devenir des réservoirs de spores. Les risques pour le consommateur, sont le plus souvent liés à une multiplication de *B. cereus* lors de l'exposition des aliments à des températures inappropriées (Anses, 2011).

Des infections à *B. cereus*, différentes de celles transmises par les aliments ont été décrites. *B. cereus* forme des spores et se propage facilement en milieu hospitalier. Les portes

d'entrée de l'infection sont des contaminations de plaie ou de cathéter ou encore via les injections pratiquées par les toxicomanes (Barrie, *et al.*, 1992 ; Kotiranta, *et al.*, 2000).

8-1-6- Période d'incubation

La forme diarrhéique de l'intoxication à *B. cereus* est associée à un délai d'apparition de 8 à 16 heures tandis que la forme émétique apparaît en 1 à 6 heures. Dans les deux cas, il y a habituellement résolution complète des symptômes en 24 heures (Logan, *et al.*, 2006 ; Murray, *et al.*, 2007).

8-1-7-Transmissibilité

Aucune transmission directe entre humains.

8-1-8- Sensibilité aux médicaments

B. cereus est sensible à l'imipénem et à la vancomycine; la plupart des souches sont aussi sensibles au chloramphénicol, aux aminosides, à la ciprofloxacine, à l'érythromycine et à la gentamicine (David, 1994 ; Robovitz, *et al.*, 1998 ; Logan *et al.*, 2006 ; Murray *et al.*, 2007).

Certaines souches présentent une sensibilité modérée à la clindamycine et à la tétracycline (Murray *et al.*, 2007) . L'administration précoce d'une association clindamycine -gentamicine constitue le meilleur traitement des infections ophtalmiques à *B. cereus*.

8-1-9- Résistance aux médicaments

B. cereus produit de grandes quantités de β -lactamases et est résistant à la pénicilline, à l'ampicilline, aux céphalosporines et au triméthoprim (David, 1994 ; Robovitz *et al.*, 1998 ; Logan *et al.*, 2006 ; Murray *et al.*, 2007).

8-1-10- Inactivation physique

B. cereus peut être inactivé par un traitement par champ électrique, pulsé en solution saline (0,15 % de NaCl) (Cserhalmi *et al.*, 2002). Bien que les spores de *B. cereus* puissent être résistantes à la chaleur et au rayonnement, une exposition à une température de 100 °C pendant 5 minutes entraîne des lésions de la membrane cellulaire et des ribosomes (Silva et Sousa, 1972). Un rayonnement gamma de 2 à 5 kGy est nécessaire à l'inactivation de *B. cereus* (Abostate *et al.*, 2006).

2-2- GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS

2-2-1- Définition

Les champignons ou « mycètes » ou « fongiques » sont des organismes eucaryotes, hétérotrophes, unicellulaires ou filamenteux qui n'ont pas d'organisation tissulaire, et la masse cytoplasmique est enfermée dans une structure pariétale rigide qui constitue le thalle ou mycélium (Murrey *et al.*, 2008).

2-2-2- Caractéristiques structurales

Les champignons sont caractérisés par une paroi cellulaire qui contient des glucanes, des mannanes et la chitine. La membrane cellulaire des champignons est constituée de stérols (l'ergostérol principalement) et un cytoplasme dépourvu de chlorophylle. La plupart des champignons possèdent un mycélium constitué de tubes appelés hyphes. Chez les champignons supérieurs, les hyphes sont cloisonnés ou septés, tandis que chez les champignons inférieurs ou primitifs, les cloisons intercellulaires sont rares (Stevens *et al.*, 2006).

Les champignons les plus simples sont les levures (unicellulaires) et peuvent être regroupés selon leur mode de reproduction en levures vraies (issues d'une reproduction sexuée), et levures imparfaites (issues d'une reproduction asexuée). Les autres champignons, pluricellulaires, sont pour la plupart filamenteux (Alexopoulos *et al.*, 1996).

2-2-3- Reproduction

La reproduction des champignons est complexe, reflétant ainsi l'hétérogénéité de leur mode de vie. Elle peut être sexuée ou asexuée, bien que certains champignons alternent entre les deux types de reproduction.

2-2-3-1-Reproduction asexuée

La reproduction asexuée se fait sans fusion de gamètes. C'est un mode de reproduction commun à presque tous les champignons. La reproduction asexuée chez les champignons peut se faire par bourgeonnement, fission binaire, fragmentation, ou par formation de spores (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Le bourgeonnement et la fission binaire

Le bourgeonnement et la fission binaire sont les formes de reproduction asexuée les plus simples. Le bourgeonnement est une division inégale du cytoplasme, résultant en une cellule parent et une cellule fille, celle-ci étant plus petite que les cellules parent. La fission binaire par contre aboutit à deux cellules identiques. Ces deux formes de reproduction suivent la mitose.

La fragmentation et la sporulation

La fragmentation est une forme de reproduction asexuée, où un nouvel organisme se développe à partir d'un fragment parent. La sporulation est la plus importante forme de reproduction asexuée chez les champignons. Elle se fait à travers les spores asexuées, formées au cours de la phase asexuée du cycle de vie des champignons (phase anamorphe). Suite à une mitose, ces spores se transforment en cellules reproductives appelées mitosporos qui, après dispersion, se développent en de nouveaux organismes. Après fragmentation du protoplasme

en plusieurs parties, il se forme des parois autour des prospores, puis la maturation s'arrête et les parois disparaissent. Le protoplasme devient moins dense et les prospores fusionnent pour donner une nouvelle cellule végétative, puis le bourgeonnement commence.

2-2-3-2- Reproduction sexuée

Pour qu'une reproduction sexuée se réalise, il est nécessaire d'avoir deux noyaux haploïdes capables de s'accoupler, ou un seul noyau diploïde. Les deux noyaux haploïdes doivent d'abord fusionner pour donner un noyau diploïde qui subit par la suite une méiose. Cette méiose est à l'origine de la variation au sein de la progéniture fongique. Ces événements sont suivis par la formation de spores (les ascospores, les basidiospores, zygosporos), dont le processus varie en fonction des différentes classes de champignons (Deacon, 2005).

Plusieurs champignons alternent entre la reproduction sexuée et asexuée, dépendant des conditions. A titre indicatif, la moisissure du genre *Dictyostelium* effectue une fission binaire lorsque les conditions sont favorables. Mais lorsque celles-ci deviennent défavorables (dessiccation, rayons UV, augmentation ou baisse de la température), le champignon procède à une reproduction sexuée qui aboutit à la formation de spores. Certains champignons échangent également leur matériel génétique par des processus parasexués. La fréquence et l'importance relative de ce mode de reproduction ne sont pas bien claires et peuvent être inférieures comparées à celles de la reproduction sexuée. Mais, ce mode de reproduction est nécessaire dans l'hybridation qui est associée à l'évolution des espèces fongiques (Déacon, 2005).

2-2-4- Classification

La classification des champignons est généralement basée sur les caractéristiques de leurs structures de reproduction qui permettent de distinguer quatre classes de champignons :

2-2-4-1- Zygomycètes

Les champignons de ce groupe ont la particularité de croître rapidement. Ils possèdent des cellules non mobiles et des hyphes non septés.

Les zygomycètes peuvent se reproduire sexuellement et asexuellement. La reproduction sexuée aboutit à la production de zygosporos, spores immobiles à parois épaisses. La reproduction asexuée aboutit quant à elle à des spores (chlamydoconidies, sporangiosporos) contenues dans un sporange issu de sporangiophores simples ou branchés. Le *Rhizopus stolonifer* est une espèce courante qui appartient à ce groupe (Alexopoulos *et al.*, 1996).

2-2-4-2- Hyphomycètes

Tous les champignons connus de ce groupe se reproduisent de façon asexuée par des conidies (Redecker et Raab, 2006). Les hyphes sont septés et présentent des pores simples.

Cette classe contient la majorité des champignons d'importance médicale tels que les dermatophytes.

2-2-4-3- Ascomycètes

Les ascomycètes possèdent des hyphes septés présentant de simples pores qui permettent une migration cytoplasmique et nucléaire. La reproduction sexuée aboutit à la formation d'ascospores endogènes dans un ascus, contrairement à la reproduction asexuée qui aboutit à des conidies. On retrouve dans ce groupe des champignons tels que *Pneumocystis jirovecii* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

2-2-4-4- Basidiomycètes

Les basidiomycètes possèdent des hyphes septés à pores complexes appelés dolipores, permettant une migration cytoplasmique. Ils produisent sexuellement des spores exogènes appelées basidiospores. On retrouve dans ce groupe des champignons tels que *Ustilago maydis*, les espèces commensales de l'Homme du genre *Malassezia* et le pathogène opportuniste de l'Homme *Cryptococcus neoformans* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

2-2-5- Importance des champignons

2-2-5-1- Utilité des champignons

Les champignons sont d'un grand intérêt pour l'homme dans plusieurs domaines d'activité :

en industrie agroalimentaire, certains champignons, à l'instar de la levure *Saccharomyces cereviceae*, sont utilisés en fromagerie et en pâtisserie, mais également dans la production de boissons alcooliques par fermentation (Piskur *et al.*, 2006).

En écologie, les champignons saprophytes participent au maintien de l'équilibre écologique en libérant dans l'environnement, à partir de la matière qu'ils décomposent, du carbone et des sels minéraux (Ronald, 2005).

En biotechnologie, les champignons tels que *Ashbya gossypii*, sont exploités dans la production de vitamines A, B ou D (Santos *et al.*, 2005).

En pharmacie, plusieurs espèces de champignons sont utilisées pour la synthèse de médicaments. Le polysaccharide K, produit chimique dérivé de *Trametes versicolor*, est utilisé comme adjuvant dans le traitement du cancer (Fisher et Yang, 2002).

Bien que les champignons soient exploités dans tous ces domaines, plusieurs sont des parasites des plantes, des animaux et de l'homme.

2-2-5-2- Méfaits des champignons

Les champignons envahissent occasionnellement l'air que nous respirons par l'intermédiaire de leurs spores disséminées par le vent. Ces spores sont responsables de

certaines allergies et maladies graves. L'aspergillose pulmonaire par exemple, est une maladie de l'appareil respiratoire, causée par inhalation des spores de moisissures du genre *Aspergillus* (Kamanfu *et al.*, 1993).

Plusieurs champignons produisent des composés biologiquement actifs, parmi lesquels des mycotoxines. A titre indicatif, les espèces d'*Aspergillus*, notamment *Aspergillus flavus*, produisent des aflatoxines, toxines du foie qui croissent dans ou sur les graines d'arachides. La consommation de ces graines contaminées conduit à une aspergillose hépatique récurrente dans le tiers-monde (Maslin, 2004).

Certains champignons peuvent causer des maladies graves voire fatales si elles ne sont pas traitées. Les levures du genre *Candida* sont responsables du muget chez les nouveaux nés caractérisé par un dépôt blanchâtre sur la langue.

Les champignons s'attaquent également aux plantes et constituent un obstacle considérable pour l'agriculture. Parmi ces champignons phytopathogènes, on peut citer *Phytophthora infestans*, responsable du mildiou des solanacées (Tamokou, 2002).

2-2-6- Les antifongiques

Les antifongiques sont des préparations médicamenteuses, soignant les infections dues aux champignons de façon générale. Parmi eux, certains sont modernes et d'autres traditionnels (Diaza, 2007).

2-2-6-1- Les antifongiques modernes

Les antifongiques modernes sont des antibiotiques mis au point grâce à leur mode d'action dans les infections superficielles, par des levures ou des champignons (peau, tractus digestif).

2-2-6-2- Les antifongiques traditionnels

Un grand nombre des plantes médicinales ont une action antifongique. Parmi les plantes, nous citons la mélisse (*Melissa officinalis*), le tournesol (*Helianthus annuus*), Dartur (*Cassia allata*), sésame (*Sesamum indicum*), papayer (*Carica papaya*) (De Clerck, 1986 ; Diaza, 2007) qui soignent la mélisse cutanée. Certaines d'autres ont fait leurs preuves au laboratoire, mais qui restent dans les déclarations des utilisateurs, sans aucune vérification scientifique.

2-3-DESCRIPTION DES CHAMPIGNONS ÉTUDIÉS

2-3-1- Généralités sur *Candida albicans*

2-3-1-1- Définition

Candidas albicans est une levure filamenteuse de la peau et des muqueuses qui dans des conditions particulières provoquent des infections aiguës, subaiguës ou chroniques de la peau, des muqueuses et plus rarement viscérales et généralisées (Mpona, 2008).

2-3-1-2- Épidémiologie

Certains candidas sont normalement saprophytes des muqueuses ou de la peau en équilibre compétitif avec la flore bactérienne.

Les candidoses superficielles sont généralement induites par une modification locale ou générale du terrain qui permet au *Candida* de se développer : ils deviennent pathogènes et engendrent des lésions de la peau et des muqueuses, plus rarement elles résultent d'un apport exogène de champignons : contaminant vénérien pour les candidoses génitales, contamination du nouveau-né lors de l'accouchement si la mère est atteinte de candidose vaginale.

Les candidoses profondes sont parfois secondaires à une candidose superficielle qui s'étend par continuité (atteinte digestive ou respiratoire à point de départ génital). L'apparition et l'extension des candidoses sont favorisées par des nombreux facteurs. La macération favorise les candidoses cutanées ; les applications locales d'antibiotiques peuvent provoquer des candidoses muqueuses (Brouhet, 2000 ; Mpona, 2008).

2-3-1-3- Sensibilité aux médicaments

Sensible à la nystatine, au clotrimazole, au kétoconazole, au fluconazole, à l'amphotéricine B pour la candidose envahissante (FTSS, 2001).

2-3-1-4- Inactivation par des moyens physiques

Inactivé par la chaleur humide (121 °C pendant au moins 15 minutes) (FTSS, 2001).

2-3-1-5- Survie à l'extérieur de l'hôte

Survit à l'extérieur de l'hôte, particulièrement dans les endroits sombres et humides (FTSS, 2001).

2-4-2- Généralités sur *Aspergillus*

2-4-2-1- Définition

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux de type moisissure dont la colonie se présente sous forme duveteuse. Le thalle hyalin présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés terminés en vésicule (Verweij *et al.*, 2007) .

2-4-2-2- Répartition

Les *Aspergillus* ont une répartition mondiale. Ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires et les céréales. Ils sont présents dans l'environnement humain, notamment dans les plantes, les fruits, la poussière, l'air. On trouve de 1 à 20 spores par mètre cube. Nous inhalons entre 10 à 30 spores par jour (Ryan, 2004).

2-4-2-3- Les incidences

Les *Aspergillus* sont très utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des biotechnologies, notamment pour la fermentation, la production d'enzymes, la production d'acides organiques et la production d'antimicrobiens.

2-4-2-4- Maladie et dégâts

Généralement, les *Aspergillus* n'attaquent pas les plantes pendant leur pleine croissance. Pour la plupart, ce sont des saprophytes classiques qui à la faveur de blessures pénètrent dans certains fruits ou sur les porte-graine, surtout par temps chaud et humide. Lorsque les graines sont récoltées humides (ou qu'elles s'humidifient lors du stockage). Les *Aspergillus* évoluent rapidement et se transforment en parasites ce qui entraîne une diminution de la faculté germinative.

2-4-2-5- Localisation sur la graine

Aspergillus est localisé sous formes de spores à la surface de la graine ou sous forme de mycélium dans les téguments ou au niveau de l'embryon.

2-4-2-6- Fréquence d'apparition

Le taux d'infection est très variable, il dépend essentiellement des conditions climatiques et des conditions de récolte. Durant les années sèches, les semences de céréales peuvent ne présenter aucune attaque d'*Aspergillus*. Il est donc impératif de surveiller le taux d'humidité des lots de semences avant et pendant le stockage.

PARTIE II
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1-MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Notre travail consiste d'une part à quantifier et à qualifier par les différentes techniques d'extractions et de caractérisation (CCM et HPLC), les composés flavonoïques présents dans différents extraits organiques obtenus à partir des graines (akènes) de *S. marianum* en utilisant des standards tels que la sylibine, la catéchine et la naringine disponibles au niveau de notre laboratoire. L'activité antimicrobienne des extraits flavonoïques a été testée sur trois souches bactériennes (*B. cereus* ATCC 10876, *E. coli* ATCC 25922, *P.mirabilis* 35659) et deux souches fongiques (*C. albicans* ATCC 10231 et *A. brasiliensis* ATCC 16404).

Notre choix a porté sur les akènes qui constituent la partie de la plante la plus intéressante, vu sa richesse en principes actifs, notamment la sylibine ayant des propriétés médicamenteuse et curative (Volak et Stodola, 1984 ; Talaj *et al.*, 1989 ; Varro et Tyler, 1994 ; Foster, 1995 ; Morazzoni et Bombardelli, 1995 ; Widmer, 1999 ; Anderson et Fletcher, 2001 ; Ody, 2002). C'est la partie majoritairement utilisée en phytothérapie et inscrite dans la pharmacopée. Le reste de la plante (feuilles et tiges) sont peu utilisées et sont surtout riches en matières azotées, minérales (cendre, calcium, magnésium, potassium, sodium et phosphore) et organiques possédant une valeur agronomique et zootechnique et utilisées comme fourrage pour le bétail et engrais vert (Amrani, 2006).

La récolte des graines a eu lieu au mois de juin 2013 (période correspondant à la phase de maturation et de sénescence du taxon étudié) au niveau des monts de Tessala (wilaya de Sidi Bel Abbés), dans une station de latitude nord 35°16'16", de longitude ouest 0°45'48" et d'altitude 792 m.

2-PRÉSENTATION DU SITE DE PRÉLÈVEMENT

2-1-Situation géographique

Les monts de Tessala présentent une grande diversité biologique, ils sont situés au nord de la wilaya de Sidi Bel Abbes, limités au nord par la plaine de la Mleta et la sebkha d'Oran, à l'est par les monts des Béni Chougrane, à l'ouest par les monts de Sebaa Chioukh et au sud par la plaine de Sidi Bel Abbes. Les monts de Tessala font partie de l'Atlas tellien, ils s'étirent du sud-ouest au nord-est sur une distance de 50 à 60 km (Kiekken, 1962) (fig. 26).

La hauteur des reliefs, relativement aplanis, s'établit entre 500 et 1 000 m d'altitude en culminant à 1061 m au djebel Tessala. Le versant sud apparaissant moins abrupt que le versant nord, ils ont des pentes fortes fréquemment supérieures à 25% sur l'ensemble du djebel Tessala (Bneder, 1990).

2-2- Aspect lithologique

Les principales unités lithologiques rencontrées dans la commune de Tessala sont représentées par Bneder (1992) :

- ✚ les marnes sont représentées par des marnes calcaires et marnes argileuses qui constituent 44% de la superficie totale. Elles sont rencontrées surtout dans la partie Nord et Nord-ouest de la commune ;
- ✚ le deuxième substrat est le calcaire marneux, grès et marne calcaire de l'éocène qui compte 19% de la superficie totale. Il se trouve surtout dans la partie Sud-est ;
- ✚ les marnes grises sont représentées avec 16%; ils sont localisés dans la partie extrême Sud de la commune de Tessala ;
- ✚ les marnes finement sableuses qui occupent 4% de la superficie totale. elles sont localisés dans la partie Sud ouest ;
- ✚ l'argilite, gypse, dolomie noire, ophites avec un pourcentage de 15%; ce substrat est localisé au niveau du haut versant de djebel Tessala.

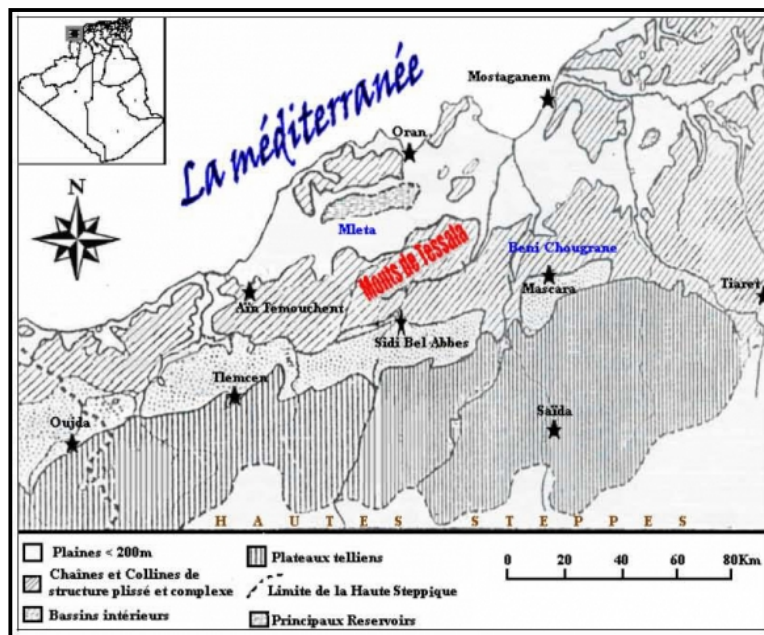


Figure 26 : Localisation géographique des monts du Tessala (Kiekken, 1962).

2-3- Aspect pédologique

Le Djebel Tessala, comme l'ensemble des monts du Tessala, est essentiellement constitué de roches peu résistantes à l'érosion. La plupart des sols appartiennent à la classe des sols minéraux bruts lithosols et régosols de la classification française. On trouve également quelques rendzines. Les sols bruns calciques sont rares (Benyahia *et al.*, 2001).

3- CARACTÈRES CLIMATIQUES

Le climat de l'Algérie a fait l'objet de nombreuses études analytiques et synthétiques, notamment par Seltzer (1946), Emberger (1954), Bagnouls et Gausson (1957), Chaumont et Paquin (1971), Stewart (1975), Bottner (1981), Le Houerou (1995).

Tous ces auteurs s'accordent à reconnaître l'intégration du climat Algérien au climat méditerranéen, caractérisé par une saison sèche et chaude coïncidant avec la saison estivale, et une saison froide et pluvieuse en coïncidence avec la saison hivernale. En Algérie, cette pluviométrie peut être soumise à l'orographie et aux influences maritimes. En effet, tous les auteurs qui ont étudié la pluviométrie en Algérie ont montré que la répartition de la pluie subit trois influences. Il s'agit de l'altitude, les conditions de topographie, de la longitude et enfin celle de l'éloignement de la mer.

3-1- Pluviométrie

La pluviométrie varie en fonction de l'éloignement de la mer et de l'exposition des versants par rapport aux vents humides (Djebaili, 1984).

Connaissant la fluctuation des précipitations, une étude diachronique comparée entre deux périodes, ancienne de 1913-1938 (Seltzer, 1946) et récente de 1980-2010 (O.N.M, 2011), a été réalisée.

Le tableau 2 récapitule la pluviométrie moyenne mensuelle selon les travaux de Seltzer (1946) sur une période de 25 ans (1913-1938).

Tableau 2: Précipitations moyennes mensuelles de la région de Tessala (1913-1938).

Mois	J	F	M	A	Ma	Ju	Jt	At	S	O	N	D	Total
Précipitations (mm)	83	82	63	51	42	12	1	3	16	46	88	94	581

L'analyse de ce tableau montre un régime saisonnier du type HPAE avec une tranche pluviométrique annuelle et saisonnière assez bien répartie.

Les données de la période 1980-2010 montrent une différence notable tant dans les précipitations que dans les températures. Cette différence se traduit par une nette tendance vers un cycle de sécheresse.

Dans la région de Tessala, la pluviométrie est relativement faible. Elle n'excède qu'exceptionnellement les 400 mm par an, selon l'analyse des relevés réalisés sur 30 ans. La moyenne interannuelle des pluies enregistrées depuis 1980 à 2010 est de 335,34 mm.

Cependant, l'analyse quantitative des apports pluviométriques annuels relevés sur cette même période indique une évolution irrégulière des précipitations d'une année à l'autre et met en relief une variation régressive dans son ensemble avec le temps (tab.3).

Tableau 3 : Variation des précipitations moyennes annuelles (1980-2010) (O.N.M, 2011)

Année	1980	1985	1990	1995	2000	2005	2010
Précipitations (mm)	400	220	400	380	300	280	320

3-2- Température

Les températures moyennes minimales et maximales enregistrées durant la période 1980-2010 montrent des maxima respectifs de 35.9 °C au mois de juillet et 35.5°C au mois d'août et des minimas respectifs de 2.5°C au mois de janvier et 3.3°C au mois de décembre. Quant aux températures moyennes, elles augmentent avec un maximum en juillet, soit 26.6°C et un minimum en janvier avec 9.1°C.

3-3- Les vents

Les vents soufflent fréquemment dans les directions instables et à différentes intensités en fonction des saisons. Les vents les plus fréquents de novembre à avril sont les vents du Nord- ouest secs et froids. Les vents du Sud-ouest sont secs et chauds, dessèchent davantage le sol et ont un effet néfaste sur les plantes (tab.4).

Tableau 4 : Moyennes mensuelles de la vitesse des vents en m/s, période (1987-2003) (O.N.M, 2007)

Mois	J	F	M	A	Ma	Ju	Jt	At	S	O	N	D
Moyennes mensuelles	2.5	2.27	2.48	2.95	2.71	2.63	2.34	2.26	2.15	2.04	2.43	2.45

3-4- La gelée

La période critique se situe du mois de décembre au mois de février, elle se distingue par une fréquence inquiétante en période printanière au moment où la végétation est en période de floraison (tab.5). Elle devient ainsi nocive pour les plantes causant souvent des dégâts importants.

Tableau 5 : Fréquences moyennes mensuelles des gelées (période 1985-2007) (O.N.M)

Mois	J	F	M	A	Ma	Ju	Jt	At	S	O	N	D
Fréquences Moyennes	20	10	5	0	0	0	0	0	0	0	6	12.5

3-5- L'humidité

L'humidité est supérieure à 70 % sur les 6 mois de l'année (octobre – mars). Le maximum est enregistré en saison hivernale (80 %), alors que le minimum (50%) est observé en été (tab. 6).

Tableau 6 : Moyennes mensuelles du taux d'humidité relative (période 1985-2007)

Mois	J	F	M	A	Ma	Ju	Jt	At	S	O	N	D
Moyennes mensuelles (%)	78	77	70	68	65	56	50	52	63	70	73	80

3-6- Diagramme ombrothermique de Bagnouls et Gausson

Selon Bagnouls et Gausson (1957), un mois est considéré sec lorsque le total des précipitations P , exprimé en mm, est égal ou inférieur au double de la température moyenne T du mois, exprimée en degré centigrade. Partant de ce principe, la durée et l'importance de la période sèche peuvent être déterminées par le diagramme ombrothermique proposé par ces deux auteurs. Ce diagramme est obtenu par un graphique où les mois de l'année sont en abscisses, les précipitations moyennes mensuelle (p en mm) en ordonnées de gauche, les températures (T en degrés centigrades) en ordonnées de droite. La période sèche s'individualise lorsque la courbe des précipitations passe sous celle des températures. Les figures 27 et 28 représentent la courbe ombrothermique de la région de Tessala (ancienne et nouvelle période), station pour laquelle nous disposons des données thermiques et pluviométriques.

Ce diagramme permet de fixer le début et la fin d'une période sèche. La comparaison des diagrammes ombrothermiques des deux périodes (fig. 27 et 28), ancienne et récente, montre un allongement de la période sèche de 5 mois environ (Seltze, 1946) à 6 mois selon les données récentes (ONM, 2011).

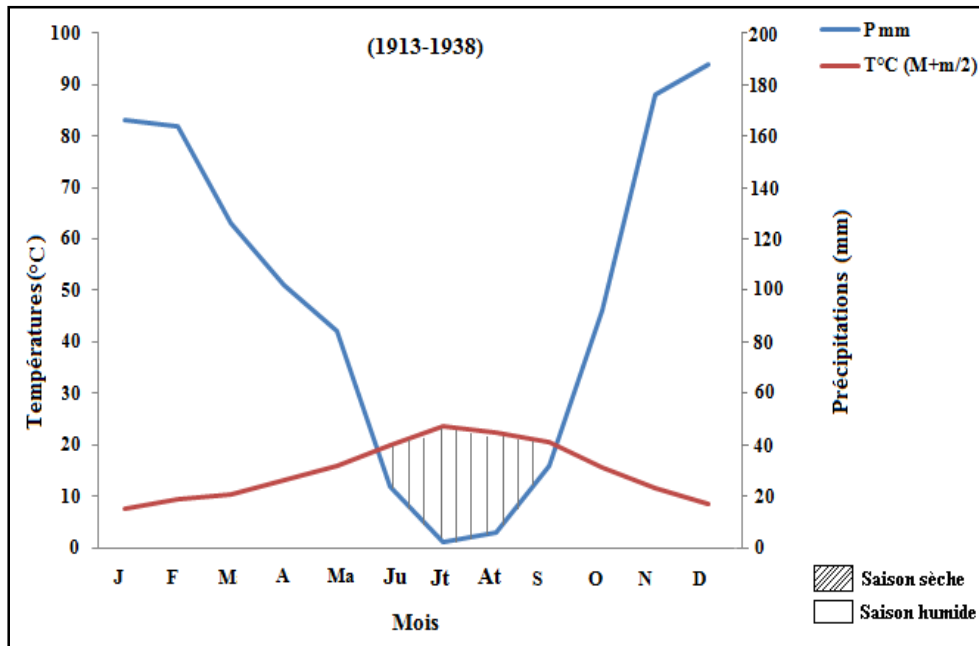


Figure 27 : Diagramme ombrothermique de la région de Tessala (période 1913-1938)

(in Cherifi, 2013)

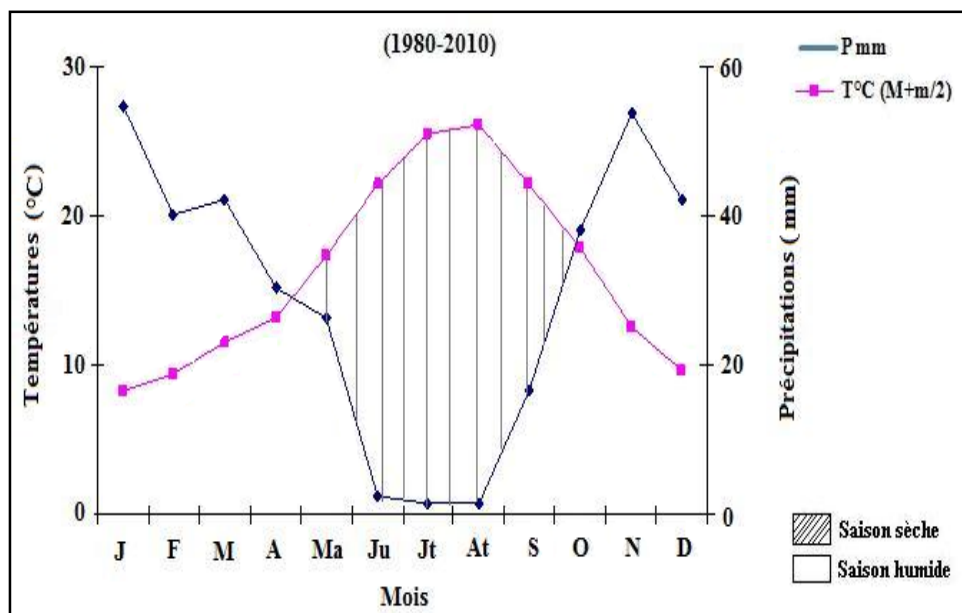


Figure 28: Diagramme ombrothermique de la région de Tessala (période 1980-2010)

(in Cherifi, 2013)

4- MÉTHODES D'ÉTUDE

4-1- MÉTHODES D'EXTRACTION DES FLAVONOÏDES

4-1-1- Préparation du matériel végétal

Les graines prélevées sont nettoyées, lavées à l'eau distillée puis séchées à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours, pour être ensuite pulvérisées à l'aide d'un broyeur. La poudre de graine est conservée dans un flacon sombre à l'abri de la lumière et de l'humidité, jusqu'aux analyses. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leur dénaturation.

4-1-2- Technique d'extraction des flavonoïdes

La procédure suivie est celle appliquée par Merghem *et al.* (1995), elle comporte trois sous étapes (fig. 29):

a- La macération

300 g de poudre de graines de plante est macérée dans un mélange hydro-alcoolique (éthanol /eau ; 160/60 : V/V). Cette macération se fait à une température ambiante pendant trois jours successifs, avec renouvellement du solvant toutes les 24 heures. Les macéras sont réunis puis filtrés sur papier filtre.

b- Évaporation

Après filtration, les extraits hydro-alcooliques subissent une évaporation sous pression réduite dans un rotavapeur rotatif (de type BUCHI) à une température de 50°C. Le résidu sec est repris dans 600 ml d'eau distillée bouillante (l'intérêt de l'utilisation de l'eau distillée bouillante, c'est pour assurer la récupération des composés restés accolés à la paroi du ballon d'évaporation). Après une décantation de 24h, on récupère la phase limpide, qui est la phase aqueuse. Cette dernière va subir des affrontements successifs par plusieurs solvants de polarité croissante, c'est-à-dire allant du moins polaire au plus polaire. Ce sont l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le butanol.

c- Extraction par des solvants

L'extraction liquide liquide des composés chimiques est faite dans des ampoules à décanter de 1000 ml. La phase aqueuse et le solvant éther de pétrole sont mis dans une ampoule à décanter, l'ensemble est mélangé et agité énergiquement en dégazant à chaque fois. Après un repos d'une heure, on récupère séparément d'une part, la phase aqueuse et d'autre part la phase organique chargée de ses composés spécifiques. La phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter pour être affrontée une deuxième puis une troisième fois avec le même solvant (éther de pétrole) renouvelé jusqu'à ce qu'il devient transparent.

Ce solvant organique récupéré est rejeté par la suite, car il est nécessaire seulement pour éliminer les boues, les graisses et les résines risquant de gêner la suite des analyses.

Ce même protocole est répété pour la phase aqueuse soumise cette fois-ci à un autre fractionnement par d'autres types de solvants utilisés tel que le chloroforme, pour donner l'extrait chloroforme (ECh), l'acétate d'éthyle pour donner la fraction acétate d'éthyle (EAc) et finalement le butanol pour donner l'extrait butanol (EBu), en suivant les mêmes étapes que le premier fractionnement par l'éther de pétrole.

Le raffinat qui en résulte représente la phase aqueuse résiduelle (EAq). Ces phases sont évaporées à sec au rotavapor sous pression réduite, puis pesées, congelées et finalement soumises à une lyophilisation, pour être conservées à -20°C jusqu'à utilisation.

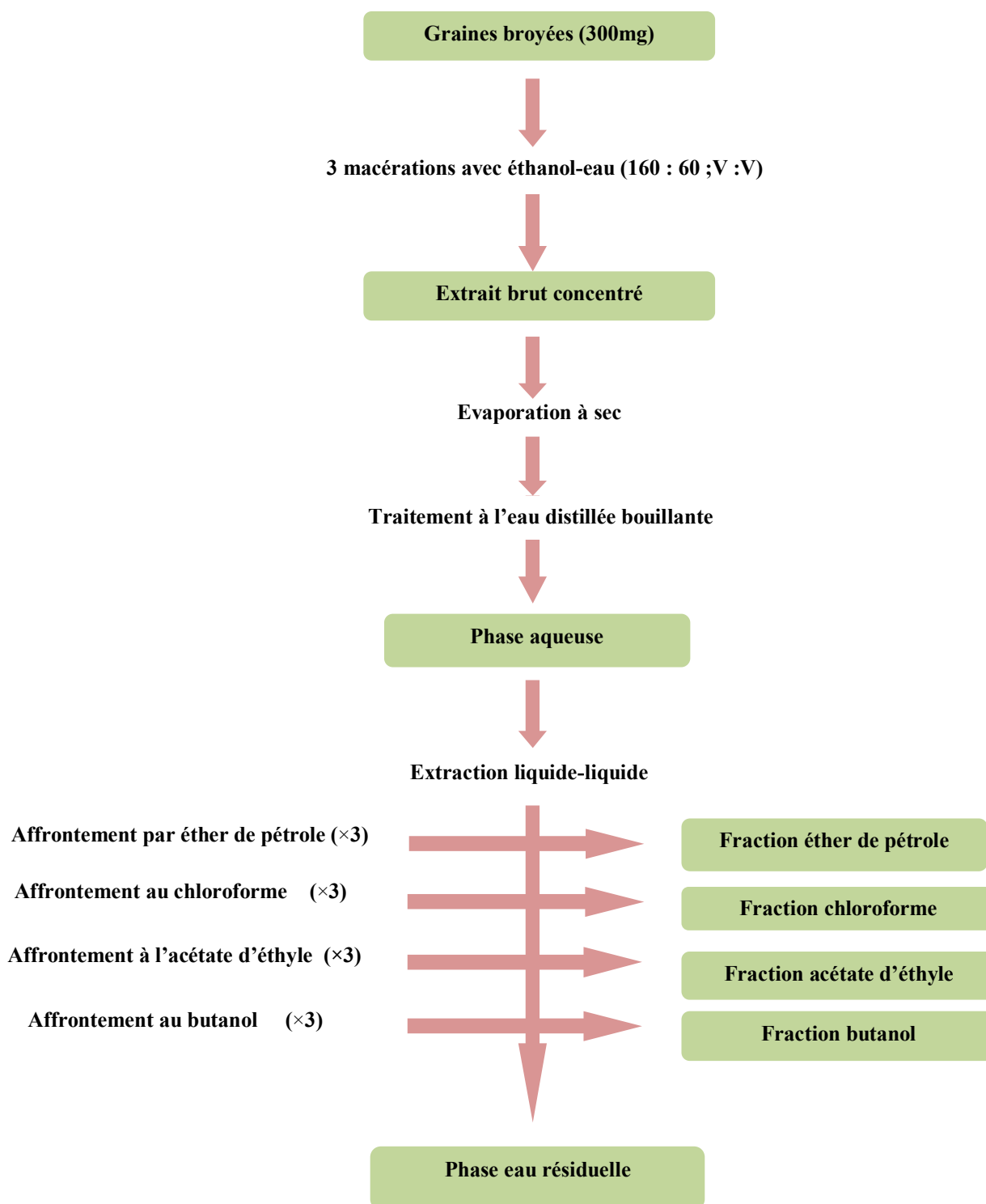


Figure 29 : Protocole d'extraction des flavonoïdes (Merghem *et al.*, 1995)

Notons que les rendements sont calculés selon la relation :

$$R (\%) = m / m_0 \times 100$$

m : est la masse du résidu sec

m₀ : est la masse de la poudre végétale

4-2- IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES FLAVONOÏDES PAR CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE SUR COUCHE MINCE (CCM) ET PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

a- CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE SUR COUCHE MINCE

La chromatographie sur couche mince (CCM) est à la fois une méthode de séparation et d'identification des divers constituants d'un mélange. Elle nous permet de mettre en évidence les différentes familles des flavonoïdes en fonction de leur façon de migrer dans des conditions données. La CCM est la plus simple, efficace et rapide des méthodes chromatographiques, elle associe la sensibilité à la simplicité (Wink, 1999).

a.1- Le principe

Elle consiste à placer sur une feuille (papier, cellulose, silice, polyamide, gel de séphadex, etc.) (Wink, 1999 ; Maarouf, 2002), une goutte de chaque extrait (chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueux) de la laisser éluer dans un mélange de solvant (appelé éluant), qui va diffuser le long du support. La tache de la goutte migre verticalement sur la feuille en fonction de la polarité des substances, de la polarité de l'éluant (phase mobile), du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire et des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant.

a.2- Choix des conditions opératoires

🚦 choix de la phase stationnaire

Dans notre étude, nous avons choisi un support le plus courant en gel de silice d'épaisseur 0.25 mm en couche fine, monté sur une plaque d'aluminium (60 F254 Merck). Ces plaques possèdent un colorant incolore en lumière naturelle, mais de couleur verte en UV absorbant à 254nm.

🚦 choix de l'éluant

Le choix de l'éluant est essentiel, il est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants dans des proportions bien établies. Une méthode simple pour trouver l'éluant approprié, consiste à préparer des solutions de l'échantillon dans différents solvants.

Pour cela différents systèmes d'un mélange de solvants polaires et apolaires ont été essayés pour définir ceux qui donnent les meilleures séparations. L'éluant est celui qui, lorsqu'il a terminé sa migration, a entraîné le soluté à une distance d'environ la moitié de celle qu'il a parcourue (Marchal, 1998).

Dans notre travail, nous avons utilisé le mélange éther diéthylique / éther de pétrole avec différentes combinaisons d'une part et, d'autre part nous avons essayé également d'autres éluants utilisés dans les travaux de Widmer (1999) et Kechar (2007) (tabl. 7).

Tableau 7 : Les différents systèmes de solvants utilisés pour la CCM

CCM sur gel de silice			
	Système solvants	Proportions	Références
Systèmes essayés	Ether diéthylique 100% / éther de pétrole 100%	(50 / 50 ml) (V / V) (80 / 20 ml) (V / V) (60 / 40 ml) (V / V) (40 / 60 ml) (V / V)	Bessam et Mehdadi (2014)
	Acétate d'éthyle / méthanol / eau	(50 / 20 / 10 ml) (V / V / V)	Kechar, (2007)
	Butanol / acide acétique / eau	(40 / 50 / 10 ml) (V / V / V)	Kechar, (2007)
	Toluène / butanol / méthanol / éther de pétrole	(20 / 10 / 10 / 20 ml) (V / V / V / V)	Widmer, (1999)
	Chloroforme / acétone / acide formique	(75 / 16.5 / 8.5 ml) (V / V / V)	Widmer, (1999)
	Chloroforme / methanol / eau	(90 / 10 / 5 ml) (V / V / V)	Widmer, (1999)

a.3- Solution d'essai

100 mg de chaque fraction (chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueuse) ont été dissouts dans 10 ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO).

a.4- Le dépôt de l'échantillon

Nous avons découpé une plaque CCM, de dimension 8cm × 5cm sur laquelle nous avons tracé au crayon un trait à 1cm du bord inférieur de la plaque. Sur ce trait, on trace à l'aide d'un crayon quatre petits points à 1cm de distance. Il est important que le diamètre de la tâche produite au moment du dépôt soit faible; idéalement, il ne devrait pas dépasser 3 mm. Ce sont généralement les dépôts les moins étalés qui permettent les meilleures séparations. Pour augmenter la quantité déposée, il est toujours préférable d'effectuer plusieurs dépôts au même point, en séchant rapidement entre chaque application, plutôt que de déposer en une seule fois un grand volume d'échantillon qui produirait une tâche plus large (Marchal, 1998).

L'échantillon est déposé à l'aide d'une micropipette ou d'un tube capillaire, en appuyant légèrement et brièvement l'extrémité de la pipette sur la couche d'adsorbant, en prenant soin de ne pas le détériorer. 5µl de chaque extrait (S1 : extrait aqueux, S2 : extrait butanol, S3 : extrait acétate d'éthyle et S4 : extrait chloroforme) est prélevé à l'aide d'une pipette pasteur à usage unique, et déposé perpendiculairement et prudemment sur chaque point. Il faut sécher après chaque dépôt avec un sèche cheveu, ou laisser sécher à l'air libre. On vérifie l'identité des composants présumés d'un échantillon en procédant à un dépôt séparé d'une solution de chacun d'eux, puis à celui des solutions témoins qui permettent de comparer la migration de chaque composé avec celle de l'échantillon à analyser.

a.5- Développement de la plaque

Le développement consiste à faire migrer le solvant sur la plaque. Dans les analyses usuelles de laboratoire, le principal type de développement est la chromatographie ascendante : la plaque est placée en position verticale dans une cuve, et le solvant qui en recouvre le fond monte par capillarité.

Le niveau de liquide est ajusté à environ 0,5 cm du fond de la cuve; on place souvent du papier filtre contre les parois de la cuve pour saturer plus rapidement la cuve en vapeurs d'éluant. Pendant le développement du chromatogramme, la cuve doit demeurer fermée et ne pas être déplacée.

Lorsque la position du front du solvant arrive à environ 1 cm de l'extrémité supérieure, la plaque est retirée de la cuve, le niveau atteint par le solvant est marqué par un trait fin, puis la plaque est séchée à l'air libre ou à l'aide d'un séchoir (Marchal, 1998).

a.6- Révélation

L'identification des substances isolées se fait selon différentes méthodes :

révélation aux UV

Toutes les substances ayant une absorption dans la région au-dessus de 230 nm, sont étudiées sur des supports additionnés de corps fluorescents par irradiation de lumière UV à ondes courtes ($L_{max} < 254$ nm). L'emploi de couches non additionnées de produits fluorescents, permet aussi la mise en évidence de beaucoup de substances dans l'UV à ondes courtes ou à ondes longues ($L_{max} > 366$ nm) par suite de la fluorescence propre des composés (Marchal, 1998).

Révélation par méthode chimique

Si les substances sont incolores, elles sont directement colorées à l'aide de révélateurs afin de les transformer en tâches colorées; les produits sont souvent décelés par réaction chimique avec les substances à révéler (Latifou, 2005) : les acides aminés par la ninhydrine qui donne avec la plupart une couleur bleu-violet, les acides organiques par des indicateurs colorés, les sucres par le réactif de Molisch qui utilise le pouvoir réducteur des sucres.


Dans notre travail, la visualisation des taches (spots) de flavonoïdes a été faite sous UV à 254 nm dans une chambre noire après avoir séché les plaques à l'air libre. Quelques tâches ont été encerclées en trait plein.

a.7- Calculs et interprétation

La position finale de la tâche (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le R_f , qui a été fort habilement traduit comme Rapport frontal. Ce R_f est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant. Ainsi un R_f faible est caractéristique d'une molécule qui a peu migré et qui est donc proche de la ligne de dépôt. Alors qu'un R_f élevé est caractéristique d'une molécule qui a fortement migré et qui est donc proche du front de migration, avec une forte affinité pour la phase mobile. Le R_f est compris entre 0 et 1.

La valeur du R_f varie avec la nature de l'éluant utilisé (organique ou aqueux), le type du support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la nature du produit lui-même (aglycone ou glycosyl), ainsi que de la disposition des différents substituants sur le squelette flavonique (Marbry *et al.*, 1970 ; Berthillier, 1972 ; Malcom, 2004).

$$\text{Rapport frontal (Rf)} = h / H$$

 H : hauteur parcourue par le solvant entre la ligne de dépôt et le front du solvant (en cm),

✚ h : hauteur parcourue par la substance entre la ligne de dépôt et sa position au moment de la révélation (en cm) (fig. 30).

Le Rf est caractéristique d'une molécule pour un éluant et un support donnés.

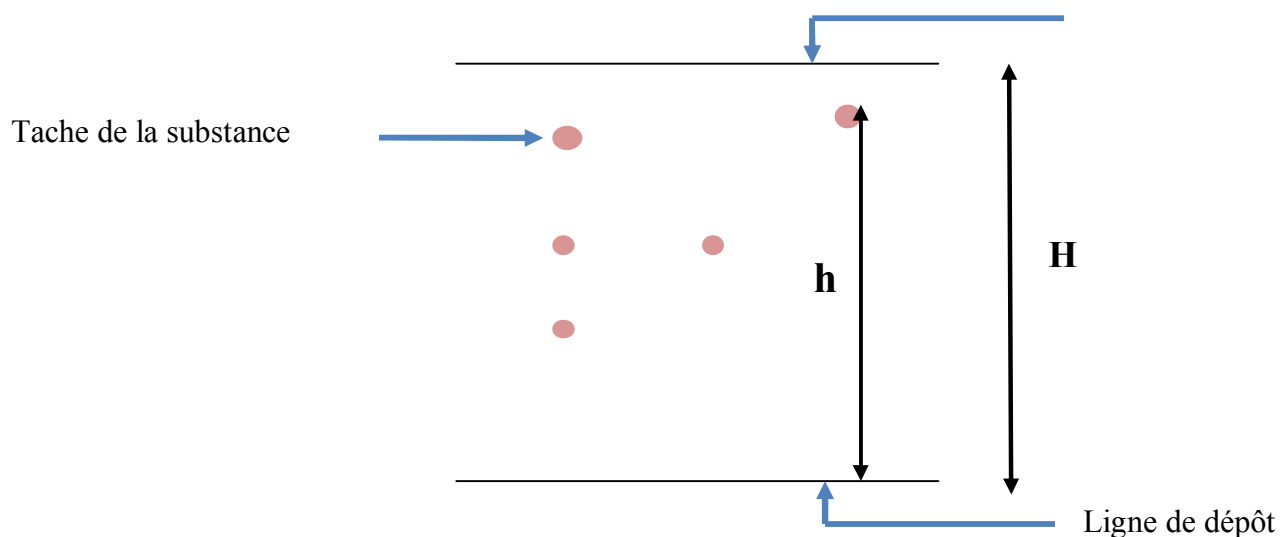


Figure 30: Chromatogramme après révélation

a.8- Structure Rf

La distance de migration des substances dépend essentiellement de leur polarité :

- ✚ les polyhydroxyflavones ont des faibles valeurs de Rf (0,00-0,25),
- ✚ les oligohydroxy et les oligométhoxyflavones ont des valeurs de Rf comprises entre (0,3-0,5),
- ✚ les flavanones, les flavonols, méthoxyflavones ont les valeurs les plus élevées de Rf (0,5-0,75) (Bandyukova et Shinkarenko, 1973) (tableau 8).

Tableau 8 : La relation entre le Rf et la structure des flavonoïdes (Bandyukova et Shinkarenko, 1973)

Structure flavonique	Rf
Augmentation des OH	Diminution du Rf
Méthylation des groupements OH	Augmentation des valeurs de Rf
Acétylation	Augmentation des valeurs de Rf
Glycosylation	Diminution des valeurs de Rf due principalement de l'introduction de nouveau groupement OH

a.9- Structure-fluorescence

L'examen en lumière ultraviolette est la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure des flavonoïdes. Les tableaux 9 et 10 résument la relation qui peut exister entre la structure d'un composé et sa fluorescence sous UV.

Tableau 9 : La relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005)

Spot coloré	Types de flavonoïdes
Noir	Flavonols 5, 6, 7, tri OH libres Flavonols 5, 7, 8, tri OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	Flavones 5-OH et 4' OH Flavones 3-OR et 5 OH ,4'-OH Flavones 6 ou 8 OH Chalcones Dihydroflavonols Isoflavones Flavanones
Bleu clair (fluorescent)	Flavones sans 5-OH libre Flavonols sans 5-OH libre avec 3 OH substitué
Jaune terne Jaune Fluorescence orangée	Flavonols 3- OH libre avec ou sans 5-OH libre
Jaune vert brillant	5 OH libre ou 5 OH substitué
Jaune fluorescent	Flavonols avec 3OH libres Aurones Chalcone Flavanones
Jaune pâle	dihydroflavonols

Tableau 10: Composés phénoliques identifiés par CCM (Markham, 1982)

Couleurs sous UV	Composés probables
Rouge	Anthocyanidine 3 glucoside
Rose	Anthocyanidine 3,5 diglucoside
Orange	Anthocyanidine 3 glucoside
Orange pâle	Anthocyanidine 3 glucoside
Jaune	Flavonols
Jaune pâle	Flavonols
Vert	Rutine
Bleu sombre	Flavonols, flavanones, auronnes
Bleu vif	Hydroquinones
Bleu pâle	Acide phénol
Bleu blanc fluorescent	Acide phénol
Violet	Flavonols, flavanones, isoflavones, flavones
Pourpre sombre	Chalcones
Marron	Flavones, flavonols 3- glycosylés

b- ANALYSE QUALITATIVE PAR LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

b.1- Description du système RP-HPLC utilisé

L'HPLC utilisé (système RP-HPLC) est de marque Shimadzu, équipée d'une colonne C18 de 25cm de longueur, 4,6mm de diamètre interne et de 5µm de diamètre de particules, d'une pompe « Model LC-10ADvp » et d'un contrôleur de gradient « Model FCV-10ALvp », auxquels sont connectés un injecteur manuel et un détecteur UV-visible « Model SPD-10Avp » (fig. 22). Le volume de la solution étalon ou de la solution test injectée est de 20µl. Toutes les analyses ont été traitées par le logiciel « LC solution ».

b.2- Préparation des solutions standards

Les solutions témoins de sylibine, catéchine et naringine sont préparées, en dissolvant 100 mg de chaque standard dans 10ml de diméthyle sulfoxyde (DMSO), elles sont ensuite agitées dans le vortex pendant quelques minutes et filtrées sur un filtre millipore (0,45 µm) pour éviter d'endommager la colonne et limiter les interférences dues aux impuretés. Ces préparations se font dans une chambre obscure en présence d'une lampe rouge, pour éviter la

dégradation des molécules. 20µl de chaque témoin est prélevé et injecter sur une colonne de type phase inverse C18, de 25cm de longueur et 4,6mm de diamètre interne avec un débit de 1ml / mn, à une température ambiante de la salle ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). La phase mobile est composée d'un mélange de trois solvants : acide phosphorique, méthanol, eau ultra pure (0.5 / 35 / 65 ml : V / V / V). Les solvants et réactifs utilisés au cours des travaux proviennent du fabricant SIGMA-ALDRICH.

Le gradient d'éluion appliqué est de type isocratique étalé sur 30 mn. La détection a été effectuée par un détecteur UV-visible à une longueur d'onde égale à 280 nm.

b.3- Préparation des échantillons

50 mg de chaque extraits : acétate d'éthyle, chloroforme, butanol et aqueux ont été solubilisés dans 5 ml de DMSO, ce solvant a été choisi parce qu'il permet la solubilité des échantillons et des standards. Les échantillons sont agités au vortex pendant quelques minutes dans une chambre obscure en présence d'une lampe rouge pour que la lumière ne cause pas la dégradation des molécules. L'échantillon est ensuite filtré sur un filtre millipore de (0.45µm) pour éviter d'endommager la colonne et limiter les interférences liées aux impuretés. 20µl sont prélevés de l'échantillon et injectés dans la colonne. Les conditions opératoires sont réalisées à la température ambiante de la salle ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) et à l'obscurité. La phase mobile est constituée d'un mélange de trois éluants : acide phosphorique, méthanol, eau ultra pure (0.5 / 35 / 65 ml : V / V / V).

Le gradient d'éluion appliqué est de type isocratique étalé sur 30 mn. La détection a été effectuée par un détecteur UV-visible à une longueur d'onde égale à 280 nm. Toutes les injections ont été faites en double.

b.4- Expression des résultats

Les flavonoïdes contenus dans chaque extrait analysé ont été identifiés qualitativement par la comparaison des temps de rétention de nos extraits obtenus avec ceux des témoins.

4-3- ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DES DIFFÉRENTS EXTRAITS

4-3-1- Préparation des solutions de la plante

10 mg de chaque extrait lyophilisé (chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et phase aqueuse résiduelle) sont introduits dans un tube à essai où nous avons ajouté 100ml de diméthyl sulfoxyde (DMSO) ; ce solvant étant dépourvu d'effet antimicrobien. Les tubes sont agités au vortex jusqu'à dissolution complète de l'extrait. Ainsi nous obtenons pour les quatre extraits, une solution mère à une concentration de 100 µg / ml.

Cette solution mère va être utilisée pour la détermination de l'activité antibactérienne et antifongique des différents extraits.

4-3-2- Les germes testés

Le support microbien utilisé provient de l'American Type Culture Collection ATTC est composé de :

✚ *Escherichia coli*, ATTC 25922

✚ *Proteus mirabilis*, ATTC 35659

✚ *Bacillus cereus*, ATTC 10876

Le support fongique utilisé est composé de deux souches :

✚ *Candida albicans*, ATTC 10231

✚ *Aspergillus brasiliensis*, ATTC 16404

4-3-3- Repiquage des souches bactériennes et fongiques

Afin de s'assurer de leur pureté, les différentes souches bactériennes et fongiques conservées dans les conditions du laboratoire, sont repiquées par la méthode des stries dans des milieux gélosés adéquats à savoir : gélose ectoène pour *E. coli* et *P. mirabilis*, gélose nutritive pour *B. cereus*, puis incubées à l'étuve à la température de 37°C pendant 18 à 24 heures. La gélose Sabouraud est utilisée pour *A. brasiliensis* et *C. albicans* qui sont incubés à l'étuve à la température de 25°C pendant 72h, afin d'obtenir des cultures jeunes et des colonies isolées qui ont servi à la préparation de l'inoculum.

4-3-4- Préparation des inoculums bactériens

Une ansée de colonies est mise en suspension dans 10 ml d'eau physiologique stérile, la turbidité est ajustée à 0.5 Mc ($\sim 10^8$ UFC/ml). Une dilution appropriée est effectuée jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO) de 0.08 à 0.10 à une longueur d'onde de 625nm (standardisation de l'antibiogramme selon l'OMS, 1999).

4-3-5- La technique utilisée

La technique de diffusion des disques sur milieu solide, technique simple, utilisée et décrite par de nombreux chercheurs (Dulger et Gonuz, 2004 ; Pareker et Chanda, 2007 ; Rota *et al.*, 2008). C'est une méthode qui permet de montrer l'existence ou non d'action antimicrobienne et antifongique des produits à tester.

L'activité antibactérienne a été recherchée contre trois souches bactériennes dont *E. coli*, *P. mirabilis* et *B. cereus*. Les tests de sensibilité ou de résistance des bactéries aux différents extraits végétaux (chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueux résiduel), sont réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

4-3-6- Ensemencement

Selon la technique d'inondation, les suspensions bactériennes sont ensemencées par étalage à l'aide d'un râteau stérile dans des boîtes de pétri stériles préalablement coulées par le milieu Muller Hinton approprié pour le germe (SFM, 2008). L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries. Les boîtes ensemencées sont laissées quelques minutes sur la paillasse pour que les bactéries se fixent à la surface du milieu de culture, puis l'excès de suspension est aspiré à l'aide d'une pipette stérile.

4-3-7- Préparation des disques

Des disques stériles (120°C pendant 15 minutes par autoclavage) de papier wattman de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 20µl de chaque solution mère correspondant aux quatre extraits brut. A l'aide d'une pince stérile, ces disques sont déposés délicatement sur les milieux gélosés préalablement ensemencés avec les suspensions bactériennes référencées. Après une heure de pré-diffusion des solutions, les boîtes de pétri sont incubées à la température de 37°C à l'étuve pendant une durée de 24h (Adesokan *et al.*, 2007). Après incubation, l'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible (Choi *et al.*, 2006).

4-3-8- Expression des résultats

L'activité antibactérienne a été déterminée en mesurant à l'aide d'une règle graduée et à l'extérieur de la boîte fermée, le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques, déterminé par les différentes concentrations des différents extraits.

4-4- ÉTUDE DE L'ANTIBIOGRAMME ET DE L'ANTIFONGIGRAMME

4-4-1- Principe

Le but de la réalisation d'un antibiogramme, est de prédire la sensibilité d'un germe ou de plusieurs germes à un ou plusieurs antibiotiques, dans un but essentiellement thérapeutique et voir l'efficacité *in vitro* de ces antibiotiques.

De même pour un antifongigramme, qui consiste à déterminer *in vitro* la sensibilité des champignons vis-à-vis d'un ou plusieurs antifongiques afin de comparer les résultats des extraits flavonoïques avec ceux de l'antibiogramme et l'antifongigramme.

4-4-2- L'antibiogramme

Il est réalisé suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment (diffusion sur milieu solide), en utilisant des disques d'antibiotiques standards à savoir la spiramycine (100µg), la céfazoline (30µg), l'amikacine (30µg), l'amoxicilline (25µg) et l'oxacilline (11µg). Après incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètres (disque inclus)

(Doughari *et al.*, 2007). Il est représenté par une auréole formée autour de chaque bactérie en cas d'une activité positive. Chaque test est réalisé trois fois afin de minimiser l'erreur expérimentale.

4-4-3- L'antifongigramme

Il est réalisé suivant les mêmes étapes que celles décrites dans l'antibiogramme, en utilisant un disque d'antifongigramme standard, qui est une solution de pevaryle à 1%.

4-5- ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE

La méthode utilisée est la même que celle utilisée pour l'activité antibactérienne (diffusion à partir d'un milieu solide). Elle met en évidence la sensibilité des souches fongiques vis-à-vis des extraits testés. Le repiquage des champignons se fait sur gélose Sabouraud pour *C. albicans* et *A. brasiliensis*, puis une incubation à la température de 25°C pendant 5 jours. L'inoculum a été préparé de la même façon que celui des bactéries.

A la fin de la culture, si l'extrait inhibe le développement, un halo clair est visible autour des disques.

4-6- CLASSEMENT DES SOUCHES TESTÉES SELON LEURS SENSIBILITÉS AUX ANTIBIOTIQUES ET AUX EXTRAITS

La classification des souches bactériennes et fongiques lors de l'antibiogramme et de l'antifongigramme vis-à-vis des extraits flavonoïques s'effectue comme suit : souche sensible (+), intermédiaire (\pm) et résistante (-).

Selon Draffourd *et al.* (1990) et Ponce *et al.* (2003), la sensibilité aux extraits est classifiée selon le diamètre des zones d'inhibitions comme suit : non sensible pour un diamètre moins de 8mm ; - sensible pour un diamètre de 9-14mm ; très sensible pour un diamètre de 15-19mm et extrêmement sensible pour un diamètre de 20mm.

4-7- DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE

(CMI)

4-7-1- Principe

La CMI de façon générale est la plus faible concentration d'antimicrobien capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 heures. Ici, sa détermination s'est effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance des germes étudiés. La CMI correspond donc à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité.

4-7-2- Technique classique

Les CMI sont déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide à partir d'une gamme de concentrations de l'extrait flavonoïque le plus actif (EAc), ayant induit un diamètre d'inhibition supérieur ou égal à 16 mm (Bouterfes *et al.*, 2014).

Une série de dilution selon une progression géométrique de raison 2 avec des concentrations allant de 3,12 ; 6.25 ; 12.5 ; 25 ; et 50 µg/ml sont réalisées à partir d'une solution mère de concentration de 100 µg/ml de l'extrait utilisé, préparée dans le diméthyle sulfoxyde pur. 1ml de chaque dilution est incorporé à 1 ml de bouillon Muller Hinton auxquels sont ajoutés 1 ml de l'inoculum.

Les cinq premiers tubes (de C1 à C5) sont appelés tubes expérimentaux. Le dernier tube (C6) est noté tube témoin de croissance ou TC. Ces tubes chargés sont incubés à 37°C sous agitation pendant 18 à 24 heures pour les bactéries, et 25°C pour les champignons pendant 48 à 72h. Le dénombrement des souches microbiennes a été estimé par la mesure de la turbidité par densitomètre (Moroh *et al.*, 2008). L'expérience a été faite trois fois.

Le dénombrement s'effectue en faisant la différence entre la valeur de la densité optique relevée avant l'incubation et celle après l'incubation pour chaque tube. La valeur obtenue pour le tube N°6 (le tube témoin de croissance) représente 100% de survie.

PARTIE III
RÉSULTATS ET DISCUSSION

1-RÉSULTATS

1-1-RENDEMENTS DES EXTRACTIONS

Les rendements d'extractions dans toutes les fractions flavonoïques ont été déterminés par rapport à 300g de matière végétale (akènes de *S. marianum*), qui sont exprimés en pourcentage de matière sèche (tabl. 11).

Tableau 11: Rendements en flavonoïdes de *S. marianum*

Extraits	Matière sèche (g)	Rendement (%)
Extrait brut	14.07	4.70
Extrait chloroforme	3.50	1.16
Extrait acétate d'éthyle	2.02	0.67
Extrait n- butanol	1.76	0.58
Extrait aqueux	0.71	0.23

Les rendements d'extractions obtenus varient entre 4.70% et 0.23%. Nous avons remarqué que le rendement diminue d'une phase à une autre. L'extrait brut avec une valeur de 4.70%, suivi de l'extrait chloroforme avec 1.16%, l'extrait acétate d'éthyle avec 0.67%, l'extrait butanol avec 0.58%. Le plus faible rendement est celui obtenu par l'extrait aqueux avec un pourcentage de 0.23% (tabl. 11).

Cette diminution est due à la rétention des molécules qui ont une plus forte affinité pour la phase. Chaque phase va récupérer des groupes de molécules de polarité croissante. La phase chloroformique renferme des aglycones (molécules faiblement polaires : quercétine, apigénine); la phase acétate d'éthyle renferme des aglycones polyhydroxylés (plus polaires que les aglycones : la silymarine); la phase butanolique renferme des hétérosides de type C-glycosyl, alors que la phase eau résiduelle retient les molécules insolubles dans les solvants utilisés (Ribereau-Gayon, 1968).

1-2- CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Pour identifier les familles moléculaires présentes dans nos différents extraits, nous avons effectué un criblage phytochimique par CCM. C'est une technique appréciée en phytochimie, car elle fournit une empreinte chromatographique des extraits étudiés, et un grand nombre d'extraits peuvent être analysés simultanément. De ce fait, nous avons opté pour cette technique, dans le but de caractériser la présence ou non des molécules bioactives des extraits des graines de *S. marianum*. Dans notre cas, nous avons utilisé un système phase stationnaire polaire de gel de silice combiné à différentes phases mobiles pour identifier

principalement les composés polaires : sucres, acides et polyphénols ainsi que les composés apolaires : les aglycones.

Les plaques CCM observées après élution par les différents solvants dans une chambre noire montrent de nombreuses tâches ayant des couleurs et des migrations différentes. L'identification de quelques composés phénoliques présents dans les différents extraits a été faite en se référant aux standards disponibles. Les autres composés ou familles les plus probables qui peuvent entrer dans la composition de nos différents extraits obtenus, ont été caractérisés en s'appuyant des données de la littérature.

1-2-1- Identification par rapport à la littérature

1-2-1-1- Système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole

Les résultats du système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (50/50 ; V/V) sont présentés sur le tableau 12 avec les rapports frontaux ainsi que les couleurs des spots pour les quatre extraits utilisés.

Tableau 12 : Résultats de la CCM par le système éther diéthylique / éther de pétrole

Extraits	Rf	Couleurs
Extrait aqueux	-	-
Extrait n-butanol	0.06	Rose
	0.18	Rose
	0.29	Rose
Extrait acétate d'éthyle	0.23	Rose
	0.34	Rose
Extrait chloroforme	0.58	Marron
	0.07	Jaune pâle

- : absence de spots

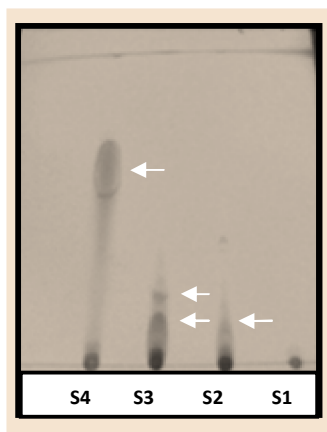


Figure 31 : Chromatogramme du système éther diéthylique / éther de pétrole

S1: Extrait aqueux résiduel ; **S2:** Extrait n-butanol ; **S3:** Extrait acétate d'éthyle ; **S4:** Extrait chloroforme. Les flèches indiquent les spots révélés pour chaque extrait.

Les résultants regroupés dans le tableau 12 et représentés par la figure 31, révèlent que le système de solvant polaire éther diéthylique / éther de pétrole (50/50 ; V/V) a permis de faire migrer quelques substances actives de nature polaires qui sont retenues par la phase stationnaire.

L'extrait acétate d'éthyle est fractionné en deux spots et l'extrait butanol en trois spots de taille moyenne et de forme plus ou moins circulaire, de couleur brune et jaune pâle à la lumière visible et qui apparaissent en rose sous UV à 254 nm pouvant indiquer la présence des anthocyanidines 3,5 diglucoside. Le fractionnement de l'extrait chloroforme indique la présence d'un spot de grande taille et de forme allongée, de couleur marron à la lumière visible, correspondant aux flavones et / ou flavonols 3- glycosyl sous UV (Markham, 1982).

La diminution des Rf indique une glycosylation (Bandyukova et Shinkarenko, 1973). Aucun spot n'est mis en évidence chez l'extrait aqueux.

1-2-1-2- Le système solvant éther diéthylique / éther de pétrole

Les résultats du système éther diéthylique / éther de pétrole (60/40 ; V/V) sont indiqués dans le tableau 13 et représentés par la figure 32.

Tableau 13: Résultats de la CCM par le système éther diéthylique / éther de pétrole

Extraits	Rf	Couleurs
Extrait aqueux	-	-
Extrait n-butanol	0.10	Mauve clair
	0.19	Mauve clair
	0.30	Mauve clair
	0.50	Mauve clair
Extrait acétate d'éthyle	0.09	Rose
	0.22	Rose
Extrait chloroforme	0.37	Rouge



Figure 32 : Chromatogramme des différents extraits par le système éther diéthylique / éther de pétrole.

Le système éther diéthylique / éther de pétrole (60/40 ; V/V) permet de séparer les flavonoïdes beaucoup plus polaires qu'apolaires. Les composés sont restés adsorbés à la phase fixe qui est de nature polaire et acide. Par le biais de ce système, nous avons pu mettre en évidence quatre composés dans la phase butanol qui présente le plus grand nombre de spots avec des Rf de 0.10 à 0.50, ayant sous lumière ultra violette ($\lambda=254$ nm), une couleur mauve claire. Deux spots de couleur rouge et rose ont été mis en évidence par l'extrait acétate d'éthyle, avec des Rf plus faibles (0.09 et 0.22). Les différents spots mis en évidence correspondent très probablement à la présence des anthocyanidines 3 glucosides, des anthocyanidines 3,5 diglucosides, des flavonols, flavanones, isoflavones et flavones (Markham, 1982). Concernant la fraction aqueuse aucun spot n'a été détecté.

1-2-1-3- Système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole

Sur le tableau 14 sont représentés les résultats des extraits avec le système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (80/20 ; V/V).

Tableau 14: Résultats de la CCM avec le système éther diéthylique / éther de pétrole

Extraits	Rf	Couleurs
Extrait aqueux	-	-
Extrait n-butanol	0.17	Rose
	0.23	Rose Rose
Extrait acétate d'éthyle	0.17	Rouge
	0.64	Rose
	0.44	Rose
Extrait chloroforme	0.35	Marron
	1	Marron

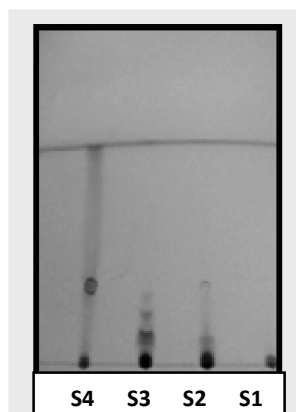


Figure 33 : Chromatogramme du système éther diéthylique / éther de pétrole

Les résultats regroupés dans le tableau 14 et représentés par la figure 33 montrent que le système éther diéthylique / éther de pétrole (80 / 20) V / V a permis une bonne séparation chromatographique ; le fractionnement de l'extrait butanol et acétate d'éthyle en deux et trois spots qui sous lumière UV sont de couleur rose. La phase chloroforme présente deux spots de couleur marron, indiquant certainement la présence des flavones (Markham, 1982). Si on compare notre chromatogramme à celui présenté dans le *Plant drug analysis* (Wagner et Bladt, 1996), il semble que la sylibine (fraction majeure de la sylimarine) migre à un Rf de 0.6, ce qui confirme la présence de ce constituant chimique au niveau de la phase acétate d'éthyle de *S. marianum*. Cette remarque ne permet pas de douter de la présence des flavonolignanes, et de flavanonols, puisque le Rf obtenu (0.64) convient tout à fait à ce qui a été rapporté dans la littérature. Ce sont donc des aglycones moyennement polaires qui ont une affinité pour la phase stationnaire. Seul l'extrait chloroforme qui est faiblement polaire présente un spot qui a migré avec un Rf important égale à 1, c'est un aglycone qui est une molécule faiblement polaire lipophile non retenue par la phase stationnaire.

1-2-1-4- Le système éther diéthylique / éther de pétrole

L'utilisation du système de solvant éther diéthylique / éther de pétrole (20/80 ; V/V) n'a donné aucun résultat.

1-2-1-5- Le système toluène / butanol / méthanol / éther de pétrole

Les résultats relatifs aux rapports frontaux et couleurs des spots des différents extraits par le système toluène / butanol / méthanol / éther de pétrole (20/10/10/20 ; V/V/V/V) sont illustrés sur le tableau 15 et représentés par la figure 34.

Tableau 15: Résultats de la CCM avec le système toluène / butanol / méthanol / éther de pétrole

Extraits	Rf	Couleurs
Extrait aqueux	Trainée	Bleu pâle
	0.13	Bleu pâle
Extrait n-butanol	Trainée	Rouge
	Trainée	Marron
	0.47	Marron
	0.60	Rose
Extrait acétate d'éthyle	Trainée	Bleu pâle
	Trainée	Rouge
	0.51	jaune
	Trainée	Marron
Extrait chloroforme	Trainée	Noir
	0.56	Marron
	0.93	Jaune

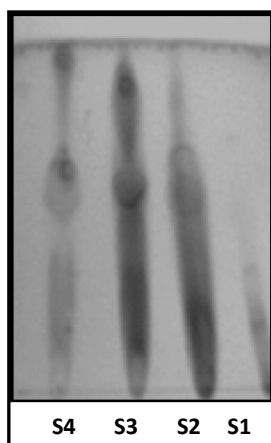


Figure 34 : Chromatogramme du système de solvant toluène / butanol / méthanol / éther de pétrole

Ce système de migration est constitué d'un mélange de solvants beaucoup plus apolaires que polaires, qui a permis d'avoir une bonne séparation chromatographique avec des trainées de spots visibles. Nous remarquons que les phases butanol et acétate d'éthyle, sont plus riches en molécules (spots) que les phases chloroforme et aqueuse. L'extrait butanol présente deux trainées de couleur jaune foncée et jaune claire, suivie d'une tâche marron

claire et d'une autre très claire à la lumière visible. Sous la lumière ultra violette à 254 nm, elles sont de couleur rouge, rose, marron et bleu pâle ; ce qui indique la présence des anthocyanes, des flavones, des flavonols, flavanones, isoflavones, des flavonolignanes et des acides phénols (Markham, 1982). L'extrait acétate d'éthyle présente deux trainées de couleur rouge, jaune foncé et un spot marron clair ainsi qu'une trainée noir et un spot de couleur marron sous UV à 254 nm : ce sont probablement des flavones et flavonols 3-glycosylés.

Le fractionnement de la phase aqueuse montre une trainée de couleur jaune clair, suivie d'un spot jaune à la lumière visible. Sous lumière UV à 254 nm, ce spot se présente sous une couleur bleu pâle, pouvant indiquer la présence des acides phénols (Markham, 1982).

L'extrait chloroforme indique la présence de flavonols dû a la présence de spots de couleur jaune pâle et brun noir. Mis à part la phase aqueuse, nous remarquons des Rf plus importants (0.60, 0.84 et 0.93) concernant les spots des trois autres phases (tab.15).

1-2-1-6- Le système acétate d'éthyle / méthanol / eau

Les résultats obtenus avec le système de solvant acétate d'éthyle / méthanol / eau (50/20/10 ; V/V/V) sont mentionnés sur le tableau 16.

Tableau 16: Résultats de la CCM dans le système acétate d'éthyle / méthanol / eau

Extraits	Rf	Couleurs
Extrait aqueux	Trainée 1	Violet clair Violet clair
Extrait n-butanol	1	Brun noir
Extrait acétate d'éthyle	Trainée 0.86	Jaune clair Marron
Extrait chloroforme	0.35 1	Marron Marron

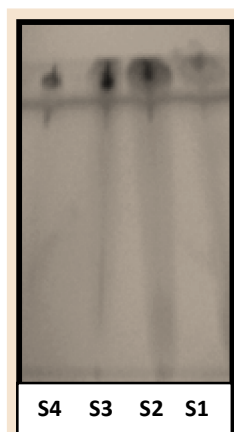


Figure 35 : Chromatogramme du système acétate d'éthyle / méthanol / eau

Les résultats regroupés dans le tableau 16 et représentés par la figure 35 révèlent que la phase mobile constituée d'un mélange de trois solvants organiques moyennement polaires et fortement polaires, a donné une trainée trop importante de spots qui sont fortement élués. Nous constatons que la phase aqueuse résiduelle, la phase chloroforme et la phase butanol indiquent la présence de spots avec un rapport frontal important ($R_f = 1$), qui correspondent aux flavones et / ou flavonols 3- glycosylés, des flavonols, flavanones et isoflavones (Markham, 1984).

1-2-1-7- Le système butanol / acide acétique / eau

Les résultats relatifs aux rapports frontaux pour le système butanol / acide acétique / eau (40 /50 /10 ; V/V/V) sont illustrés sur le tableau 17 et représentés par la figure 36.

Tableau 17: Résultats de la CCM avec le système butanol / acide acétique / eau

Extraits	Rf	Couleurs
Extrait aqueux	0.81	Rose
Extrait n-butanol	0.56	Rouge
	0.66	Rouge
Extrait acétate d'éthyle	0.66	Marron
	0.92	Marron
Extrait chloroforme	0.75	Marron

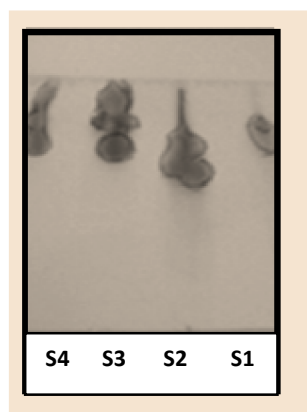


Figure 36 : Chromatogramme de l'éluant butanol / acide acétique / eau

Le système butanol / acide acétique / eau (40/50/10 ; V/V/V) est une phase mobile de nature polaire qui a également donné une bonne séparation chromatographique, avec une visibilité nette des spots, de formes arrondies et allongées, présentant des couleurs rose, rouge et marron. Ce sont probablement des anthocyanidines 3 glucoside, des anthocyanidines 3,5 diglucoside, des flavones et / ou flavonols 3- glycosylés (Markham, 1982).

1-2-2-Essai d'identification selon les standards disponibles

Nous avons pu mettre en évidence quelques composés par le biais des trois standards utilisés (sylibine, catéchine et naringine).

Les résultats obtenus avec le système chloroforme / acétone / acide formique sont reportés dans le tableau 18 et par la figure 37.

🌀 Le système chloroforme / acétone/ acide formique

Les résultats des rapports frontaux (Rf) relatifs aux spots des standards et des extraits sont reportés respectivement sur les tableaux 18.

Tableau 18: Rf des standards et des extraits utilisés par le système chloroforme / acétone / acide formique

Standards	Rf	Extraits	Rf
Sylibine	0.66	Extrait aqueux	0.94
			0.16
Catéchine	0.15	Extrait butanol	0.94
Naringine	0.93	Extrait chloroforme	0.93
		Extrait acétate d'éthyle	0.66

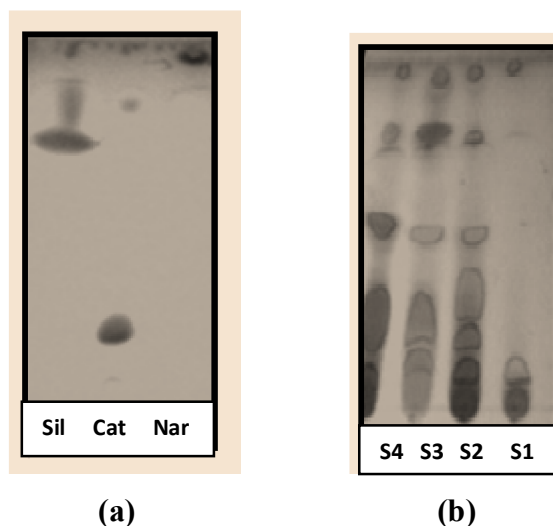


Figure 37 : Chromatogramme des standards (a) et des extraits (b) utilisés

Les données du tableau 18 représentés sur la figure 37 (a) avec le système de solvant chloroforme / acétone / acide formique (75/16.5/8.5 ; V/V/V) indiquent la présence de trois composés flavonoïques : silybine, catéchine et naringine avec différents rapports frontaux.

Ce système de solvant a permis une meilleure séparation des spots (fig 37 b). Six spots sont détectés dans l'extrait butanol, cinq dans les extraits chloroforme et acétate d'éthyle et deux dans l'extrait aqueux.

La confrontation des Rf des standards à ceux des extraits analysés (tab. 18), dénote la présence de la silybine dans l'extrait acétate d'éthyle, la catéchine dans l'extrait butanol et la naringine dans les extraits chloroforme, butanol et aqueux.

🌀 **Le système chloroforme / méthanol / eau**

Les résultats obtenus avec le système de solvant chloroforme / méthanol / eau (90/10/5 ; V/V/V) sont représentés dans le tableau 19 et par la figure 38.

Tableau 19: Rf des standards et des extraits utilisés avec le système chloroforme / méthanol / eau

Témoins	Rf	Extraits	Rf
Sylibine	0.58	Extrait aqueux	-
Catéchine	0.07	Extrait butanol	0.07
Naringine	0.74	Extrait chloroforme	0.73
		Extrait acétate d'éthyle	0.07

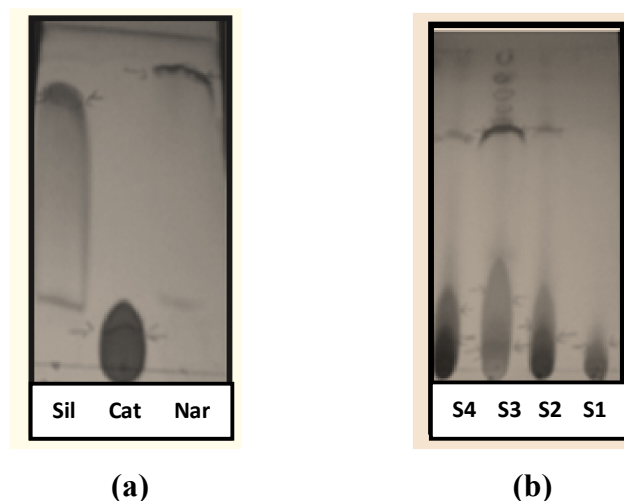


Figure 38 : Chromatogramme des standards (a) et des extraits (b) par le système chloroforme / méthanol / eau

Comparativement aux Rf des standards (fig.a), le système chloroforme /méthanol / eau a permis de mettre en évidence la présence de la catéchine dans les fractions acétate d'éthyle et butanol et la naringine dans la fraction chloroforme. Cependant, dans la fraction aqueuse, aucune molécule n'a été observée (fig.b).

1-3- ANALYSE QUALITATIVE PAR HPLC

1-3-1- Analyse des standards

Le principe est basé sur la comparaison du temps de rétention des standards purs, la sylibine, la catéchine et la naringine avec les composés contenus dans les extraits acétate d'éthyle, chloroforme, butanol et aqueux qui sont représentés par des chromatogrammes ci-dessous.

1-3-1-1- Identification du pic du standard sylibine

Le chromatogramme d'HPLC du standard sylibine est représenté par la figure 39.

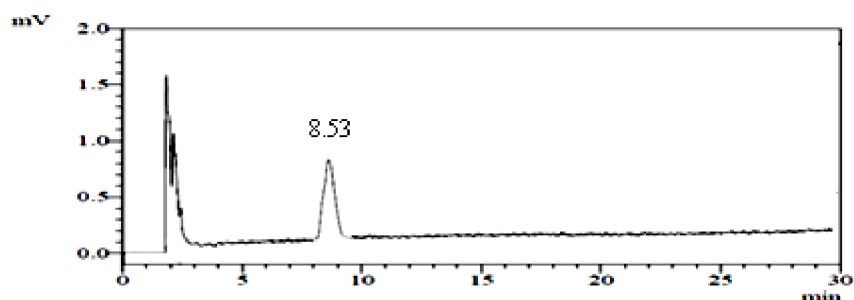


Figure 39: Profil du chromatogramme du standard sylibine

Cette figure montre que la sylibine présente un temps de rétention de 8.53 mn. L'apparition du premier pic, représente le front du solvant (DMSO) (diméthyl-sulfoxyde) qui a servi à solubiliser le témoin.

1-3-1-2- Identification du pic du standard catéchine

Le pic du chromatogramme du standard catéchine est illustré par la figure 40.

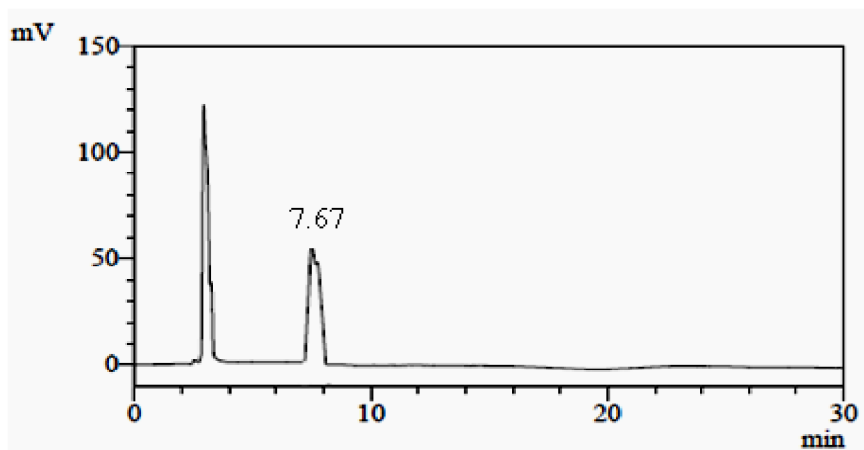


Figure 40: Profil chromatographique du standard catéchine

Cette figure indique que le temps de rétention de la catéchine est de 7.67 mn.

1-3-1-3- Identification du pic du standard naringine

Le pic du chromatogramme naringine est représenté par la figure 41.

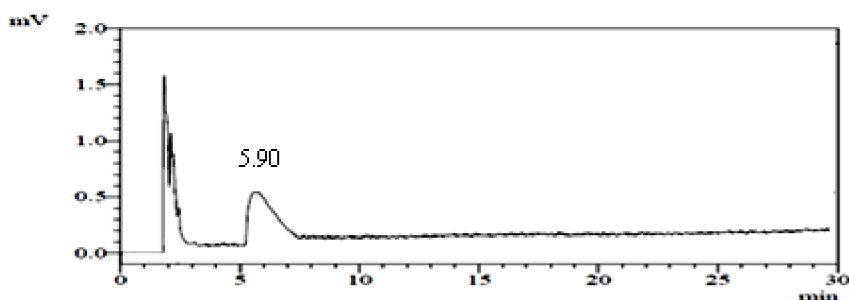


Figure 41: Profil du chromatogramme de standard naringine

La figure 41, présente le chromatogramme typique obtenu pour le standard de la naringine. Le temps de rétention est de 5.90 mn.

1-3-2- Analyse HPLC des extraits

☀ Analyse de l'extrait acétate d'éthyle

Le profil chromatographique est représenté par la figure 42 et les résultats qualitatifs sont donnés par le tableau 20.

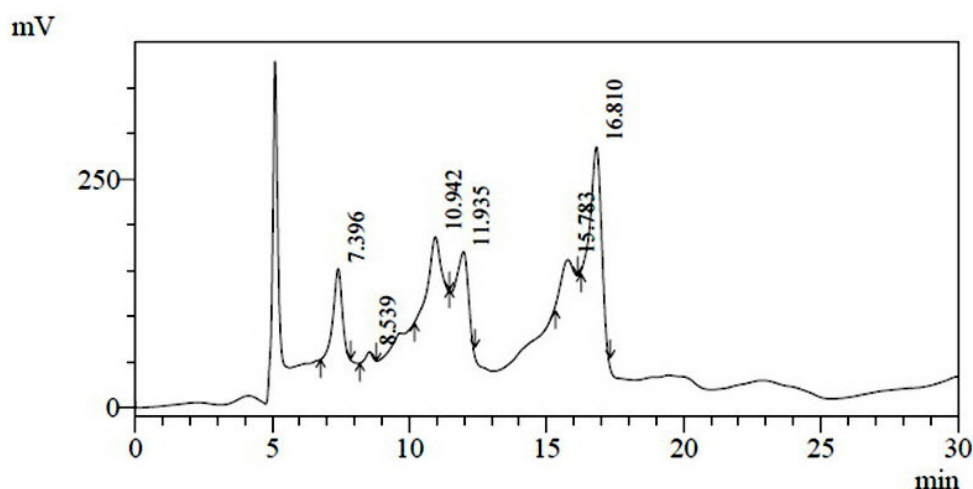


Figure 42 : Chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle

Tableau 20 : Résultats d'analyse de l'extrait acétate d'éthyle

Pics	Temps de rétention	Aire (%)	Hauteur (%)
1	7.396	18.353	21.963
2	8.539	1.371	2.349
3	10.942	17.184	16.083
4	11.935	14.786	13.244
5	15.783	7.697	7.161
6	16.810	40.607	39.200
Total		100.000	100.000

Nous observons sur le chromatogramme de l'extrait acétate d'éthyle, un pic sortant avec un temps de rétention de 8.53 mn, qui confirme la présence du composant sylibine dans notre échantillon. Nous notons la présence dans le même profil, d'autres molécules qui ont été fractionnées pendant l'élution avec des temps de rétentions compris entre 10.94 et 16.81 mn à une longueur d'onde de 280nm. Néanmoins, aucun produit n'a élué après 17mn.

☀ Analyse de l'extrait chloroforme

Le profil chromatographique de l'extrait chloroforme est indiqué par la figure 43 et les résultats sont mentionnés sur le tableau 21.

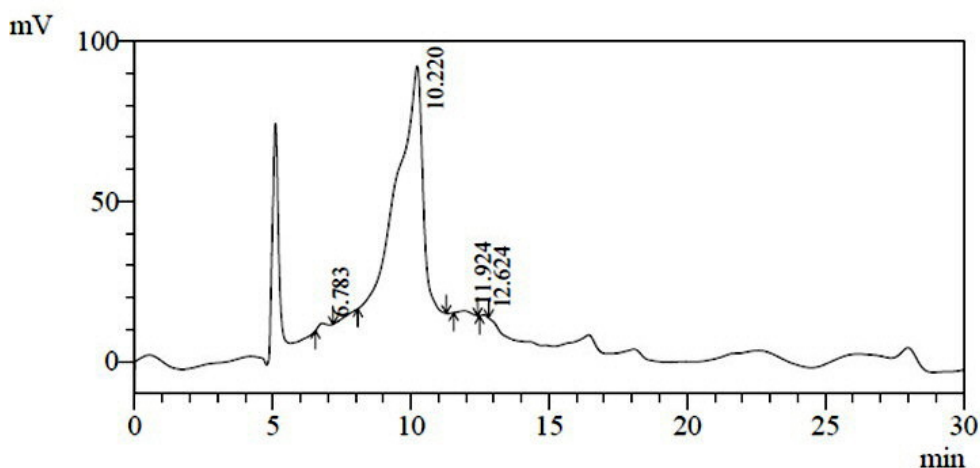


Figure 43 : Chromatogramme de l'extrait chloroforme

Tableau 21 : Résultats d'analyses de l'extrait chloroforme

Pics	Temps de rétention	Aire (%)	Hauteur (%)
1	6.783	0.618	2.010
2	10.220	98.704	96.156
3	11.924	0.558	1.174
4	12.624	0.120	0.660
Total	-	100.000	100.000

L'analyse du chromatogramme de l'extrait chloroforme, représenté par la figure et le tableau ci-dessus, a permis de séparer quatre fractions. Toutefois, nous avons remarqué qu'après un temps de rétention de 12 mn, aucune molécule n'a été identifiée. En comparant ce profil avec celui de l'acétate d'éthyle, nous constatons que ce dernier est moins riche en composés phénoliques.

☀ Analyse de l'extrait butanol

Les résultats relatifs aux différentes fractions de l'extrait butanol, sont illustrés par la figure 44 et reproduits sur le tableau 22.

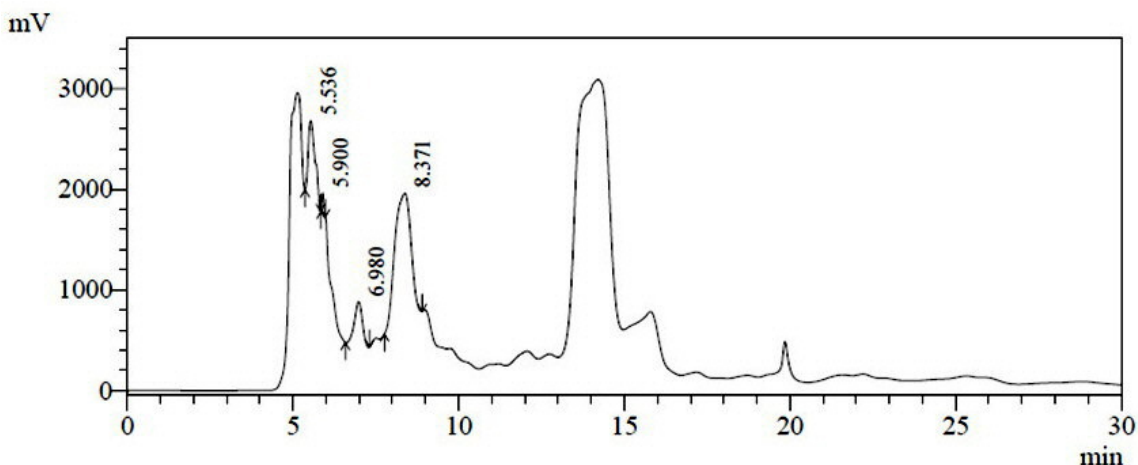


Figure 44: Chromatogramme de l'extrait butanol

Tableau 22 : Résultats d'analyse de l'extrait butanol

Pics	Temps de rétention	Aire (%)	Hauteur (%)
1	5.536	17.783	28.613
2	5.900	1.237	7.260
3	6.980	11.370	16.093
4	8.371	69.610	48.034
Total	-	100.000	100.000

Parmi les molécules fractionnées de l'extrait butanol pendant l'élution, nous avons pu identifier le produit sortant qui est similaire au témoin de la naringine avec un temps de rétention de 5.90 mn.

Notons qu'au cours de notre analyse, certains pics n'ont pas pu être identifiés par manque de standards.

☀ Analyse de l'extrait aqueux

Les résultats représentés par la figure 45 et le tableau 23 mentionnent les valeurs des temps de rétention, des composés spécifiques de l'extrait aqueux.

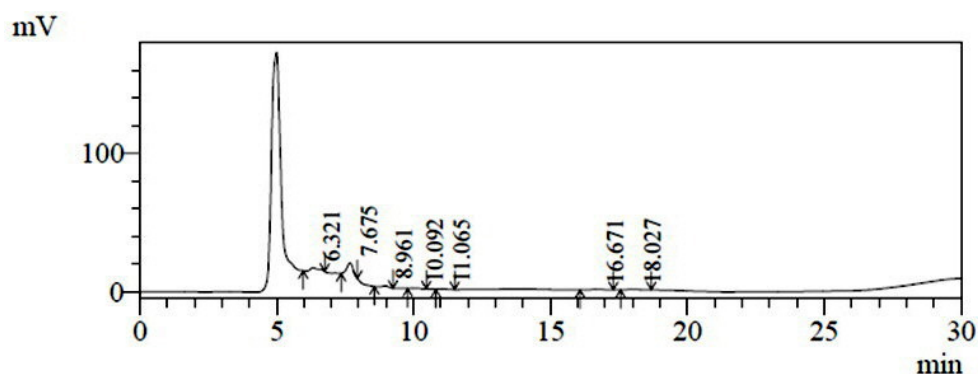


Figure 45: Chromatogramme de l'extrait aqueux

Tableau 23 : Résultats d'analyses de l'extrait aqueux

Pics	Temps de rétention	Aire (%)	Hauteur (%)
1	6.321	18.708	15.956
2	7.675	62.096	66.574
3	8.961	7.467	8.276
4	10.092	2.097	2.398
5	11.065	2.121	2.147
6	16.671	4.695	2.727
7	18.027	2.816	1.923
Total	-	100.000	100.000

En comparant les temps de rétention des standards avec ceux enregistrés dans le chromatogramme de l'extrait aqueux (Fig. 45, tab. 23), nous avons identifié un pic assimilable au témoin de la catéchine avec un temps de rétention de 7.67 mn, suivi d'une série de quelques pics obtenus avec des aires dont les pourcentages sont beaucoup moins importants comparativement à ceux des extraits acétate d'éthyle, chloroforme et butanol. Ceci est dû à l'épuisement de cet extrait qui a été affronté à plusieurs solvants, et dont le contenu total de ses métabolites a été affecté.

1-4-ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE ET ANTIFONGIQUE

1-4-1- Test du pouvoir antibactérien des différents extraits

1-4-1-1- Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits

Nous avons étudié « *in vitro* », le pouvoir antibactérien des flavonoïdes isolés des graines de *S. marianum*. par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton).

L'activité antibactérienne de quatre extraits organiques (chloroforme, acétate éthyle, butanol, et l'extrait aqueux résiduel) des graines de *S. marianum* sur trois bactéries (*E. coli*, *P. mirabilis* et *B. cereus*), est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques induite par les extraits flavoniques testés vis-à-vis de ces trois germes. Cette estimation est effectuée après 24h d'incubation à une température adéquate de 37°C. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 24.

Tableau 24 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'activité antibactérienne et sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des extraits testés

Extraits Végétaux	Concentrations (µg/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm) et sensibilité					
		<i>Proteus Mirabilis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Bacillus cereus</i>	
		D	S	D	S	D	S
Extrait Chloroforme	100	3	±	4	±	2	±
	80	2	±	2	±	0	-
	60	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-
Extrait Acétate d'éthyle	100	4	±	12	+	16	+
	80	2	±	10	+	14	+
	60	0	-	8	±	12	+
	40	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-
Extrait butanol	100	0	-	0	-	0	-
	80	0	-	0	-	0	-
	60	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-
Extrait aqueux	100	0	-	0	-	0	-
	80	0	-	0	-	0	-
	60	0	-	0	-	0	-
	40	0	-	0	-	0	-
	20	0	-	0	-	0	-

D : diamètre ; **S** : sensible ; **+** : sensible ; **±** : intermédiaire ; **-** : résistant.

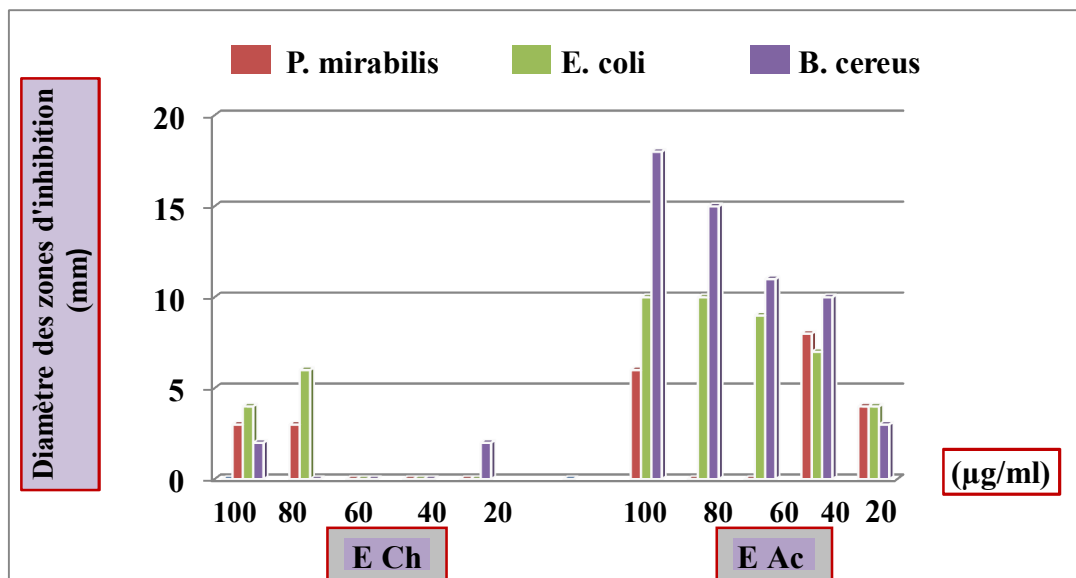


Figure 46: Représentation des diamètres d'inhibitions (mm) des différents extraits vis-à-vis des souches bactériennes testées

EBut : extrait butanol ; **EAq** : extrait aqueux ; **ECh** : extrait chloroforme ; **EAc** : extrait acétate d'éthyle.

Les résultats regroupés dans le tableau 24 et représentés par la figure 46, montrent que l'extrait acétate d'éthyle est considéré comme le plus actif. Il a une action significative sur les bactéries Gram+ (*B. cereus*) et Gram- (*E. coli*) par rapport à la phase butanol, chloroforme et la phase aqueuse résiduelle. Les différents tests réalisés font ressortir les observations suivantes :

- ☀ à une concentration de 100µg/ml, *E. coli*, *B. cereus* et *P. mirabilis* se sont montrés résistants à l'extrait butanol et aqueux. En revanche, l'extrait chloroforme présente une activité qui s'est avérée intermédiaire vis-à-vis de ces trois bactéries à la même concentration, avec des diamètres respectifs de 2, 3 et 4 mm. Cependant, les deux souches *E.coli* et *B. cereus* semblent être sensibles à l'extrait acétate d'éthyle avec des diamètres d'inhibition de 12 et 16mm, à l'exception de *P. mirabilis* qui s'est révélé intermédiaire avec un diamètre de 4mm.
- ☀ l'extrait chloroforme, dans nos conditions expérimentales, a présenté des zones d'inhibitions allant de 0 à 2 mm pour les concentrations de 20, 40, 60 et 80µg/ml pour les trois bactéries testées qualifiant celles-ci comme résistants et intermédiaires à cet extrait.

☀ l'extrait acétate d'éthyle présente une activité importante sur *B. cereus* qui s'est révélé sensible aux concentrations de 60 et 80 µg/ml avec des zones d'inhibitions comprises entre 12 mm et 14mm, et résistant aux concentrations de 20 et 40 µg/ml. *E. coli* s'est montrée sensible à la concentration de 80 µg/ml, intermédiaire à 60 µg/ml et résistante à 20 et 40µg/ml.

En revanche, l'extrait acétate d'éthyle présente une activité moins importante sur *P. mirabilis* qui s'est avéré résistant aux concentrations de 20, 40 et 60 µg/ml, et intermédiaire à la concentration de 80 µg/ml avec un diamètre de 2 mm.

☀ l'extrait butanol est inactif sur les trois bactéries utilisées, qualifiées dans la majorité des tests de résistantes à cet extrait aux concentrations de 20, 40, 60 et 80 µg/ml.

☀ l'extrait aqueux semble également inactif sur toutes les souches bactériennes et qui s'est révélé résistant aux différentes concentrations, dans la mesure où aucune zone d'inhibition n'a été détectée autour des disques imprégnés de cet extrait.

1-4-1-2- Pourcentage de l'effet antibactérien et de la sensibilité des bactéries

Cette méthode permet de classifier les souches bactériennes vis-à-vis des extraits flavonoïques par le test de sensibilité traduit par les résultats résumés dans le tableau 25 et représentés par la figure 47.

Tableau 25: Classification des bactéries selon leurs sensibilités (nombre des tests et pourcentage)

Sensibilité Bactéries	Résistant (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)
<i>P. mirabilis</i>	17	85	3	15	0	0	20	100
<i>E. coli</i>	15	75	3	15	2	10	20	100
<i>B. cereus</i>	16	80	1	5	3	15	20	100

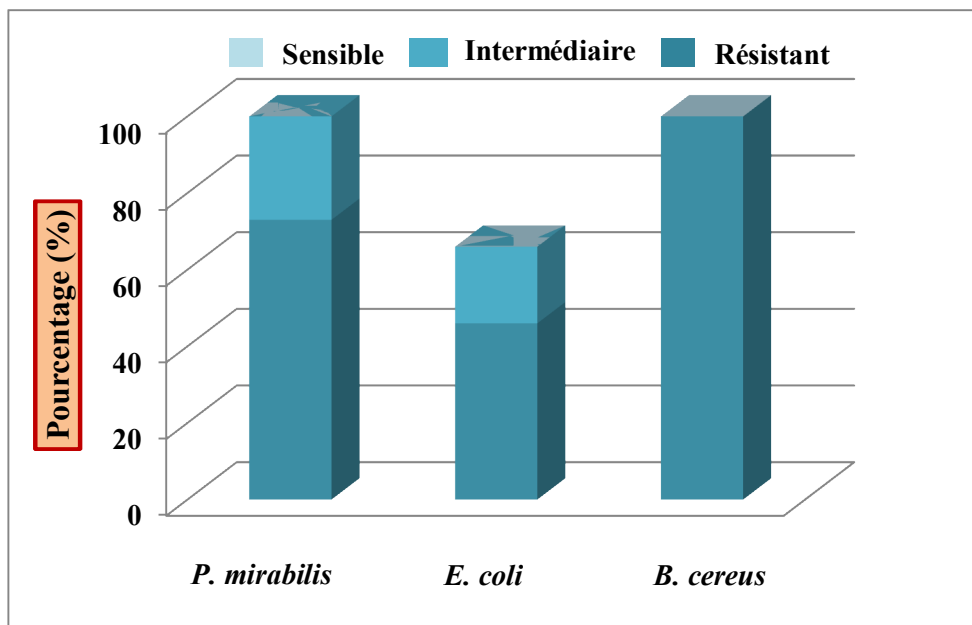


Figure 47: Différenciation des bactéries selon leurs sensibilisations

Ces résultats confirment que :

P. mirabilis est la bactérie la plus résistante, avec un pourcentage de 85% des tests, suivi par *B. cereus* (80%) et par *E. coli* (75%).

Les bactéries *E. coli* et *B. cereus* sont sensibles avec des pourcentages de 10 et 15%. Aucune sensibilité n'a été détectée chez *P. mirabilis*.

- ☀ les différents extraits testés sont également classifiés selon leurs effets dont les résultats sont mentionnés dans le tableau 26 et représentés dans la figure 48.

Tableau 26 : Classification des extraits selon leurs effets antibactériens (nombre des tests et pourcentage)

Sensibilité Extractions	Résistant (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)
Extrait chloroforme	11	73	4	27	0	0	15	100
Extrait acétate d'éthyle	7	46	3	20	5	34	15	100
Extrait butanol	15	100	0	0	0	0	15	100
Extrait aqueux	15	100	0	0	0	0	15	100

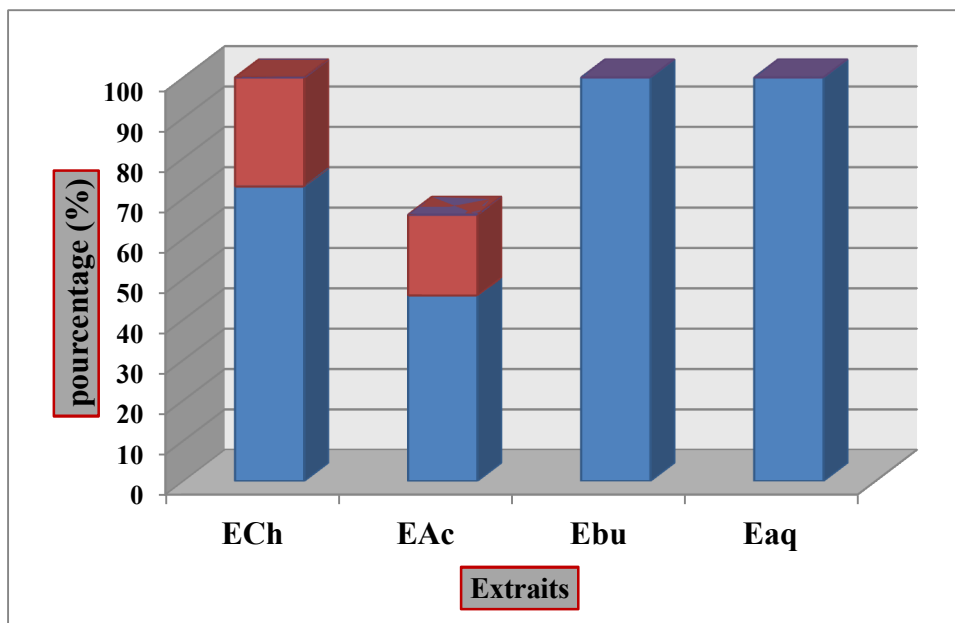


Figure 48: Classification des extraits selon leurs effets antibactériens

Il ressort du tableau et de la figure ci-dessus que parmi les extraits testés, l'acétate d'éthyle est le plus actif avec 34% des tests. Les extraits chloroforme, butanol et aqueux n'ont présenté aucun effet antibactérien, ils sont inactifs vis-à-vis des souches bactériennes étudiées. Néanmoins en ce qui concerne la résistance des bactéries, nous avons constaté que l'extrait aqueux et butanol sont les plus inactifs avec un taux de 100% de résistance des bactéries, suivi de l'extrait chloroforme avec 73% et l'extrait acétate d'éthyle avec 46%.

1-4-1-3- Sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis des antibiotiques

☀ l'antibiogramme

Nous avons testé l'activité de quatre antibiotiques commercialisés par la méthode standard des disques. Les mesures des zones d'inhibition figurant dans le tableau 27 et figure 49 ont permis de classer les souches suivant l'antibiogramme.

Tableau 27 : Diamètre des zones d'inhibitions (mm) de l'antibiogramme et sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques commercialisés

Antibiotiques	Concentrations (µg/ml)	Diamètre des zones d'inhibitions (mm) et sensibilité					
		<i>P. mirabilis</i>		<i>E. coli</i>		<i>B. cereus</i>	
		D	S	D	S	D	S
SPI	100	18	+	23	+	28	+
AMK	30	16	+	21	+	26	+
K	30	11	+	18	+	23	+
AMO	25	15	+	19	+	24	+

SPI : spiramycine ; AMK : amikacine AMO : amoxicilline; K : kanamicine ; D : diamètre ; S : sensibilité ; + : sensible.

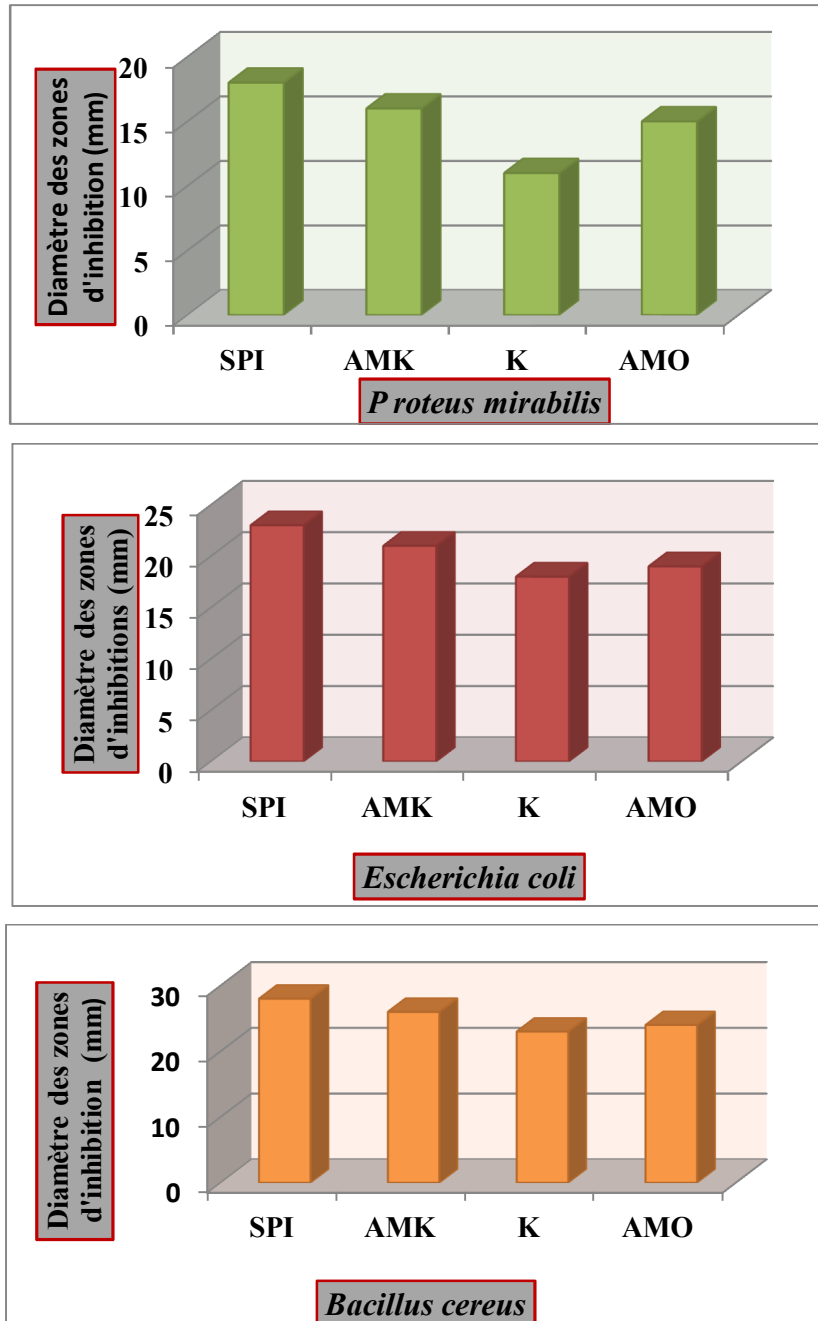


Figure 49 : Représentation des diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme représentés par la figure 49 montrent que :

- ④ la spiramycine (SPI) est l'antibiotique le plus actif vis-à-vis de *B. cereus*, *E. coli* et *P. mirabilis* qui se sont révélées sensibles avec formation de zones d'inhibition dont le diamètre est respectivement de 28 mm, 23 mm et 18 mm,
- ④ l'Amikacine (AMK) est un antibiotique qui s'est révélé également actif vis-à-vis des trois souches bactériennes avec des zones d'inhibition de 26, 21 et 16 mm,
- ④ l'Amoxicilline (AMO) est moyennement actif, révélant des zones d'inhibition de 15 mm pour *P. mirabilis* qui s'est avérée moyennement sensible. Néanmoins les souches *B. cereus* et *E. coli* se sont montrées plus sensibles avec des zones d'inhibitions de 24 et 19 mm,
- ④ la kanamycine (K) agit sur les trois souches qui paraissent sensibles en enregistrant des diamètres d'inhibition de 23 mm, 18 mm et 11 mm.

1-4-2- Test du pouvoir antifongique des différents extraits

1-4-2-1- Sensibilité des souches vis-à-vis des extraits

L'étude du pouvoir antifongique des extraits vis-à-vis de deux champignons testés, *A. brasiliensis* et *C. albicans*, présente les diamètres des différentes zones d'inhibition, mentionnés dans le tableau 28 figure 50.

Tableau 28 : Diamètres des zones d'inhibitions (mm) de l'activité antifongique et sensibilité des champignons vis-à-vis des extraits testés

Extraits Végétaux	Concentrations (µg/ml)	Diamètres des zones d'inhibition (mm) et sensibilité			
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Candida albicans</i>	
		D	S	D	S
Extrait chloroforme	100	0	-	6	±
	80	0	-	4	±
	60	0	-	2	±
	40	0	-	0	-
	20	0	-	0	-
Extrait Acétate d'éthyle	100	11	+	12	+
	80	10	+	10	+
	60	7	±	7	±
	40	0	-	5	±
	20	0	-	2	±
Extrait butanol	100	0	-	0	-
	80	0	-	0	-
	60	0	-	0	-
	40	0	-	0	-
	20	0	-	0	-
Extrait aqueux	100	0	-	0	-
	80	0	-	0	-
	60	0	-	0	-
	40	0	-	0	-
	20	0	-	0	-

D : diamètre ; **S** : sensible ; + : sensible ; ± : intermédiaire ; - : résistant.

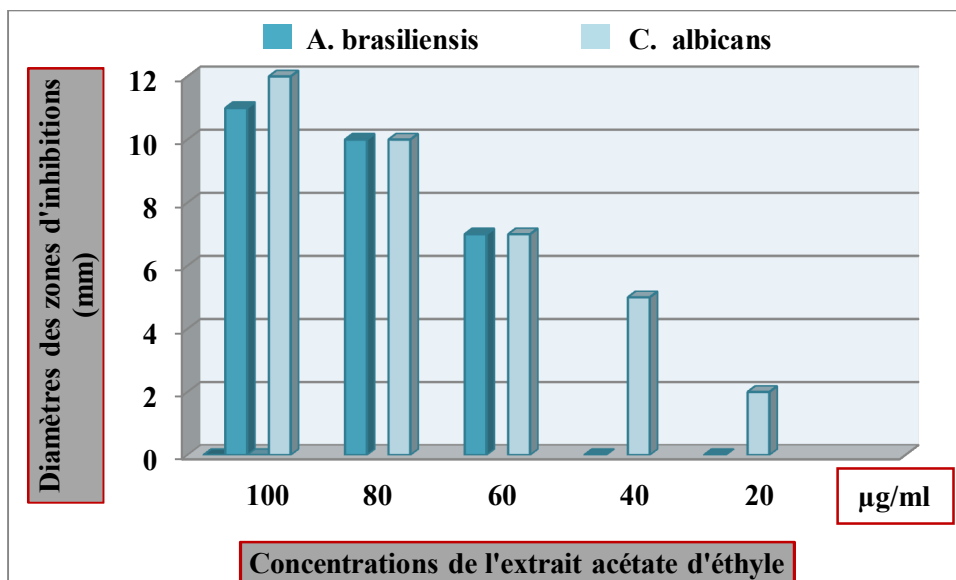
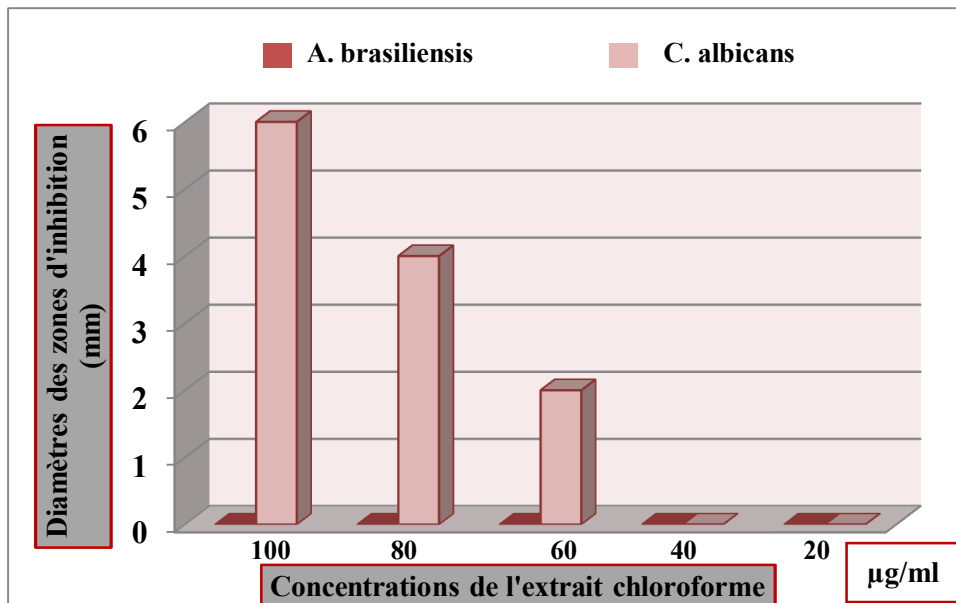


Figure 50 : Représentation des diamètres d'inhibitions (mm) des différents extraits vis-à-vis des souches testées

Les résultats des tests antifongiques montrent que :

- *brasiliensis* est qualifié de sensible à l'extrait acétate d'éthyle avec une zone d'inhibition de 11 mm à la concentration de 100 µg/ml, et de résistant à la même concentration pour les extraits chloroforme, butanol et aqueux dans la mesure où aucune zone d'inhibition n'a été détectée autour des disques imprégnés de ces extraits. Néanmoins, l'extrait chloroforme, butanol et aqueux ne présentent aucune activité sur ce champignon. Aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des disques chargés

de ces extraits aux concentrations de 20, 40, 60 et 80 µg/ ml. Cependant, l'acétate d'éthyle s'est avéré l'extrait le plus actif où nous avons enregistré une zone d'inhibition de 10 mm à la concentration de 80 µg/ml.

- ☉ à la concentration de 100 µg/ml, *C. albicans* est qualifié comme sensible à l'acétate d'éthyle, où nous avons enregistré des zones d'inhibition d'une valeur de 12 mm. Nous avons noté une résistance de cette levure vis-à-vis des extraits butanol et aqueux qui sont inactifs. Cependant, elle s'est montrée intermédiaire vis-à-vis de l'extrait chloroforme avec un diamètre d'inhibition de 6 mm.
- ☉ *C. albicans* est qualifié comme sensible et intermédiaire à l'acétate d'éthyle et au chloroforme où nous avons enregistré des zones d'inhibition qui varient entre 2 et 7 mm aux concentrations comprises entre 20, 60 et 80 µg/ml.

1-4-2-2- Pourcentage de l'effet antifongique et de la sensibilité des champignons

Les souches fongiques ont été classées selon leur sensibilité. Les résultats sont indiqués dans le tableau 29 et représentés par la figure 51.

Tableau 29: Classification des champignons selon leur sensibilité (nombre des tests et pourcentage)

Sensibilité Champignons	Résistant (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	17	83	1	5	2	10	20	100
<i>Candida albicans</i>	12	60	6	30	2	10	20	100

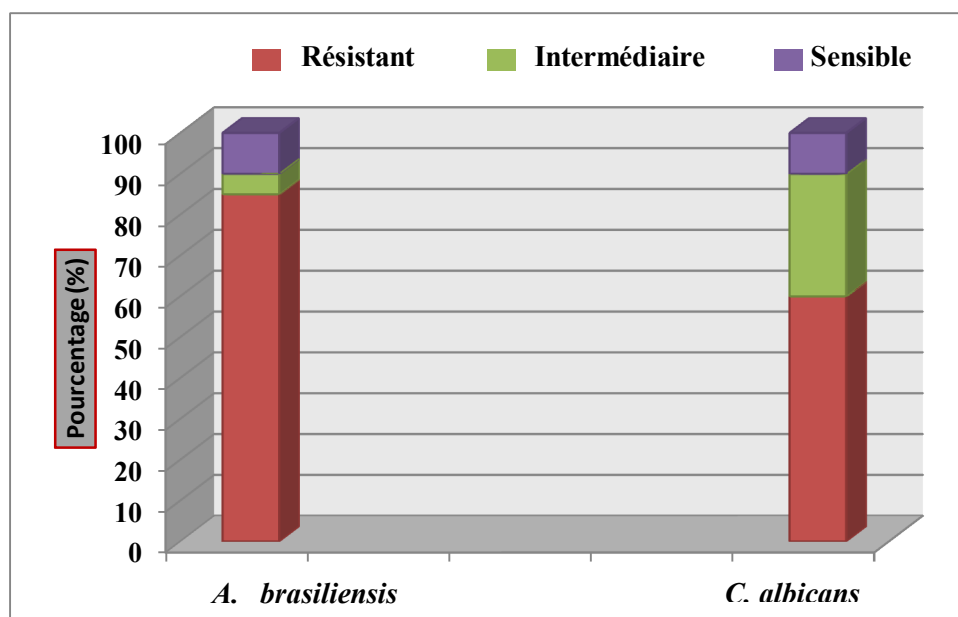


Figure 51 : Classification des champignons selon leur sensibilité

D'après les résultats du tableau et de la figure ci-dessus, nous pouvons déduire que :

- ☉ du point de vu sensibilité, *A. brasiliensis* et *C. albicans* sont sensibles vis-à-vis des extraits utilisés avec un pourcentage de 10% des tests réalisés.

1-4-2-3- Pourcentage de l'effet antifongique des extraits

Les extraits ont été classés selon leurs effets antifongiques (Tab. 30).

Tableau 30: Classification des extraits selon leurs effets antifongiques (nombre des tests et pourcentages)

Sensibilité Extractions	Résistant (-)		Intermédiaire (±)		Sensible (+)		Totaux	
	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)	Nombre des tests	(%)
Phase chloroforme	7	70	3	30	0	0	10	100
Phase acétate d'éthyle	4	10	2	20	4	40	10	100
Phase butanol	10	100	0	0	0	0	10	100
Phase aqueuse	10	100	0	0	0	0	10	100

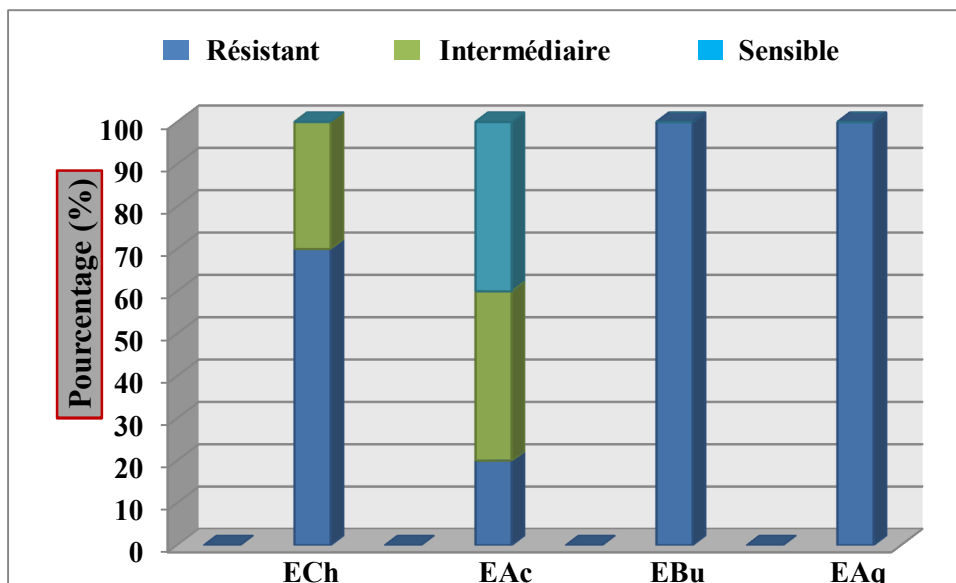


Figure 52 : Classification des extraits selon leurs effets antifongiques

Les résultats regroupés dans le tableau 30 et représentés par la figure 52 révèlent :

- les souches fongiques ont montré une grande résistance aux extraits testés, ceci est reflété par les forts pourcentages de résistance, avec 70% pour l'extrait chloroforme, et 100% pour les extraits butanol et aqueux, à l'exception de l'extrait acétate d'éthyle qui représente un pourcentage de résistance faible de 10%.
- une sensibilité des souches de l'ordre de 40% vis-à-vis de l'extrait acétate d'éthyle. Les extraits chloroforme, butanol et aqueux se sont avérés inactifs avec un taux de sensibilité nul (0%).

1-4-2-4- L'antifongigramme

Les résultats de l'antifongigramme testé sur *A. brasiliensis* et *C. albicans* sont résumés dans le tableau 31.

Tableau 31: Diamètre d'inhibition (mm) de l'antifongigramme et sensibilité des champignons vis-à-vis de l'antifongique commercialisé

Les antifongiques	Concentration (%)	Diamètre des zones d'inhibitions (mm) et sensibilité			
		<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Candida albicans</i>	
		D	S	D	S
Pevaryle	1%	20	+	18	+

Les résultats de l'antifongigramme révèlent que :

- Pevaryle (PEV) ou Econazole est un antifongique actif, il présente des diamètres d'inhibition de 20 mm sur *A. brasiliensis*, et 18 mm sur *C. albicans*. Ces deux champignons ont montré une sensibilité vis-à-vis de cet antifongique.

1-4-3- Evaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les résultats des tests antibactériens et antifongiques réalisés en utilisant la méthode de dilution en milieu liquide sont consignés dans le tableau 32. Ils expriment la concentration minimale inhibitrice de l'extrait acétate d'éthyle sur les germes étudiés. Les tubes expérimentaux numérotés de C1 à C5 contiennent à la fois les différents germes et l'extrait acétate d'éthyle. Dans ces tubes, nous avons noté que les concentrations croissantes de cet extrait (3.12 ; 6.25 ; 12.5 ; 25 et 50 µg/ml) provoquent une diminution progressive de la turbidité induite par la croissance des souches. Cette turbidité liée à la quantité de germes présents dans le tube est mesurée avant et après l'incubation. Pour chaque tube expérimental sont notées la densité optique initiale (di) et finale (df). La différence entre les valeurs de ces deux densités optiques (df – di) exprime le niveau de la croissance bactérienne dans le tube concerné. Ainsi, pour *E.coli* et *B. cereus*, la CMI est de 50 µg/ml ; pour *C. albicans* et *A. brasiliensis*, elle est respectivement de 12.5 et 50 µg/ml.

Tableau 32 : Variation de la turbidité en fonction de la concentration de l'extrait acétate d'éthyle sur les souches étudiées

Souches microbiennes	TC (µg/ml)	C1 (µg/ml)	C2 (µg/ml)	C3 (µg/ml)	C4 (µg/ml)	C5 (µg/ml)
<i>E. coli</i>	3.55	1.56	1.38	1.08	0.92	0.00
<i>B. cereus</i>	4.70	1.39	1.27	1.14	1.10	0.00
<i>C. albicans</i>	1.67	1.15	1.04	0.00	0.00	0.00
<i>A. brasiliensis</i>	2.70	1.33	1.30	1.23	1.10	0.00

TC : concentration du témoin ; C : concentration des extraits.

2-DISCUSSION

2-1- Rendement

Les données correspondants aux rendements des différents extraits, par rapport au poids total des graines et par rapport à l'extrait brut, ont montré qu'il est le mieux représenté suivi par l'extrait chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueux. Ces résultats ne peuvent être comparés avec ceux de la bibliographie, car le rendement semble être lié aux propriétés génétiques de l'espèce utilisée, à la nature des organes pour une même espèce (Bruneton, 1999), à l'origine géographique (Narayana *et al.*, 2001), aux conditions de récolte (Lin et Weng, 2006) et aussi aux matériels et méthodes de l'extraction appliqués (Markham, 1982).

En effet, Kechar (2007) et Lahlah (2008), sur la même espèce évoluant dans la région de Constantine, ont noté des rendements similaires en utilisant les mêmes solvants d'extraction. Cependant, sur le plan quantitatif, ils ont obtenu des valeurs supérieures aux nôtres.

L'étude phytochimique de quelques principes actifs supposés être présents dans les différents extraits, et connus pour leur activités antimicrobienne, nous a permis de constater que tous les extraits obtenus contiennent des flavonoïdes. Ceci témoigne de l'efficacité de la méthode adoptée pour l'extraction de ce type de composés, utilisant des solvants à polarité croissante, permettant d'épuiser successivement la matière végétale et de séparer les composés de l'extrait brut selon leur degré de solubilité dans les solvants d'extraction et donc selon leur degré de glycosylation (Markham, 1982).

2-2- Étude phytochimique par chromatographie sur couche mince

Pour l'analyse qualitative du contenu phénolique de nos différents extraits, nous avons eu recours à l'utilisation de la CCM en se référant aux standards disponibles ; c'est l'une des méthodes de séparation des différents constituants d'un extrait végétal et qui est plutôt simple à mettre en œuvre.

Cette technique a permis une approche préliminaire de la composition des extraits obtenus, en faisant correspondre à chaque spot coloré une classe de flavonoïdes. Elle a contribué à mettre en évidence les différentes familles de flavonoïdes existantes, en fonction de leur façon de migrer dans les conditions expérimentales, ce qui a révélé la composition de nos extraits en flavones, flavanones, flavonols, flavanonols isoflavones, flavonolignanes, anthocyanes, anthocyanidine 3- glucoside et acide phénols. Grâce au système d'élution à polarité différente et aux témoins utilisés, nous avons pu mettre en évidence dans l'extrait acétate d'éthyle un flavonolignane qui est la silybine et, un flavonol qui est la catéchine dans l'extrait butanol avec le système de solvant chloroforme / acétone / acide formique.

Il est à noter que la sylibine a été détectée, sur la même espèce, dans les travaux de Widmer (1999), Kechar (2007) et Lahlah (2008). La catéchine est également présente dans l'extrait butanol et acétate d'éthyle avec le système chloroforme / méthanol / eau. Vu la présence du chloroforme dans ces deux éluants, nous constatons que ce solvant est responsable de son élution. La naringine qui est un hétéroside de flavonoïde identifié dans les trois extraits (acétate d'éthyle, butanol, aqueux et chloroforme) pour les deux systèmes de solvants utilisés (chloroforme / acétone / acide formique) et (chloroforme / méthanol / eau).

La même molécule est soluble dans des solvants variés. Selon Guernet et Hamon (1981), il peut coexister des caractères polaires et apolaires chez les molécules organiques, ce qui entraîne une affinité pour des solvants très divers. Par ailleurs, la structure des flavonoïdes est généralement complexe, formée de plusieurs cycles (Heller, 1998); ils ne sont pas solubles dans un solvant spécifique mais plutôt dans divers solvants de polarités différentes.

Nous remarquons aussi que les composés chimiques présents chez *S. marianum* sont de nature polaire et apolaire, ils se présentent sous forme de glycosides et d'aglycones. La bonne séparation apparaît dans les systèmes polaires, ce qui prouve que les flavonoïdes existants sont de nature polaires et apolaires.

2-3- Étude phytochimique par chromatographie liquide à haute performance

Le système HPLC est une haute technique de résolution chromatographique largement répandue, pour la séparation et la quantification simultanées des substances phénoliques (Proestos *et al.*, 2006). Cette technique d'analyse a permis de caractériser et de détecter la présence de quelques composés phénoliques suivants : la sylibine, la catéchine et la naringine dans les extraits acétate d'éthyle, chloroforme, butanol et aqueux ; et ce sur la base des temps de rétention.

Les résultats de l'analyse qualitative des composés phénoliques sont identifiés à partir des profils chromatographiques des différents extraits testés, dans le but de démontrer l'efficacité de la technique HPLC dans la détection de ces analytes. Nous avons identifié la présence du flavonolignane sylibine dans l'extrait acétate d'éthyle avec un temps de rétention de 8.53 mn, rejoignant ainsi les résultats de Hamraparkan *et al.* (2010) qui ont utilisé un échantillon de teinture mère de *S. marianum* en adoptant une phase mobile (tampon phosphate / eau ; 65% / 35%, V / V).

Nos résultats confirment également la présence de la catéchine et de la naringine dans les différents extraits aqueux et butanolique avec des temps de rétention respectifs de 7.67 et 5.90 mn. Aucune déformation des pics chromatographiques n'a été observée, ce qui traduit une séparation correcte. Cependant, d'autres composés pourraient y exister et qui n'ont pas pu

être identifiés par manque d'étalons. L'extrait aqueux semble riche en métabolites représentés par de nombreux pics traduisant des pourcentages faibles qui s'expliquent par l'épuisement de cet extrait par les différents solvants à polarité croissante, utilisés lors de la séparation liquide-liquide des métabolites. Le méthanol utilisé pour l'extraction a un rôle protecteur, il peut empêcher les composés phénoliques d'être oxydés par des enzymes, telles que des phénoloxydases.

Les résultats de HPLC confirment ceux obtenus par CCM concernant l'identification des composés phénoliques.

2-4- Activité microbiologique

Les résultats des tests microbiologiques révèlent des réponses variables des souches vis-à-vis des extraits testés et de leurs concentrations.

D'après les résultats relatifs à la sensibilité des bactéries et des champignons vis-à-vis des substances antibactériennes et antifongiques testées (extraits testés), nous constatons que les différentes souches étudiées réagissent différemment.

D'une façon générale, nous avons remarqué la sensibilité des bactéries à Gram (+) [*B. cereus*] avec un taux de 15% des tests sensibles par rapport à celles à Gram (-) [*E. coli*] avec un pourcentage de 10%, et un taux de sensibilité nul pour *P. mirabilis* qui semble la plus résistante avec un pourcentage de 0%. D'après Lee (2003), la sensibilité des bactéries Gram (+) est due à l'action inhibitrice de la sylibine sur les protéines de synthèse et sur l'ARN.

Cette substance a été révélée par CCM et HPLC dans l'extrait acétate d'éthyle, d'où très probablement son effet positif mis en évidence contre ce genre de bactéries dans ce présent travail. Par ailleurs, Pathak *et al.* (1991) relie la sensibilité des bactéries Gram (+) aux polyphénols, soit à l'inhibition des enzymes nécessaires à la production de l'énergie dans la cellule bactérienne, soit aux changements au niveau de la perméabilité de la cellule et à l'inhibition de la synthèse de l'ARN.

Plusieurs travaux ont mis en évidence la sensibilité des bactéries à Gram (+) par rapport au Gram (-) (Koné *et al.*, 2004 ; Hayouni *et al.*, 2007 ; Shan *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007 ; Falleh *et al.*, 2008). Ceci peut s'attribuer à la différence dans les couches externes des bactéries à Gram (-) et celles à Gram (+). En effet les bactéries à Gram (-) possèdent une couche additionnelle à la membrane externe qui se compose de phospholipides, de protéines et de lipopolysaccharides. Cette membrane forme une barrière imperméable à la plupart des molécules hydrophobes (Georgantelis *et al.*, 2007).

En ce qui concerne l'activité antibactérienne des extraits flavonoïques, les tests de sensibilités réalisés par la méthode de diffusion par des disques, nous ont permis de classer les extraits flavonoïques selon leurs effets :

L'extrait acétate d'éthyle s'est révélé le plus actif ayant entraîné un taux de sensibilité de 34% chez les bactéries testées. Cet extrait est actif sur *B. cereus* aboutissant à la formation de zones d'inhibition avec des diamètres plus importants (12mm à 16mm) par rapport à ceux présentées sur *E. coli* (8 mm à 12 mm). Dans les travaux de Kechar (2007), *E. coli* s'est révélée résistante aux extraits acétate d'éthyle et butanol et dans les travaux de Lahlah (2008), aux extraits chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueux.

Par ailleurs, il est important de souligner que les deux auteurs suscités ont mené leur expérimentation sur des souches bactériennes non référencées, en l'occurrence *E. coli*. L'acétate d'éthyle agit aussi bien sur les bactéries Gram (+) que sur les bactéries à Gram (-). Toutefois, les bactéries Gram (-) paraissent moins sensibles à son action ; ceci est directement lié à la structure de la paroi cellulaire.

L'extrait acétate d'éthyle est par contre beaucoup moins actif sur *P. mirabilis* qui a manifesté une sensibilité intermédiaire se traduisant par des diamètres d'inhibitions compris entre 2 et 4 mm.

L'extrait chloroforme, butanol et aqueux ayant induit un pourcentage de sensibilité nul, sont totalement inactifs sur les souches bactériennes.

Les tests de l'activité antibactérienne des différents extraits ont montré que les souches *B. cereus* et *E.coli* sont inhibés par l'extrait acétate d'éthyle, présentant un effet plus marqué par rapport aux autres extraits testés.

Cette sensibilité est en relation avec le nombre d'hydroxyles libres, les flavonoïdes les moins hydroxylés sont les plus actifs. Selon Cowan (1999), au cours de l'extraction liquide-liquide, les phytomolécules sont réparties entre les solvants en fonction de leur polarité et leur solubilité. On pourrait en déduire que les substances antibactériennes contenues dans *S. marianum* sont plus solubles dans l'acétate d'éthyle que dans les autres solvants utilisés.

Ceci a été confirmé par la présence du flavonolignane sylibine au niveau de l'extrait acétate d'éthyle. L'acétate d'éthyle concentrerait alors mieux le principe actif. Cowan (1999) supposait que les flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres, ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires. Donc nous pouvons supposer que les flavonoïdes ciblent la membrane cytoplasmique de la souche microbienne.

Ces résultats sont conformes à ceux de Lee *et al.* (2003) ayant travaillé sur des astéracées. Les travaux de Zareen (2006) montrent également que la fraction acétatique de *Morinda morindoide* (Rubiacée) est riche en polyphénols (dérivés de l'acide ellagique), ce qui justifierait l'importante activité de l'acétate d'éthyle.

L'effet antibactérien de l'extrait acétate d'éthyle est signalé également dans d'autres travaux réalisés sur d'autres espèces végétales comme *Thymus vulgaris* et *Rosmarinus officinalis* sur *E. coli* (Zeghad, 2008) ; *Parkia biglobosa* et *Parkia bicolor* sur *B. cereus* (Ajaiyeoba *et al.*, 2002).

L'activité antibactérienne des flavonoïdes peut être expliquée par le mécanisme de toxicité vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques, tels que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation des ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien et la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries (Karou *et al.*, 2005).

Il a été rapporté que les extraits de plantes et beaucoup d'autres préparations phytochimiques riches en flavonoïdes exercent une activité antimicrobienne (Tim *et al.*, 2005). Grâce à leur structure caractérisée par la présence de groupe phénolique et d'autres fonctions chimiques, les flavonoïdes sont considérés de très bons agents antimicrobiens (Harborne et Williams., 2000).

Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les tannins servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes et les herbivores pathogènes (Falleh *et al.*, 2008). Les polyphénols, les tannins et les flavonoïdes comme l'epigallocatechine, la catéchine, la myricétine, la quercétine (Shan *et al.*, 2007) et la lutéoline (Askun *et al.*, 2009) sont des substances antibactériennes importantes.

Certaines catéchines (flavan-3-ols), la naringénine et la quercétine possèdent un effet antibactérien en provoquant un changement de perméabilité membranaire (Cushnie *et al.*, 2005).

Les flavonoïdes agiraient à plusieurs niveaux. Il semblerait que le cycle B joue un rôle important dans l'intercalation avec les acides nucléiques, et inhiberait ainsi la synthèse d'ADN et d'ARN. Ils peuvent également inhiber l'ADN gyrase d'*E. coli*, là encore une hydroxylation du cycle B semble essentielle à l'activité (Cushnie *et al.*, 2005).

L'antibiogramme a montré que *B. cereus*, *E. coli* et *P. mirabilis* sont sensibles à la spiramycine. Cette sensibilité est due au fait que cet antibiotique a un large spectre d'action agissant essentiellement sur diverses bactéries aérobies et anaérobies à Gram (+) et quelques bactéries à Gram (-) (Peypert, 1991). Ceci a été montré par les diamètres d'inhibition

manifestés sur les souches à Gram (+) (28mm) par rapport à ceux des Gram (-) (18 mm et 23 mm). L'antibiotique spiramycine agit en inhibant la synthèse protéique bactérienne (il se fixe sur l'unité 50S du ribosome et bloque ainsi la réunion du dernier stade de synthèse (Yala *et al.*, 2001). Les bactéries utilisées ont également manifesté une sensibilité vis-à-vis des antibiotiques utilisés (amikacine, kanamycine et amoxicilline) avec des zones d'inhibition qui varient de 11 à 26 mm.

Les tests de l'activité antifongique des différents extraits ont montré que *C. albicans* et *A. brasiliensis* sont inhibés par l'extrait acétate d'éthyle qui présente un effet plus marqué par rapport aux autres extraits testés avec un taux de sensibilité de 40% des tests. Les extraits chloroforme butanol et aqueux restent inactifs envers ces deux souches qui présentent un fort pourcentage de résistance des tests, compris entre 70 et 100%.

Les diamètres d'inhibition compris entre 2mm et 12 mm sont enregistrés par l'extrait acétate d'éthyle sur *C. albicans*, et entre 0 mm et 11 mm sur *A. brasiliensis*. Cependant *C. albicans* présente une sensibilité intermédiaire pour l'extrait chloroforme et est par contre résistant aux deux extraits restants.

Les travaux de Lahlah (2008), sur cette espèce, confirment l'action significative de l'extrait acétate sur la même souche ; les résultats des extraits restants sont différents des nôtres, dans la mesure où une forte inhibition a été induite par les extraits butanol et chloroforme avec des diamètres d'inhibition de 18 et 17 mm. Aussi, une faible activité a été détectée pour l'extrait aqueux avec un diamètre d'inhibition de 8mm.

Les travaux de Kechar (2007) ont indiqué que la souche *C. albicans* répond de la même manière à l'activité antifongique de l'extrait acétate d'éthyle avec des diamètres de 16 mm ; les valeurs de l'extrait butanol dénotent également une action inhibitrice vis-à-vis de ce champignon avec des zones d'inhibition de 10 mm ce qui ne concorde pas avec nos résultats.

La souche *C. albicans* s'est montrée résistante, ce qui est traduit par les forts pourcentages de résistance : 100% pour l'extrait butanol et l'extrait aqueux, et 70% pour l'extrait chloroforme. Néanmoins la souche *A. brasiliensis* s'est montrée résistante vis-à-vis des extraits chloroforme, butanol et aqueux. Les diamètres d'inhibition enregistrés par les extraits flavonoïques vis-à-vis des souches fongiques analysées, sont moins importants à ceux fournis par l'antifongigramme.

Certains antifongiques bloquent le déroulement des mitoses en métaphase, interférant avec la synthèse des acides nucléiques, et inhibant la fonction des microtubules.

Ces perturbations cellulaires aboutissent à l'altération de la paroi du filament fongique (Epstein *et al.*, 1972).

De nombreux flavonoïdes possèdent des activités antifongiques, le plus grand nombre appartient aux flavanones et aux flavanes (Grayer *et al.*, 1994). Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) ainsi qu'une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) sont actives contre *C. albicans* (Cushnie *et al.*, 2005).

Quelle que soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique (Grayer *et al.*, 1994 ; Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008). De plus, la présence d'une chaîne isoprène apparaît comme importante pour l'activité, mais pas essentielle (Jimenez-Gonzalez *et al.*, 2008).

Globalement, nous constatons que les extraits utilisés présentent une activité antimicrobienne prononcée lorsqu'ils sont concentrés ; et plus ils sont dilués moins ils sont actifs. C'est l'exemple de l'effet de l'extrait acétate d'éthyle.

Toutefois, il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la bibliographie. En effet, les différences trouvées dans les études d'évaluation du pouvoir antibactérien et antifongique des différents principes actifs, peuvent être attribués à plusieurs facteurs : tels que la nature de l'espèce, les conditions ambiantes, les facteurs écologiques, les variations saisonnières, les méthodes d'extractions (Sagdic et Ozcan, 2003 ; Moreira *et al.*, 2005 ; Celiktas *et al.*, 2007 ; Turkmen *et al.*, 2007) ; la préparation de l'extrait, le solvant utilisé, la sensibilité des bactéries, la concentration de l'extrait (Loziene *et al.*, 2007) et finalement l'organe de la plante utilisé (Natarajan *et al.*, 2005).

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'activité antifongique des extraits flavonoïques, puisque la plupart des études sont menées sur les huiles essentielles. Ces dernières étant généralement les composés les plus actifs sur les moisissures (Sacchetti *et al.*, 2005 ; Rasooli *et al.*, 2008).

Les travaux menés par Baba-Moussa *et al.* (1999) ont montré que les extraits de *Terminalia avicennioides* et de *Pteleopsis subarosa* présentent des activités antifongiques contre *C. albicans*. De même, les travaux de Batawila (2007) ont montré que les extraits des feuilles et des racines de *Terminalia glaucescens*, les extraits des feuilles, des racines et des écorces de la tige de *Terminalia macroptera*, ainsi que les extraits de *Terminalia laxiflora* ont des activités antifongiques sur *C. albicans*.

Les CMI sont évaluées uniquement sur l'extrait acétate d'éthyle, étant donné que ce dernier est le seul extrait ayant exercé un pouvoir inhibiteur sur les souches bactériennes (*E. coli* et *B. cereus*) ainsi que sur les souches fongiques testées (*A. brasiliensis* et *C. albicans*).

Une CMI de 50 µg / ml a été évaluée sur *B. cereus*, *E. coli* et *A. brasiliensis*. Alors que sur *C. albicans*, cette CMI est de l'ordre de 12.5 µg / ml. La CMI n'a pas été évaluée sur *P. mirabilis*, vu sa sensibilité intermédiaire.

Les CMI enregistrées par l'EAc vis-à-vis de toutes les souches microbiennes varient entre 12.5 et 50 µg/ml. Selon la classification faite par Aligiannis *et al.* (2001), cette inhibition est forte (CMI < 500 µg/ml).

CONCLUSION

3- CONCLUSION

À la lumière des résultats obtenus, il ressort que les rendements des extraits obtenus à partir des graines (akènes) de *S. marianum* sont relativement importants. Nous avons remarqué que le rendement diminue d'une phase à une autre. L'extrait brut avec une valeur de 4.70%, suivi de l'extrait chloroforme avec 1.16%, l'extrait acétate d'éthyle avec 0.67%, l'extrait butanol avec 0.58%. Le plus faible rendement est celui obtenu par l'extrait aqueux avec un pourcentage de 0.23%.

Par ailleurs, l'analyse qualitative des flavonoïdes des quatre fractions chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et aqueuse par chromatographie sur couche mince grâce au système d'élution choisi a révélé dans nos extraits la présence des flavones, flavanones, flavonols, flavanonols, isoflavones, flavonolignanes, anthocyanes, anthocyanidine 3- glucoside et acide phénols. En référence aux standards utilisés, nous avons pu mettre en évidence dans l'extrait acétate d'éthyle, la présence de silybine. La catéchine est également présente dans l'extrait acétate d'éthyle et butanol. La naringine est identifiée dans les trois extraits acétate d'éthyle, butanol et chloroforme.

La caractérisation par chromatographie liquide à haute performance des flavonoïdes a confirmé les résultats de la chromatographie sur couche mince. Les pics ainsi détectés au cours de cette analyse, correspondent réellement aux standards utilisés, d'où la présence de la silybine dans l'extrait acétate d'éthyle avec un temps de rétention de 8.53 min. Nos résultats confirment également la présence de la catéchine et de la naringine dans les différents extraits aqueux et butanolique avec des temps de rétention respectifs de 7.67 et 5.90 min.

Par ailleurs, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide haute performance ont permis d'apporter un complément sur le profil phytochimique de l'espèce étudiée, marqué par la présence de trois classes flavonoïques (la silybine, la catéchine et la naringine) qui sont certainement responsables du pouvoir antimicrobien et antifongique « *in vitro* » de *S. marianum*.

En outre, ces extraits flavonoïques exercent également des effets antibactériens et antifongiques sur les souches microbiennes testées.

Ces effets varient en fonction du type d'extrait flavonoïque et de ses concentrations, de la résistance ou la sensibilité des souches utilisées.

D'une façon générale, nous avons remarqué la sensibilité des bactéries à Gram (+) [*B. cereus*] avec un taux de 15% des tests sensibles par rapport à celles à Gram (-) [*E. coli*] avec un pourcentage de 10%, et un taux de sensibilité nul pour la souche *P. mirabilis* qui semble la plus résistante avec un pourcentage de 0%.

L'extrait acétate d'éthyle s'est révélé le plus actif ayant entraîné un taux de sensibilité de 34% chez les bactéries testées. Cet extrait est actif sur *B. cereus* aboutissant à la formation de zones d'inhibition avec des diamètres plus importants (12mm à 16mm) par rapport à ceux présentées sur *E. coli* (8 mm à 12 mm).

L'acétate d'éthyle agit aussi bien sur les bactéries Gram (+) que sur les bactéries à Gram (-). Toutefois, les bactéries Gram (-) paraissent moins sensibles à son action. L'extrait acétate d'éthyle est par contre beaucoup moins actif sur *P. mirabilis* qui a manifesté une sensibilité intermédiaire se traduisant par des diamètres d'inhibitions compris entre 2 et 4 mm.

L'extrait chloroforme, butanol et aqueux ayant induit un pourcentage de sensibilité nul, sont totalement inactifs sur les souches bactériennes.

Les tests de l'activité antibactérienne des différents extraits ont montré que les souches *B. cereus* et *E.coli* sont inhibés par l'extrait acétate d'éthyle, présentant un effet plus marqué par rapport aux autres extraits testés.

Les tests de l'activité antifongique des différents extraits ont montré que *C. albicans* et *A. brasiliensis* sont inhibés par l'extrait acétate d'éthyle qui présente un effet plus marqué par rapport aux autres extraits testés avec un taux de sensibilité de 40% des tests. Les extraits chloroforme butanol et aqueux restent inactifs envers ces deux souches qui présentent un fort pourcentage de résistance des tests, compris entre 70 et 100%.

Les diamètres d'inhibition compris entre 2 mm et 12 mm sont enregistrés par l'extrait acétate d'éthyle sur *C. albicans*, ainsi que 0 mm et 11 mm sur *A. brasiliensis*. Cependant *C. albicans* présente une sensibilité intermédiaire pour l'extrait chloroforme et est par contre résistant aux deux extraits restants. Ceci est reflété par les forts pourcentages de résistance : 100% pour l'extrait butanol et l'extrait aqueux, et 70% pour l'extrait chloroforme. Néanmoins la souche *A. brasiliensis* s'est montrée résistante vis-à-vis des extraits chloroforme, butanol et aqueux.

Une CMI de 50 µg / ml a été évaluée sur *B. cereus*, *E. coli* et *A. brasiliensis*. Alors que sur *C. albicans*, cette CMI est de l'ordre de 12.5 µg / ml. La CMI n'a pas été évaluée sur *P. mirabilis*, vu sa sensibilité intermédiaire. Les CMI enregistrées par l'EAc vis-à-vis de toutes les souches microbiennes varient entre 12.5 et 50 µg/ml.

Les concentrations minimales inhibitrices enregistrées justifient d'une part l'importante activité antimicrobienne des flavonoïdes et d'autre part son efficacité thérapeutique.

Ces résultats confortent l'utilisation du *S. marianum* en médecine traditionnelle comme antiseptique et offrent à la médecine occidentale un potentiel qui peut être valorisé dans plusieurs domaines tels que les industries pharmacologiques.

Il serait également intéressant de réaliser d'autres études, pour évaluer le potentiel « *in vivo* » sur des modèles animaux. Il serait souhaitable d'identifier le reste des composés flavonoïques en utilisant d'autres standards.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abostate M., Zanran D. A. and Hifnawi H. N., 2006- Incidence of *Bacillus cereus* in some meat products and the effect of gamma radiation on its toxin(s). *International Journal of Agriculture and Biology*, 8(1), 34 p.

Abbott S. L., 2007- *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H., Landry M.L., and Pfaller M.A. *Manual of Clinical Microbiology*, 9th Ed. ASM PRESS. Washington. 698-711 p.

Anderson PL. and Fletcher, CV., 2001- Clinical Pharmacological considerations for HIV-1 protease inhibitors. *Current Infectious Disease Reports*, 3(4): p 381-387.

Asghar Z. and Masood Z., 2008- Evaluation of antioxidant properties of silymarin and its potential to inhibit peroxy radicals in vitro. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(3): 54-249.

Actis-Goretta L., Ottaviani JI., Keen CL. and Fraga CG., 2003- Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. 555(3): 597-600.

Actis-Goretta L, Ottaviani JI . and Fraga CG., 2006- Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *Journal Agric Food Chem*. 54(1): 229-34.

Adeshina G. O., Okeke C. E., Osuagwu N. O. and Ehinmidu J. O., 2010- Preliminary in-vitro antibacterial activities of ethanolic extracts of *Ficus sycomorus* Linn. and *Ficus platyphylla* (Moraceae). *African Journal of Microbiology Research*. 4(8): 598-601.

Adesokan A. A., Akanjim A. and Yakubu M.T., 2007- Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. *African Journal of Biotechnology*. 6 (22): 2502 - 2505.

Ajaiyeoba E., 2002- Phytochemical and antibacterial properties of *Parkia biglobosa* and *P. bicolor* leaf extracts. *African Journal of Biomedical Research*, 5(1): 125 – 129.

Alexopoulos C. J., Mims C. W. and Blackwell M., 1996- *Introductory Mycology*. English book, illustrated 4th Ed. New York, USA, 868 p.

Aligiannis N., Kalpotzakis E., Mitaku S. and Chinou I.B., 2001- Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agricultural and Food Chemistry*, 40: 4168-4170.

Anderson C.M., Hallberg A. and Hogberg T., 1996- Advances in development of pharmaceutical antioxidants. *Adv Dru. Res*, 28 : 65-180.

Anderson P.L., Brundage R.C., kakuda T N. and Fletcher C.V., 2002- Response is correlated with peak plasma concentrations of indinavir in adults with undetectable human immunodeficiency virus ribonucleic acid. *Clinical pharmacokinetics*, 71: 280-85.

Anses., 2011- Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail : fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, septembre 2011.

Askun T., Tumen G., Satil F. and Ates M., 2009- *In vitro* activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem*, 116: 289-294.

Baba-Moussa F., Akpagana K. and Bouchet P., 1999- Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 66 : 335-338.

Bagnouls F. et Gausson H., 1957- Les climats biologiques et leur classification. *Ann.Géogr*, 355: 193-220 p.

Bahorun T., 1997- Substances naturelles actives : la flore mauricienne, une source d’approvisionnement potentielle. *Food and agricultural resarch council, Réduit, Mauritius*, pp. 83-94.

Balentine C.W., Crandall P.G., O’Byran C.A., Duong D.Q. et Pohlman F.W., 2006- The pre- and post-grinding application of rosemary and its effects on lipid oxidation and color during storage of ground beef. *Meat Science*, 73: 413-421.

Bandyukova V. A. et Shinkareako A. L., 1973- The thin layer chromatography of flavonoids. *Chemistry of natural compounds*, 9 (1): 17-21.

Baraka D., 2008- Inventaire et caractérisation des plantes médicinales de Djebel Tessala (Wilaya de Sidi Bel Abbés). Mémoire de Magister, université de Sidi Bel Abbés, 137 p.

Barrie D., Wilson J.A., Hoffman P.N. et Kramer J.M., 1992- *Bacillus cereus* meningitis in two neurosurgical patients : an investigation into the source of the organism. *J Infect*, 25(3) : 291-297.

Batawila K., 2002- Diversité, écologie et propriétés antifongiques des Combretaceae du Togo. Thèse de Doctorat : Université de Reims Champagne Ardennes (France) et Université de Lomé (Togo), 120 p.

Baylis C. L., Penn C. W., Thielman N. M., Guerrant R. L., Jenkins C. et Gillespie S. H., 2006- *Escherichia coli* and *Shigella* spp. In Gillespie S.H., et Hawkey P.M., *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd Ed. England. 347-365 p.

Bédard V., 2008- Les propriétés anti-angiogéniques des flavonoïdes. Mémoire de maîtrise en chimie. Université du Québec à Montréal, 57 p.

Benakcha R., 2001- Etude phytochimique de deux plantes algériennes : *Centaurea pungens* et *Salsola vermiculata*, activité biologique. Mémoire de Magister. Batna, 63p.

Benavente-G., Castillo O., Marin J., Ortuno F.R. et Del Rio J.A., 1997- Uses and properties of *Citrus* flavonoids. *J. Agric. Food Chem*, 45 : 4505–4515.

Benyahia M., Benabddéli K. et Moueddenne K., 2001- Géologie, pédologie et système de reproduction des monts de Tessala (Sidi Bel Abbès). *Ecosystèmes Revue des Sciences de la nature et de l’environnement*, vol. 1, 70-75 p.

- Berthillier A., 1972-** La chromatographie et ses applications. Ed. Dunod. Paris, 77 p.
- Bneder., 1990-** Etude d'aménagement et de développement des zones de montagne de la wilaya de Sidi Bel Abbas : perspectives de développement des exploitations agricoles zone nord. Rapport, 63p.
- Boiron., 1996-** Organization et biologie des champignons. Ed. Nathan, 126 p.
- Bouakaz I., 2006-** Etude phytochimique de la plante *Genista Microcephala*. Mémoire de magister. Université de Batna, Algérie, 87 p.
- Boudet A. M., 2000-** L'usine chimique. 9^{ème} conférence de l'université de tous les savoirs. France, 1-16 p.
- Bouheroum M., 2007-** Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes *Rhantherim adpressum* et *Ononis anfastissima*. Thèse de doctorat de l'université de Constantine, Algérie, 92 p.
- Bouterfes K., Mehdadi Z., Latrach Ali et Cherifi K., 2013-** Autoécologie du Marrube blanc (*Marrubium vulgare* L.) et caractérisation de la biodiversité végétale dans le Djebel de Tessala (Algérie nord occidentale). *In ecologia mediterranea*, 39 (2).
- Bouterfas K., Mehdadi Z., Latreche A and Aouad L., 2014-** Pouvoir antimicrobien des flavonoïdes extraits des feuilles de *Marrubium vulgare* L. en provenance du mont de Tessala (Algérie occidentale). *Phytothérapie*, 12 (1): 6-14.
- Bouzidi M.A., Latrech A., Attaoui I., Benabderrahmane M., Mehdadiz Z. and Benyahia M., 2012-** Antibacterial Effect of the Essential Oils Extracted From *Ruta chalepensis* L. and *Ruta montana* L. *In Journal of Life Sciences*, 6 (8), 898-902.
- Brower W.E. and Beecher G.R., 1995-** Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *Journal of Chromatography A*, 705: 247-256.
- Brouhet E., 2000-** Candidoses et leur diagnostic. Inédit, Paris.
- Bruneton J., 1993-** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 2^{ème} Ed. Lavoisier. Paris. 102P.
- Bruneton J., 1999-** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3^{ème} Ed. Lavoisier. Paris. 95p.
- Brusselmans K., Vrolix R., Verhoeven G. and Swinnen J.V., 2005-** Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *Journal of Biol Chem*. 280(7): 5636-5645.

Bylka W., Mathawska I. et Pilewski N. A., 2004- Natural flavonoid as antimicrobial agents. *Journal of the American Nutraceutical Association*, 7 (2): 24-26.

Cano A., Arnao M.B., Williamson G. and Garcia-Conesa M.T, 2002- Superoxide scavenging by polyphenols: effect of conjugation and dimerization. *Redox Rep*, 7(6): 379-83.

Celikas O.Y., Hames Kocabas E.E., Bedir E., Vardar Sukan F., Ozek T. et Baser K.H.C., 2007- Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*, 100: 553-559 p.

Chen H.Q., Jin Z.Y., Wang X.J., Xu X.M., Deng L. et Zhao J.W., 2008- Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neuroscience Letters*, 448 (2) :175-9.

Chenouf N., 2005- La diversité biologique en Algérie: Etat Stratégie. Atelier National sur l'intégration de l'environnement dans les politiques sectorielles. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. El Aurassi, les 21 et 22 novembre 2005.

Cherifi K., Mehdadiz Z., Latrech A. & Bachir Bouiadjra S.E., 2011- Impact de l'action anthropozoogène sur l'écosystème forestier du mont de Tessala (Algérie occidentale). *In Sécheresse*, 22 : 197-206.

Cherifi K., 2013- Impact de l'action anthropozoogène sur la biodiversité végétale de l'écosystème forestier du Djebel Tessala (Algérie occidentale). Thèse de Doctorat en Science. Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès, Algérie, 20 p.

Cherifi K., Mehdadi Z., Latrach A., Hazem Z. et El Zerey W., 2014- Impact of livestock on the floristic composition: a case study of the mount of Tessala, western Algeria. *International journal of environment*, 3 (3): 186-200.

Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M. and Kim J.M., 2006- Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*, 39:756-761.

Coker C., Poore C.A., Li X. and Mobley H. L., 2000- Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 2(12) : 1497-1505.

Chopin J., 1966- Actualité de phytochimie fondamentale, 2ème série. Ed. Masson. Paris.119 p.

Cowan M. M., 1999- Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12 (4) : 564-570.

Crozier A., Jensen E., Lean M.E.J. and Mc Donald M.S., 1997- Quantitative analysis of flavonoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatography A*, 761: 315-321.

Cserhalmi Z., Vidács I., Beczner J. and Czukor B., 2002- Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed electric fields technology. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(1): 41-45.

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

Dacosta E., 2003- Les phytonutriments bioactifs. Ed. Yves Dacosta. Paris. 317p.

David D. B., Kirkby G. R. and Noble B. A., 1994- *Bacillus cereus endophthalmitis*. *The British Journal of Ophthalmology*, 78(7): 577-580.

Deacon J.W., 2005- Fungal Biology. 4th Edition. MA: Blackwell Publishers, 120 p.

De Clerk., 1986- Les antibiotiques. Cahier de thérapeutique Kinshasa, pp. 82-86.

Decloitre F., 1993- Impact des facteurs alimentaires sur les mécanismes de la cancérogénèse : bases d'une prévention des cancers par l'alimentation. Cahiers de Nutrition et de diététique, 28 (2) : 85-95.

Deluca V. and Ibrahim R. K., 1985- Arch. Biochem. *Biophysics*, 606 p.

Depeint F., Gee J. M., Williamson G. et Johson I. T., 2002- Evidence for consistent patterns between flavonoid structures and cellular activities. Proceeding of the Nutrition Society, 61: 97-103.

Disinfection and Sterilization 1993- *Laboratory Biosafety Manual*. 2nd ed. Geneva. pp. 60-70.

Djebaili S., 1984- Steppe Algérienne, *Phytosociologie et écologie*. Ed. O.P.U. Alger. 171 p.

Dominique B., Brigitte M. et Hervé., 2003- Lot Maladie de salades identifiées. Edition Quae Amazone France, connaître et maîtriser INRA, Paris. 277 p.

Doughari J.H., Pukuma M.S. and Den. 2007- Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*. *African Journal of biotechnology*, 6 (19): 2212 - 2215.

Drobniewski F. A., 1993- *Bacillus cereus* and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(4): 324-338.

Dulger B. et Gonuz A., 2004- Antimicrobial activity of some turkish medicinal plants. *Pakistan journal of biological sciences*, 7 (9) : 1559-1562.

Duraffourd C.D., Hervicourt L. et Lapraz J.C., 1990- Cahiers de phytothérapie clinique. Examen de laboratoire galénique. Eléments thérapeutiques synergiques. 2^{ème} Edition. Masson. Paris. 87 p.

Ebel, J. and Hahlbrock K., 1982- In the flavonoids advances in research. Edts J. B. Harborne and T. J. Mabry., Chapman. and Hall. London, 641-659 p.

Emberger L., 1954- Une classification biogéographique des climats. Rec. Trav. Lab. Bot. Géol. Zool. Univ. Montpellier, *série Bot*, (7) : 3-43.

Fellah H., Ksouri R., Chaieb K., Karray Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. et Abdelly C., 2008- Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs and their biological activities. *C.R. Biologies*, 331: 372-379 p.

Epstein., 1972- Griseofulvin levels in *Steatum corneum*. *Arch Dermatol*, 106: 344-348.

Ferka-zazou N., 2006- Impact de l'occupation spatio-temporelle des espaces sur la conservation de l'écosystème forestier : cas de la commune de Tessala, wilaya de Sidi Bel Abbès, Algérie. Mémoire de Magister, univ. Tlemcen, 154 p.

Fisher M. and Yang LX., 2002- Anticancer effects and mechanisms of polysaccharide-K (PSK): implications of cancer immunotherapy. *Anticancer Research*, 22 (3): 1737-54.

Foster S., 1995- Milk thistle: herbal seeds and medicinal needs. *Better Nutrition for Today's Living*, p 64-71.

From C., Pukall R., Schumann P., Hormazabal V. and Granum P. E. 2005- Toxin-producing ability among *Bacillus spp.* outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3): 1178-1183.

Fuhrman B. et Aviram M., 2001- Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 12(1): 41-8.

Gangoué piéboji J., 2007- Caractérisation des beta-lactamases et leur inhibition par les extraits de plantes médicinales. Thèse de doctorat. Université de Liège, France, 101 p.

Georgantelis D., Ambrosiadis I., Katikou P., Blekas G. et Georgakis S.A., 2007- Effect of rosemary extract, chitosan and α -tocopherol on microbiological parameters and lipid oxidation of fresh pork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76: 172-181 p.

Gómez-Caravaca A.M., Gómez-Romero M., Arráez-Román D., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A., 2006- Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1220-1234.

Gonzalez-Trujano M.E., Pena E.I., Martinez A.L., Moreno J., Guevara-Fefer P., Deciga-Campos M. and Lopez-Munoz F.J., 2007- Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *J.Ethnopharmacol.* 111: 476-482.

Grayer R.J. and Harborne J.B., 1993- A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 37: 19-42.

Guernet et Hamon., 1981- Abrégé de chimie analytique. Tome I. 2eme Ed. Masson. Paris, 8-12 p.

- Guinebretière C., 2008-** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol*, 10: 851-865.
- Gutteridge J.M.C., 1993-** Free radicals in disease processes: A compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commum*, 19: 141–1583.
- Hadi M., 2004-** La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro oxydant ou capteurs de radicaux libres : Etudes et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur, 137 p.
- Halbrock K. and Grisebach H., 1975-** Biosynthesis of flavonoids in the flavonoids. Edition Harborne J.B., Mabry T.J., Mabry, Chapman and Hall, London, 866 p.
- Hamrapurkar P.D., Thakurdesai L.V. et Phale M.D., 2010-** Estimation quantitative de la silybine dans la teinture mère *Silybum marianum* par chromatographie liquide haute performance. *Int J Pharm vert*, 4:238-41.
- Harborne J. B. and Lawrence P.L., 1973-** Flavonoids in phytochemistry. Vol. 2, Litton Editional Publishing, p. 344.
- Harborne J.B. and Williams C.A., 2000-** Advances in flavonoid research since 1992 *Phytochemistry*, 55: 481-504.
- Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M., 2007-** The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem*, 14: 249-261p.
- Heller W. and Forkmann G., 1988-** In the flavonoids advances in research since 1980. Ed. J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425 p.
- Heller R., Esmault R. et Lance C., 1998-** Physiologie Végétale. 6eme édition. Dunod, Paris, France, 290 p.
- Hennebelle T., Sahpaz S. and Bailleul F., 2004-** Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
- Hertog M. G., 1996-** Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proceeding of the nutrition society*, 55 (1B): 385-397.
- Hodek P., Trefil P. and Stiborova M., 2002-** Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.
- Hollman P. C. H., 2001-** Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *Journal of the science of food and agriculture*, 81: 825-842.
- Hsu B., Wu S., Huang S., Tseng Y., Ji D., Chen, J. and Shih F., 2010-** Differentiation and identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* in environmental waters by a molecular method and biochemical test. *Water Research*, 44(3), 949-955.

Hutzler P., Fishbach R., Heller W., Jungblut T. P., Reuber S., Schmitz R., Veit M., Weissenböck G. et Schnitzler J. P., 1998- Tissue localisation of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of experimental botany*, 49 (323): 953-965.

Jay J. M., Loessner M. J. and Golden D. A., 2005- Foodborne Gastroenteritis Caused by *Escherichia coli*. *Modern food microbiology*. 7th ed. Springer Science, USA, 637-656 p.

Macheix J., Leuriet A et Jay A., 2005- Les composés phénoliques des végétaux: un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. Eds, press polytechniques et universitaire Romande, Lausanne, 192 p.

Jimenez-Gonzalez L., Alvarez-Corral M., Munoz-Dorado M. and Rodriguez-Garcia I., 2008- Pterocarpanes : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews*, 7: 125-154.

Jones T. F., 2007- Investigation of Foodborne and Waterborne Disease Outbreaks. In P. R. Murray E. J., Baron J. H., Jorgensen M. L., Landry and M.A. Pfaller. *Manual of Clinical Microbiology*. Eds. ASM press., Washington, 152-169.

Joslyn L. J., 2000- Sterilization by Heat. In S. S. Block Ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5th ed. Philadelphia, USA, pp. 695-728.

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

Kamanfu G., Mlika-Cabanne N., Girard P.M., Nimubona S., Mpfizi B. and Cishako A., 1993- Pulmonary complications of human immunodeficiency virus infection in Bujumbura, Burundi. *Am Rev Respir*, 147: 658-63.

Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S., 2005- Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. Ouagadougou.

Kechkar M., 2007- Extraction de la Syllimarine du *Sylibum marianum* et étude de son activité antimicrobienne. Mémoire de Magister. Biotechnologie microbienne. Université de Constantine, Algérie, 49 p.

Kim B. N., Kim N. J., Kim M. N., Kim Y. S., Woo J. H. and Ryu, J., 2003- Bacteraemia due to tribe Proteaeae: a review of 132 cases during a decade (1991-2000). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35(2): 98-103.

Kim YH., Shin EK., Kim DH., Lee HH., Park JH. and Kim JK., 2010- Antiangiogenic effect of licochalcone A. *Biochem Pharmacol*, 80(8):1152-9.

Kiekken R., 1962- *Géologie et stratigraphie des monts de Tessala*. Ed. Fouquet. Oran.

Koné W.M., Atidehou K., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D. et Dosso M., 2004- Traditional medicine in North Côte-d'Ivoire : screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacol*, 93: 43-49 p.

Kotiranta A., Lounatmaa K. and Haapasalo M., 2000- Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, 2(2): 189-198.

Kramer A., Schwebke I. and Kampf, G., 2006- How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces. A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 6:130 p.

Kubmarawa D., Khan M.E., Punah A.M. and Hassan M., 2009- Phytochemical and Antimicrobial Screening of *Ficus platyphylla* against Human/Animal Pathogens. *The Pacific Journal of Science and Technology*, 10 (1) : 382-386.

Ladram A. et Gille C., 2012- La chromatographie.

Lahouel M., 2005- Interaction flavonoïdes-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. Thèse de doctorat. Univ. Mentouri de Constantine, Algérie, 92 p.

Latifou L., 2005- Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises. Thèse de doctorat de l'université Louis Pasteur de Strasbourg, France, 150 p.

Laurent G., 2013- La résistance aux antibiotiques, la course contre la montre. *Science & Santé* n°12, pp: 4-5.

Lee D. G., 2003- Gram positif bacteria spécifique propriétés de silybine dérivée de *Silybum maritimum*. *Arch Pharm Res*, 26(8): 597-600.

Lee K., Chiu F. and Ng, K., 2007- Identification and quantification of antioxydants in *Fructus lycii*. *Food Chem.* (in press).

Le houerou HN., Claudin J., Haywood M. et Donadieu J., 1995- *Etude phytoécologique du Hodna*. Ed. AGS et FAO., Rome, 154 p.

Le Scanff J., Mohammedi I., Thiebaut A., Martin O., Argaud L. and Robert D., 2006- Necrotizing gastritis due to *Bacillus cereus* in an immunocompromised patient. *Infection*, 34(2) : 98-99.

Lhuillier A., 2007- Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*). Thèse de Doctorat. Toulouse, France, 120 p.

Li J. and Jiang Y., 2007- Litchi Flavonoids: Isolation, Identification and Biological Activity. *Molecules*, 12: 745-758.

Lin J.K. and M.S. Weng., 2006- Flavonoids as nutraceuticals. In: Grotwold, eds. The science of flavonoids. Springer, Columbus, Ohio, pp: 213-239.

- Iinuma M. and Mizuno M., 1989-** Phytochemistry, 28: 681p.
- Logan N. A. and Rodrigez-Diaz M., 2006-** Bacillus spp. and Related Genera. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 2nd ed, pp. 139-158.
- Loziene K., Venskutonis P.R., Sipailiene A. et Labokas J., 2007-** Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chem*, 103: 546-559 p.
- Mabry T. J., Markham K. R. and Thomas M., 1970-** The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New york , Heidelberg, p. 254.
- Macheix J., Fleuriet A. et Sarni- Manchado P., 2005-** Les composés phénoliques dans la plante : structure, biosynthèse, répartition et rôle. In : Les polyphénols en agroalimentaires, Cheymier V., Sarni – Manchado p. Ed. Lavoisier, Paris, 216 p.
- Mahmoud I.I., Marzouk M.S.A., Moharram F.A., El-Gindi M.R. and Hassan A.M.K., 2001-** Phytochemistry, 58: 1239-1244.
- Malcolm H.D., John W.V.K., Bruce M.S., Nigel B.P., Rosemary E.A., Peter J. and Weavers R.T., 2004-** Phytochemistry, 65 : 1255-1264.
- Marchal R., 1998-** La chromatographie théorie. Edition. Antont, France, 48p.
- Marfak A., 2003-** Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de Leur réactivité avec les radicaux issus des Alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat. Université de Limoge, pp. 24-42.
- Markham K.R., 1982-** Techniques of flavonoid identification. Academic press, London, Chap. 1 and 2: 1-113.
- Marouf A., 2002-** Analyse instrumentale à l'usage des biologistes. 2^{eme} édition Dar el Gharb. Oran P.17- 24.
- Maslin et Develoux M., 2004-** Actualités thérapeutiques des mycoses rares en dehors des mycoses opportunistes, EMC Maladies Infectieuses 1, no 4, 305p.
- Manach C., 1998-** Biodisponibilité des flavonoïdes. Thèse de doctorat de l'université de Clermont Ferrand, France, pp. 23-32.
- Morazzoni P. and Bombardelli E., 1995-** Silybum marianum (Carduus marianus). Fitoterapia, 66(1): p 3-49.
- Narayana K.R., Reddy M.S., Chaluvadi M.R. and Krishina D.R., 2001-** Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacology*, 33: 2-16.

Medina JH., Viola H., Wolfman C., Marder M., Wasowski C., Calvo D. et Paladini AC., 1997- Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem*, 22 (4): 419-25.

Merghem R., Jay M., Viricel M. R., Bayet C. et Voirin B., 1995- Five 8-C benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*, 38 (3) : 637-640.

Merken H.M. et Beecher G.R., 2000- Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J Chromatography A*, 897: 177-184.

Milane H., 2004- La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat. Strasbourg.

Ming H., 2007- Commentary : bioavailability of flavonoids and polyphenols: call to arms. *Molecular pharmaceutics*, 4 (6) : 803-806.

Mokaddem M., 2012- Comparaison entre les formations végétales à *Quercus ilex* L. et *Pinus halepensis* Mill. et valorisation de l'espèce *Rubus ulmifolius* Schott. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbés, 165 p.

Moreira M.R., Ponce A.G., Del Valle C.E. et Roura S.L., 2005- Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT*. 38: 565-570 p.

Moroh J.L.A., Bahi C., Dje K., Loukou Y. G et Guede-Guina F., 2008- Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (rubiaceae) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège., Vol : 77 : 44 – 61p.

Mpona M., 2008- Cours de Mycologie, 3^{ème} graduat ISTM/KIN/Labo Inétit.

Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L. and Pfaller M. A., 2007- Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. *American Society of Microbiology Press*.

Muthu C., Ayyanar M., Raja N. and Ignacimuthu S., 2006- Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2-43 p.

Natarajan D., John Britto S., Srinivasan K., Nagamurugan N., Mohanasundari C. and Perumal G., 2005- Anti-bacterial activity of *Euphorbia fusiformis*. A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*, 102: 123-126 p.

Nataro J. P., Bopp C. A., Fields P. I., Kaper, J. B. and Strockbine N. A., 2007- *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, ASM press.USA. pp 670-687.

Nester E.W., Anderson D.G., Roberts E.C., Pearsall N.N. and Nester M.T., 2001- Microbiology: A Human Perspective. Mc Graw-Hill Companies, Inc.

Ody P., 2002- les plantes médicinales : Encyclopédie pratique. 2^{ème} Ed. Ed Sélection du Readers Digest p 120.

Ottaviani JI., Actis-Goretta L., Villordo JJ. and Fraga CG., 2006- Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Biochimie*. 88(3-4): 359-65.

Paladini AC., Marder M., Viola H., Wolfman C., Wasowski C. and Medina JH., 1999- Flavonoids and the central nervous system from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. *J Pharm Pharmacol*, 51(5): 519-26.

P. Karrer et Strong F.M., 1936- *Helv. Chim. Acta.*, 19: 25-28 p.

Parekh J. et Chanda S. V., 2007- *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plant. *Turkish journal of biology*, 31: 53-58.

Pathak, 1991- Flavonoides as medicinal agents-recent advances. *Fitoterapia*, 62 (5): 371-389.

Patrick B., Jean L., and Michel S., 1988- Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1^{ère} édition. Médecine Sciences Flammarion. Paris. 100:108-274.

Petignat C. et DAMPH CHUV., 2005- Infections nosocomiales. Bases épidémiologiques. Cours. Technicien en radiologie médicale.

Peyret M., 1991- Mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. Lyon Pharmaceutique, 42 : 31-42 p.

Ponce A. G., Fritz R., del valle C. and Roura S.I., 2003- Antimicrobial activity of essential oils in the native microflora of organic Swiss chard. *Society of food Science and technology*, 36: 679-684.

Proestos C., Sereli D. and Komaitis M., 2006- Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem*, 95: 44-52.

Piquemal G., 2008- Les flavonoïdes (en ligne) : http://www.detoursante.com/index.php?Option=com_content&view=article&id=166&Itemid=215

Ryan K. J., 2004- *Candida, Aspergillus, and Other Opportunistic Fungi*. In Ryan, K.J. and Ray, C.G. 4th Ed. *Sherris Medical Microbiology*, USA, pp. 659-668.

Ray C. G., 2004- Enteric Infections and Food Poisoning. In K. J. Ryan, & C. G. Ray. *Sherris Medical Microbiology*, 4th Ed. USA, pp. 857-865.

Ribereau-Gayon P., 1968- Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. Paris, 280 p.

- Rice-Evans C., 2001-** Flavonoid Antioxidants. *Current Medicinal Chemistry*, 8:797-807.
- Ronald A., 2003-** The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Disease-a-Month*, 49(2): 71-82.
- Ronald A., 2005-** Handbook Of Media For Environmental Microbiology. Second Edition. CRC Press Inc.
- Rosovitz M. J., Voskuil M. I. and Chambliss G. H., 1998-** *Bacillus*. In L. Collier A. Balows M., Sussman A. Balows and B. I. Duerden (Eds.). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infection : Systematic Bacteriology*, 9th ed. USA: Arnold, pp. 709-729.
- Rosset R., Cannde M. et Jardy A., 2012-** Chromatographie en phase liquide et supercritique, Masson, Paris.
- Rota M. C., Herrera A., Martinez R. M., Sotomayor J. A. and Jordán M. J., 2008-** Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food control*, 19 : 681-687.
- Saller R., 1995-** *Phytothérapie*. Hany, Heidelberg, 267-274 pp.
- Sagdic O. et Ozcan M., 2003-** Antibacterial activity of Turkish spice hydrosols. *Food Control*, 14: 141-143p.
- Santos M.A., Pompejus M. et Revuelta JL., 2005-** Génie métabolique de la voie purine pour la production de riboflavine dans *Ashbya gossypii*. *Appl Environ Microbiol*, 71 (10) : 5743 5751.
- Sarl A., 2012-** *Chimie analytique, chromatographie*. Identifiée sous le numéro 504 681 347. Consulté de : lachimie.fr
- Sarmi M.P. et Cheymer V., 2006-** Les polyphénols en agroalimentaire. Ed. Lavoisier, 2-10 p.
- Seltzer P., 1946-** *Le climat d'Algérie*. Univ Alger, 219 p.
- SFM., 2008-** Société Française de Microbiologie, Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 49 p.
- Shan B., Cai Y.Z., Brook J.D. et Corke H., 2007-** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International J Food Microbiology*, 117: 112-119p.
- Silva M. T. & Sousa J. C., 1972-** Ultrastructural alterations induced by moist heat in *Bacillus cereus*. *Applied Microbiology*, 24(3), 463-476.
- Stefan M. and Mithöfer A., 2006-** Phytochemistry, vol (67), Issues 5, 419-522 p.
- Steven P., Rachel C., Martha E., Paul H., Jane S. and Peter W.J., 2006-** Microbiology of Waterborne Diseases. Ed. Elsevier. Academic Press. pp71-132.

Steward PH., 1975- Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application pour le barrage vert. *Bull. Soc. Hist. Nat. AFN. Fsc.* 65, 1 et 2, Alger, 239-252 p.

Snyder L. and Kirk J., 1979- Introduction to modern liquid chromatography. Wiley. New York, 278 p.

Szliszka E., Czuba Z.P., Mazur B., Paradysz A. and Krol W., 2010- Chalcones and dihydrochalcones augment trail mediated apoptosis in prostate cancer cells. *Molecules*, 15(8):5336-53.

Talaj S. and Czechowicz A. S., 1989- Herbal Remedies Harmful and Beneficial Effects, Hill of Content, Melbourne, p 221.

Tapas A. R., Sakarkar D. M. et Kakde R. B., 2008- Flavonoids as nutraceuticals. *Topical journal of pharmaceutical research*, 7 (3) : 1089-1099.

Tieppo J., Vercelino R., Dias A.S., Silva Vaz M.F., Silveira T.R., Marroni C.A., Marroni N.P., Henriques J.A.P. and Picada J.N., 2007- Evaluation of the protective effects of quercetin in the hepatopulmonary syndrome. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 1140-1146.

Tim C.T.P. and Andrew J. L., 2005- Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob*, 26:343–356.

Turkmen N., Velioglu Y.S., Sari F. and Polat G., 2007- Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 12: 484-496p.

Urquiaga I. et Leighton F., 2000- Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*, 33 (2): 55-64.

Van Acker S., van Balen G.P., van den Berg D.J. and van der Vijgh W.J.F., 1996- Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem. Pharmacol*, 56: 935– 943.

Varro E. and Tyler PH.D., 1994- Herbs of Choice the therapeutic Use of Phytomedicinals, PPP, NY, p.64.

Venkataraman R., Ramachandran R. and Komoroshi B., 2000- Milk thistle, an herbal supplement, decrease the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transférase inn human hepatocyte cultures. *Drug metabolism and disposition*. 28 (11): 1270-1273.

Verweij P.E. and Brandt M.E., 2007- Aspergillus, Fusarium and other opportunistic moniliaceous fungi. In P. R. Murray. 9th Ed. ASM Press, Washington, 1802-1838.

Vitor R.F., Mota-Filipe H. et Teixeira G., 2004- Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, 93 (23): 363-70.

Volak J. et Stodola J., 1984- Plantes médicinales. Illustrations de Frantisek Severa, Ed. ARITA Grund Paris, p 319.

Wagner H. and Blatt S., 1996- Plant drug analysis 2nd Ed. Springer., Berlin, pp: 234-235.

Weavers L. K. and Wickramanayake G. B., 2001- Disinfection and Sterilization Using Ozone. In S. S. Block (Ed.), *Disinfection, Sterilization and preservation*. 5th Ed. PA, USA, pp. 205-214.

Widmer N., 1999- Phytochimie Cardui marie fructus dosage des flavonolignans. Examens finaux de pharmacie. Grandvaux, 7-12 pp.

Willstätter R. et P. Bridle., 1913- Justus Liebigs Ann. Chem, 401: 69-92.

Wilson W. R., Sande M. A. and Drew W. L., 2001- *Current diagnosis and treatment in infectious diseases*. New York : Lange Medical Books/McGraw-Hill. Retrieved from [http : //online.statref.com/document.aspx](http://online.statref.com/document.aspx)

Wink M., 1999 - Functions of Plant Secondary Metabolites and their exploitation in biotechnology. CRC Press.

Wissemann H., 1999- The bioavailability of non–nutrient plant factors: dietary flavonoids and phyto-oestrogens. *Proceeding and Nutrition Society*, 58: 139-146.

Wollgast J. and 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.

Yala D., Merad D., Mohammedi M.N. et Korich O., 2001- *Medecine du Maghreb* N°91.

Yano Y., Satomi M. and Oikawa H., 2006- Antimicrobial effect of spices and herbs on *Vibrio parahaemolyticus*. *International J Food Microbiology*, 111: 6-11.

Yao L.H., Jiang Y.M., SHI J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R. and Chen S.S., 2004- Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum Nutr*, 59 :113-122.

Zareen S., 2006- Phytochemical studies on *Terminalia glaucescens*, *Pteleopsis hylodendron* and related medicinal plants, PhD thesis, H.E.J. Research Institute of Chemistry, International Center for Chemical Sciences, University of Karachi, Karachi, Pakistan, 204 p.

Zhang H., Kong B., Xiong Y .L. and Sun X., 2009- Antimicrobial activities of spice extracts against pathogenic and spoilage bacteria in modified atmosphere packaged fresh pork and vacuum packaged ham slices stored at 4 °C. *Meat Science*, 81: 686-692.

Zeghad N., 2008- Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique de *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister (Ecole doctorale). Univ. Mentouri Constantine, 84 p.

Zhao T., Doyle M. P., Kemp M. C., Howell R. S. and Zhao P., 2004- Influence of freezing and freezing plus acidic calcium sulfate and lactic acid addition on thermal inactivation of *Escherichia coli* in ground beef. *Journal of Food Protection*, 67(8): 1760-1764.