

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



Mémoire

Présentée pour l'obtention du diplôme de

Magister

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE

Par :

BOUTINE Djamel Eddine

**ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ
ANTIOXYDANTE ET ANTIBACTÉRIENNE
D'UNE PLANTE ENDÉMIQUE ALGÉRIENNE :
*Ampelodesma mauritanica***

Soutenue le : 21/11/2011 ; devant le jury composé de :

Président :	DJEGHABA Zeineddine	Prof. ; Univ. Badji Mokhtar Annaba
Examineurs :	DJEROUROU Abdelhafid	Prof. ; Univ. Badji Mokhtar Annaba
	DJILANI Abdelouahab	M.C.A. ; Univ. Badji Mokhtar Annaba
Encadreur :	DJILANI Salah Eddine	M.C.A. ; Univ. Badji Mokhtar Annaba

Remerciements

*Tout d'abord je remercie le Dieu tout puissant pour m'avoir donné, le pouvoir, la force et la volonté pour réaliser ce travail.
Je dédie ce travail, fruit de ces derniers mois :*

J'adresse mes gratitudee à ma famille « mes parents & mes deux sœurs » Pour leur patience, compréhension, encouragement, aide et soutien

Je tiens à remercier M^r le Docteur DJILANI Salah Eddine, mon encadreur pour avoir accepté de diriger mes travaux. Je lui exprime ma profonde gratitude pour m'avoir fait bénéficier de ses profondes connaissances scientifiques, de ses qualités humaines et morales ; j'ai apprécié en lui un esprit écoutant, jugeant, enseignant et conseiller.

Je remercie également le professeur DJEGHABA Zeineddine qui a accepté de consacrer de son temps à l'étude de ce travail et d'être président de mon jury.

Comme j'exprime toute ma reconnaissance à Pr DJEROUROU Abdelhafid et à le Docteur DJILANI Abdelouahab, lesquels, en acceptant de juger le présent travail, me concèdent une réelle gratification.

Je n'arrive pas à trouver les mots pour remercier le Docteur DJILANI Abdelouahab pour son rôle indispensable dans la création du sujet de ce travail et son attribution avec le savoir, matériel et produits, et l'aide lors du besoin.

Je remercie infiniment Mm Dr Toudert Nadia, puisque j'ai suivi ses pas pour finir ce travail, je n'imagine pas que j'étais capable de commencer sans sa présence, son expérience dans le sujet et son encouragement.

J'adresse mes remerciements les plus sincères encore une fois à Pr DJEGHABA Zeineddine, directeur du laboratoire de recherches en Chimie organique appliquée de l'Université de Annaba, lequel a accepté de me recevoir au niveaux de son équipe, dans le cadre de la préparation de ce travail ; j'ai été conquise par l'esprit pédagogique, la patience.

Que toute l'équipe de ce laboratoire soit assurée de ma reconnaissance et de ma profonde sympathie pour m'avoir adopté, aidé et facilité le travail de recherche au niveau du laboratoire LCOA n°32.

Je tiens à remercier sincèrement à Dr. BOUHDJILA. F et DJEDID. F de l'Hôpital d' El-Harrouche-SKIKDA.

Enfin, je clos par des remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de cette thèse ou à ceux qui lui accordent un intérêt, aussi minime soit-il.

Abstract

Ampelodesma mauritanica is commonly called Diss, is a plant of the family Poaceae, widespread in North Africa.

In this work, we looked for possible antioxidant activity of different extracts of the aerial part and roots of this plant, determined using several tests: ABTS, DPPH and PPM. The results showed that the extract methanol/water (70:30) of the aerial part is endowed with a remarkable antioxidant activity.

In the second part, antibacterial and antifungal activity of plant extracts was assessed using the disc diffusion method. The results showed the effectiveness of the plant on strains of Gram-positive and Gram-negative strains.

Keywords

Extraction – phytochemical Screening – Flavonoids – Polyphenols – antidiabetic – antibacterial – antioxidant – ABTS – DPPH – PPM.

Résumé

Ampelodesma mauritanica appelée communément Diss est une plante de la famille des Poacées, répandue dans l'Afrique du Nord.

Dans ce travail, on a recherché d'éventuelle activité antioxydante de différents extraits de la partie aérienne et des racines de cette plante, déterminée en utilisant plusieurs tests : ABTS, DPPH et PPM. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanol-eau (70 : 30) de la partie aérienne est doué d'une activité antioxydante remarquable.

Dans une deuxième partie, l'activité antibactérienne et antifongique des extraits de la plante à été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion du disque. Les résultats ont prouvé l'efficacité de la plante sur des souches gram positif ainsi que sur des souches gram négatif.

Mots clés

Extraction – criblage phytochimique – Flavonoïdes – Polyphénols – antibactérien – antioxydant – ABTS – DPPH – PPM.

LISTE DES PHOTOS

Numéro	Titre	Page
01	<i>Ampelodesma mauritanica</i> (Diss)	07
02	Microorganismes sous Microscope	29
03	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Candida albicans</i>	63
04	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Citrobacter</i>	63
05	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Staphylocoques aureus</i>	64
06	Effet inhibiteur des extraits sur <i>Streptocoques</i>	64

LISTE DES TABLEAUX

Tab	Titre	Page
01	Classification des terpènes	10
02	Les classes les plus importantes des composés phénoliques	11
03	Quelques plantes à activité antioxydante	24
04	Quelques plantes à activité antifongique	36
05	Quelques plantes à activité antibactérienne	37
06	Screening phytochimique des racines et des feuilles de la plante	45
07	Variation de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions standards de la vitamine C (Test DPPH)	47
08	Variation de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions standards de la vitamine-C (Test ABTS)	48
09	Variation de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions standards de la vitamine-C (Test PPM)	50
10	Résultats de l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne et des racines de <i>Ampelodesma mauritanica</i>	51
11	Résultats de l'activité antioxydante des différents extraits méthanol/eau de la plante	55
12	Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition	57
13	les rendements des extractions des flavonoïdes	59
14	Activité antibactérienne des extraits des feuilles par la méthode de diffusion du disc	61
15	Activité antibactérienne des extraits des racines par la méthode de diffusion du disc	61
16	Effet inhibiteur de quelques Antifongiques sur <i>Candida albicans</i>	68
17	Effet inhibiteur de quelques Antibiotiques sur des micro-organismes	69

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
01	Structures de quelques composés phénoliques	12
02	Différents types de flavonoïdes	14
03	Acide Ascorbique	20
04	n-tocophérol	20
05	β -carotène	21
06	Morine	22
07	Gallate d'épigalocathéchine	22
08	Coumarine	23
09	Resvératol	23
10	Manguiférine	24
11	Oxydation partielle de l'ABTS	26
12	La réaction entre l'ABTS et l'antioxydant	26
13	Forme libre et réduite du DPPH	27
14	Exemples de composés utilisés pour soigner des maladies causées par des protozoaires	34
15	Exemples de composés utilisés pour soigner des maladies causées par des champignons	35
16	Courbe d'étalonnage de la vitamine C (Test DPPH)	47
17	Courbe d'étalonnage de la vitamine C (Test ABTS)	49
18	Courbe d'étalonnage de la vitamine C (Test PPM)	50
19	Capacité antioxydante des extraits de la partie aérienne de l'Ampelodesma mauritanica exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et PPM	52
20	Capacité antioxydante des extraits des racines de l'Ampelodesma mauritanica exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et PPM	52
21	Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon le test DPPH	53
22	Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon le test ABTS	54
23	Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon le test PPM	54
24	Capacité antioxydante des extraits de méthanol/eau de la partie aérienne exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et de PPM	55
25	Capacité antioxydante des extraits de méthanol/eau des racines	56

	exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et de PPM.	
26	Protocole d'extraction classique des flavonoïdes	60
27	Effet inhibiteur de l'extrait Méthanolique des feuilles sur quelques micro-organismes	65
28	Effet inhibiteur de l'extrait Butanolique des feuilles sur quelques micro-organismes	65
29	Effet inhibiteur de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles sur quelques micro-organismes	66
30	Effet inhibiteur de l'extrait Méthanolique des racines sur quelques micro-organismes	66
31	Effet inhibiteur de l'extrait Butanolique des racines sur quelques micro-organismes	67
32	Effet inhibiteur de l'extrait d'acétate d'éthyle des racines sur quelques micro-organismes	67

LISTE DES ABREVIATIONS :

- AAPH : 2, 2'-azobis (2-amidino-propane)
- ABTS : acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
- ADN : acide désoxyribonucléique
- AINS : anti-inflammatoires non stéroïdiens
- ATB : antibiotique ou antibiogramme
- BHA : hydroxyanisole butylé (mélange de 2-tertiobutyl-4-hydroxyanisole (2-BHA) et de 3-tertiobutyl-4-hydroxyanisole (3-BHA))
- BHT : hydroxytoluène butylé (2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol)
- BHIB : Brain Heart infusion Broth (Bouillon cœur cerveau)
- Ca. a: *Candida albicans*.
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- Ci. b : *Citrobacter*
- CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices
- DMFO : difluoromethylornithine
- DPPH : 2,2-diphényl picrylhydrazyl
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- E.co ou E. coli: *Escherichia coli*
- ERO : espèces réactives de l'oxygène
- GN : Gélose Nutritive
- HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
- IP : pourcentage d'inhibition
- O.M.S. : organisation mondiale de la santé
- MeOH : Méthanol
- MS : Spectroscopie de Masse
- M.S. : Matière sèche
- MH : Mueller-Hinton
- NAD⁺: nicotinamide adénine dinucléotide
- NADP⁺: Nicotinamide adénine dinucléotide Phosphatée
- LDL : lipoprotéines de basse densité

- ROS : Reactive Oxygen Species
- St. a : *Staphylococcus aureus*
- Shi : *Shigella*
- SOD : superoxyde dismutase
- Str : *Streptocoques*
- PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffered saline)
- UV : Ultraviolet
- VCE : vitamine C Equivalent

Table des matières

ABSTRACT

RESUME

ملخص

LISTE DES ABREVIATION

INDEX DES FIGURES ET PHOTOS

INDEX DES TABLEAUX

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT

INTRODUCTION	01
---------------------------	-----------

Partie théorique

Chapitre I : CRITÈRES DE SELECTION DES PLANTES ET PRESENTATION DE LA PLANTE ÉTUDIÉE

I.1. Critères de sélection des plantes.....	03
I.2. Critères de sélection des extraits.....	05
I.3. Présentation d' <i>Ampelodesma mauritanica</i>	07
I.3.1. Description botanique de la plante	07
I.3.2. Utilisation	07
I.3.3. Taxonomie.....	08
I.3.4. Espèces similaires	08

Chapitre II : GÉNÉRALITÉS SUR QUELQUES MÉTABOLITES SECONDAIRES

II.1. Généralités	09
II.2. Les terpènes	09
II.3. Composées Phénoliques.....	10
II.3.1. Définition	10
II.3.2. Structure et classification	10
II.3.3. Rôle des composés phénoliques.....	13
II.4. Les flavonoïdes	13
II.4.1. Définition	13
II.4.2. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes	14
II.5. Saponines	15
II.6. Les Tanins	15

Chapitre III : RAPPELS SUR LES ANTIOXYDANTS

III.1. Généralités	17
III.2. Types d'antioxydants	19
III.3. Sources d'antioxydants	19
III.3.1. Médicaments	19
III.3.2. Sources alimentaires	20
III.3.3. Antioxydants naturels	21
III.4. Quelques plantes à activité antioxydante	24
III.5. Mécanisme d'action des antioxydants	24
III.6. Méthodes de tests antioxydants	25
III.6.1. Le test d'ABTS	25
III.6.2. Le test du DPPH	27
III.6.3. Le test du PPM	27
III.6.4. Autres tests utilisant une plaque CCM	28

Chapitre IV : MICROORGANISMES ET PATHOLOGIES

IV.1. Les microorganismes	29
IV.1.1. Les microorganismes auxiliaires de l'homme	30
IV.1.2. Les microorganismes domestiqués	31
IV.1.3. Les microorganismes génétiquement transformés	31
IV.1.4. Les microorganismes pathogènes	32
IV.2. Coloration de gram	33
IV.3. Les moyens de lutter contre les microorganismes pathogènes	33
IV.3.2. Contre les protozoaires	33
IV.3.2. Contre les champignons	35
IV.3.3. Contre les bactéries	35
IV.4. Quelques plantes à activité biologique	36
IV.5. Méthodes d'étude de l'activité antibactérienne	37
IV.5.1. Méthode de diffusion	37
IV.5.2. Méthode de dilution	38
IV.6. Présentation des micro-organismes testés	38
IV.6.1. Escherichia coli	38
IV.6.2. Candida albicans	39
IV.6.3. Citrobacter	39
IV.6.4. Shigella	40
IV.6.5. Staphylocoque aureus	41
IV.6.6. Streptocoques	41

Partie expérimentale

Chapitre I : Caractérisations chimiques et évaluation de l'activité Antioxydante

I.1. Introduction	43
I.2. Préparation du matériel végétale	43
I.3. Screening phytochimique	43
I.4. Evaluation de l'activité antioxydante.....	46
I.4.1. Préparation de l'extrait de <i>Ampelodesma mauritanica</i>	46
I.4.2. Protocole du test DPPH.....	46
I.4.3. Protocole du test ABTS	48
I.4.4. Protocole du test PPM.....	49
I.5. Résultats et Discussion	51

Chapitre II : Évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique

II.1. Test de diffusion du Disque	57
II.2. Souches pathogènes utilisées	58
II.3. Préparation des extraits	58
II.4. Résultats et Discussion	61

CONCLUSION GENERALE.....	71
---------------------------------	-----------

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73
--	-----------

INTRODUCTION

Depuis des temps anciens, l'Homme s'est toujours intéressé aux plantes pour diverses fins, notamment pour prélever ses ressources alimentaires et pour traiter certaines maladies.

L'efficacité de la phytothérapie (médecine douce consistant à prévenir, soigner ou soulager divers maux grâce aux propriétés médicinales des plantes naturelles) est prouvée et elle est toujours vue comme un remède surtout utilisé par la population rurale à travers le monde [1], par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité et elles sont d'un coût beaucoup inférieur aux médicaments de synthèse [2].

Depuis quelques années, et partout dans le monde, la phytothérapie revient à la mode [3] et l'utilisation de plantes médicinales dans les pays occidentaux est en augmentation (Aux Etats- Unis, les utilisateurs de plantes sont passés de 2,5 % en 1990 à 12,1 % en 1998) [4]. Une des principales origines vient de l'Asie où l'utilisation de plantes médicinales constitue une partie très importante de la médecine traditionnelle. En Chine, plus de 7000 préparations sont couramment utilisées. La phytothérapie constitue également un des fondements de la médecine populaire en Afrique et en Amérique du Sud [4-8].

Actuellement, les médicaments vendus en pharmacie sont créés sur la base de plantes trouvées dans la nature et souvent expérimentés par nos ancêtres (de nouveaux médicaments antipaludiques ont été mis au point grâce à la découverte et à l'isolement de l'artémisinine tirée de l'*Artemisia annua*, une plante utilisée en Chine depuis près de 2000 ans [3].

De ce fait, la recherche sur les substances naturelles est un thème porteur depuis quelques années et l'industrie pharmaceutique moderne qui est toujours à la recherche de nouveaux composés actifs en vue de les exploiter et les utiliser à des fins utiles, s'inspire encore largement de métabolites secondaires végétaux tels que les polyphénols, les alcaloïdes et les huiles essentielles [9].

Par conséquent, plusieurs travaux ont été réalisés pour l'évaluation des secrets des plantes médicinales et la phytochimie a connu un essor considérable grâce à l'apport de

diverses disciplines scientifiques comme la chimie, la pharmacologie, la biochimie, la microbiologie, et la médecine.

L'Algérie, par sa surprenante richesse en biodiversité (faune et flore) renferme de nombreuses espèces. On y dénombre plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques. Ces plantes, avec plus de 15 % sont endémiques [10], ne sont que peu explorée.

Dans le cadre de notre recherche et afin de contribuer à la valorisation de la flore Algérienne, nous nous sommes intéressés à l'étude phytochimique de *l'Ampelodesma mauritanica* «Diss», on essayant de chercher quelques propriétés pharmacologiques de cette plante qui appartient à la famille des Poaceae.

D'après la littérature, à part un travail de recherche récent [11], aucune étude d'investigation chimique ou biologique sur *l'Ampelodesma mauritanica* n'a été effectuée. Il a été prouvé que cette plante est douée de propriétés antioxydante et antibactérienne remarquables comme elle présente une activité antidiabétique [12-14].

Le présent travail est divisé en deux grandes parties. Dans la première, nous présentons un bilan bibliographique sur quelques métabolites secondaires, en l'occurrence les terpènes, les saponines et les composés phénoliques (plus particulièrement les flavonoïdes), ainsi que sur les antioxydants et sur les microorganismes.

En revanche, la seconde partie, qui est une partie expérimentale, consiste dans un premier temps au suivi de l'évolution de l'activité antioxydante des différents extraits de la partie aérienne et des racines de *l'Ampelodesma mauritanica*. Puis, nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de la plante.

Une conclusion générale clôture ce travail.

- CHAPITRE – I –

CRITÈRES DE SELECTION DES PLANTES ET PRESENTATION DE LA PLANTE ÉTUDIÉE

Afin d'isoler des substances nouvelles des plantes pouvant trouver une application thérapeutique et de rendre la stratégie d'isolement moins laborieuse, il convient de sélectionner avec soin les plantes et les extraits à investiguer. Certains critères sont à prendre en considération par le phytochimiste pour mener à bien son étude [15].

I-1. CRITÈRES DE SÉLECTION DES PLANTES

Du choix du matériel végétal dépend en grande partie la réussite du travail entrepris par le phytochimiste et plusieurs critères peuvent guider ce choix.

- utilisations en médecine traditionnelle
- observations du matériel végétal sur le terrain
- aspects botaniques et chimiotaxonomiques
- littérature
- hasard
- **Utilisations en médecine traditionnelle**

L'utilisation des plantes en médecine traditionnelle est l'un des principaux critères de choix pour un phytochimiste. En effet, depuis la nuit des temps, les plantes ont été utilisées aussi bien comme médicament que comme poison de chasse.

Si une explication scientifique devrait être donnée à l'utilisation d'une plante en médecine traditionnelle, une cible biologique doit être trouvée et la mise au point d'un test pharmacologique correspondant à la maladie à traiter s'impose. D'autre part, la thérapie en médecine traditionnelle peut s'appuyer sur des rites impliquant des esprits ou des causes surnaturelles qui sont associés à la pathologie concernée, ceci relève du domaine ethno anthropologique et le traiter dépasse la compétence d'un chercheur d'un laboratoire scientifique [16].

- **Observations du matériel végétal sur le terrain**

Les observations du matériel végétal et son milieu lors de sa cueillette peuvent donner des informations précieuses. Ainsi, une plante qui pousse dans un milieu tropical riche en microorganismes (champignons, bactéries, etc.) et parasites divers et qui ne présente aucun signe d'attaque par ces microorganismes, serait susceptible de produire des métabolites secondaires (substances chimiques synthétisées par les plantes) qui lui permettraient de faire face à ces agressions. Une telle plante peut être une source inestimable de nouveaux produits possédant des activités biologiques intéressantes (antifongique, antibactérienne, antiparasitaire ou antioxydant par exemple) [17].

- **Aspects botaniques et chimiotaxonomiques**

Quand la classification des végétaux s'appuyant sur les caractères morphologiques, fait défaut, l'utilisation des métabolites secondaires pour les classer en taxons sera utilisée. C'est ce qu'on appelle classification chimique ou chimiotaxonomique. Actuellement, le recours aux séquences de gènes ou d'ADN par les systématiciens (systématique moléculaire) pour la classification complète les deux approches précédentes.

Les plantes appartenant aux mêmes familles ou à des familles voisines et qui poussent dans le même biotope sont susceptibles de synthétiser des molécules chimiques voisines du point de vue structural.

De plus, si ces substances sont particulièrement connues pour leur pouvoir thérapeutique, la prise en compte de critères chimiotaxonomiques pour étudier une espèce faisant partie de telle famille aura de fortes chances d'aboutir à l'isolement d'au moins un composé susceptible de nous intéresser.

L'endémicité des espèces est aussi à prendre en considération. Sachant que la distribution géographique de telles espèces est restreinte et que des études phytochimiques antérieures effectuées sur ces espèces sont rares, la probabilité d'obtenir de nouvelles molécules serait grande [18].

- **La littérature**

Avant d'entreprendre une investigation phytochimique d'une espèce végétale donnée et dans le but d'isoler de nouvelles substances qui peuvent avoir un intérêt thérapeutique, il est nécessaire de faire une recherche approfondie de la littérature. Ainsi, il est plus judicieux de choisir pour notre travail une plante peu ou pas étudiée. Cependant, même pour une plante largement étudiée, mais pour laquelle une approche différente serait employée: procédé analytique différent, cibles biologiques différentes, etc. les résultats obtenus peuvent ne pas être équivalents aux résultats antérieurs [19].

- **Le hasard**

La grande diversité des métabolites secondaires synthétisés par les plantes constitue un énorme potentiel pour les phytochimistes pour trouver de nouveaux produits. En effet, sur environ trois cent à cinq cent mille espèces végétales [20], seule une petite partie a été étudiée. De ce fait, le hasard doublé d'une bonne intuition augmente fortement les chances d'aboutir à de nouveaux composés.

I-2. CRITÈRES DE SÉLECTION DES EXTRAITS

Plusieurs méthodes sont mises à la disposition du phytochimiste pour évaluer les extraits bruts. Il s'agit du criblage chimique et biologique.

- **Criblage chimique**

L'analyse des extraits bruts par chromatographie sur couche mince (CCM) et les observations sous les lampes UV à 254 nm et 366 nm et après révélation avec des réactifs chimiques spécifiques [19], nous permet dans un premier temps d'avoir une idée sur les classes de composés des extraits testés.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée avec des méthodes de détection par spectrophotométrie UV et par spectrométrie de masse (MS) des extraits bruts permet de déduire des informations importantes sur la composition de ces extraits. En effet, certains composés présentent un spectre UV caractéristique et sont facilement détectables dans l'extrait brut (flavonoïdes par exemple). Le spectre SM peut donner des informations sur la masse moléculaire de ces composés. D'autre part, certains

fragments spécifiques apportent des informations supplémentaires pour déduire la structure de base de ces substances.

- **Criblage biologique**

Pour guider l'isolement de nouvelles molécules actives, chaque extrait est soumis à une multitude de tests biologiques. Ces tests doivent être simples, rapides et spécifiques pour permettre une sélection efficace des extraits. Notons toutefois qu'un résultat négatif, obtenu pour un extrait testé sur une cible biologique donnée, n'exclut pas toujours la présence de substances actives dans cet extrait (cas de synergie). Dans certains cas également, la concentration de ces substances est peut être très faible pour que l'on puisse détecter leur activité sur plaque CCM. Par conséquent, d'autres tests sont à envisager avant d'écarter tel ou tel extrait. Dans le cas où des extraits donnent des réponses positives, on peut passer à des étapes ultérieures de fractionnement de ces extraits pour rechercher les fractions actives par priorité, jusqu'à obtention des molécules pures responsables de l'activité biologique imputée à l'extrait ou à la plante (fractionnement guidés par l'activité biologique).

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicament. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. De l'aspirine au Taxol, l'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologiques inédites. Cette source semble inépuisable puisque seule une petite partie des 400.000 espèces végétales connues ont été investiguées sur les plans phytochimique et pharmacologique, et chaque espèce peut contenir jusqu'à plusieurs dizaines à centaines de constituants différents [21].

Dans le cadre de la recherche de molécules ou activités biologiques nouvelles d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier, y compris dans les pays occidentaux. Une autre possibilité est de considérer l'écosystème dans lequel se développent les espèces végétales. La recherche de molécules aux propriétés antiradicalaires dans des plantes de montagne

obéit par exemple à cette logique. En effet, celles-ci sont plus exposées aux rayons UV en altitude et ont donc dû développer des mécanismes de protection, peut-être basés sur des métabolites secondaires spécifiques.

I-3. PRÉSENTATION DE LA PLANTE ÉTUDIÉE : *Ampelodesma mauritanica*

I-3-1. Description botanique de la plante

Le Diss (*Ampelodesma mauritanica*) famille des Poacées, est une grande graminée répandue dans l'Afrique du Nord méditerranéenne et les régions sèches de l'Europe du Sud. Plante herbacée vivace haute. Il fleurit entre avril et juin; les feuilles sont résistantes longues jusqu'à 1 mètre et large de 7 mm, extrêmement rude [11].



A



B

Photo 01: *Ampelodesma mauritanica* (Diss) : A- fleurissante, B- non fleurissante

I-3-2. Utilisation

La plante est utilisée comme tressage et sert comme matériel pour fabrication de papier [11], en outre des études récentes ont montré qu'elle peut être utilisée comme additif pour renforcer le béton [22], Elle est aussi utilisée par les éleveurs de bœufs comme antiparasitaire et en médecine traditionnelle comme antidiabétique [12-14].

I-3-3. Taxonomie

Règne:	Végétal
Embranchement:	Magnoliophyta
Classe:	Liliopsida
Ordre:	Cyperales
Famille:	Poaceae
Genre:	Ampelodesma
Nom botanique :	<i>Ampelodesma mauritanica</i>

I-3-4. Espèces similaires

Il y a 3 espèces dans le genre *Ampelodesma* [23], à savoir: *mauritanica* - *mauritanicum* - *tenax*.

GÉNÉRALITÉS SUR QUELQUES MÉTABOLITES SECONDAIRES

II-1. GÉNÉRALITÉS

Les plantes produisent un grand nombre de composés, dont, il n'y a pas très longtemps, on ne connaissait pas le rôle pour la plante. Ces composés ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse mais résultent de réactions chimiques ultérieures, d'où le nom de métabolites secondaires. Des découvertes récentes ont montré que bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes. Ils ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie: en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique et dépassent actuellement 100 000 substances identifiées. Parmi eux: les composés phénoliques, les alcaloïdes et les terpènes. Ces composés se trouvent dans toutes les parties des plantes mais ils sont distribués selon leurs rôles défensifs. Cette distribution varie d'une plante à l'autre [24].

II-2. LES TERPENES

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable, très diversifiés. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15, 20 atomes de carbones. Les extraits terpéniques sont employés comme condiment (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Ils ont un caractère commun, formés d'unités isopréniques (C_5H_8).

Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyle butadiène, appelées unités isopréniques $(C_5H_8)_n$. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux. De ce fait une classification rationnelle, basée sur ce nombre qu'ils renferment, est possible [25, 26] (tableau 01):

Tableau 01: *Classification des terpènes.*

Monoterpènes	C10
Sesquiterpènes	C15
Diterpènes	C20
Sesterpènes	C25
Triterpènes et Stéroïdes	C30
Tetraterpènes	C40
Polyterpènes	(C10) _n avec n>8

II-3. LES COMPOSÉS PHENOLIQUES

II-3-1. Définition

Les polyphénols ou les composés phénoliques constituent une des plus grandes familles de molécules organiques largement répandues dans le règne végétal, avec plus de 8000 structures phénoliques connues [27]. Le terme polyphénol a été introduit en 1980 en remplacement au terme ancien de tanin végétal [28, 29]. Se sont des métabolites secondaires des végétaux présent dans toute la partie de la plante [30], caractérisés comme l'indique le nom par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de hauts poids moléculaires.

Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important, ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, grains et bois [31].

II-3-2. Structure et Classification

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique (benzénique) auquel est directement lié au

moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé avec d'autres fonctions, éther, ester, ou hétéroside [32].

Les composés phénoliques peuvent être regroupés en de nombreuses classes (Tableau 02) [33,34] qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant d'une simple C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation, ...) enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autre molécules (glucides, lipides, protéines, autre métabolites secondaires pouvant être ou non des composés phénolique) [35].

Tableau 02: Les classes les plus importantes des composés phénoliques dans les plantes [24].

nombre d'atomes de carbone	squelette de base	classe
06	C6	phénols simples, benzoquinones
07	C6 - C1	acides phénoliques
08	C6 - C2	acétophénone, acide phénylacétique
09	C6 - C3	acide hydroxycinnamique, polypropène, coumarine, isocoumarine
10	C6 - C4	naphtoquinone
13	C6 - C1 - C6	xanthone
14	C6 - C2 - C6	stilbène, anthraquinone
15	C6 - C3 - C6	flavonoïdes, isoflavonoïdes
18	(C6 - C3) 2	lignanes, neolignanes
30	(C6 - C3 - C6) 2	biflavonoïdes
n	(C6 - C3) n	lignines
	(C6) n	catecholmelanine
	(C6 - C3 - C6) n	(tannins condensés)

Nous présentons dans la figure suivante les structures de quelques composés phénylpropanoïdes et coumarines :

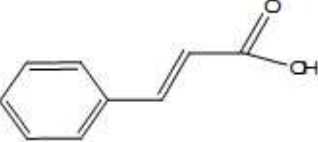
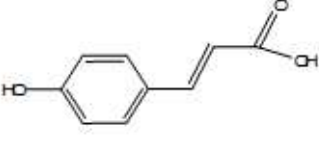
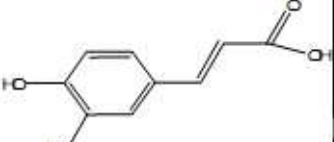
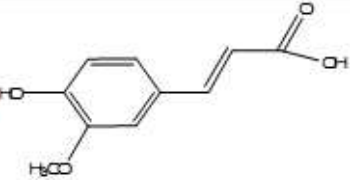
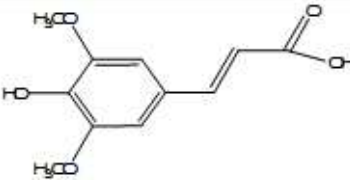
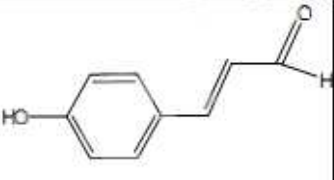
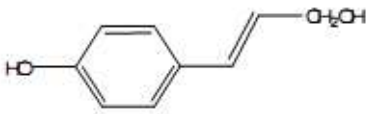
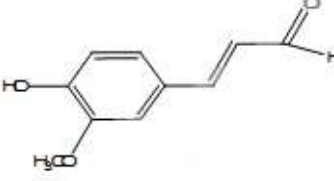
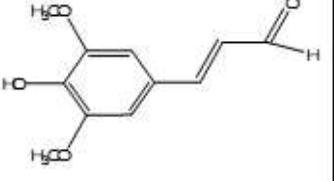
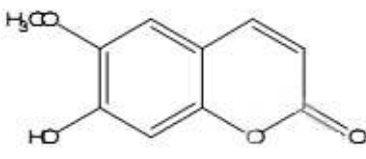
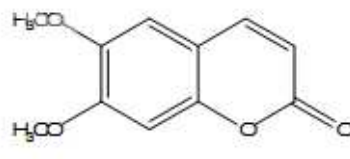
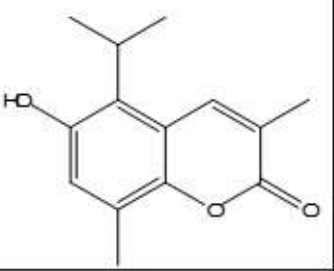
		
acide t-cinnamique	acide p-coumarique	acide caféique
		
acide férulique	acide sinapique	p-coumaraldéhyde
		
alcool p-coumarylique	coniferaldéhyde	sinapaldéhyde
		
scopolétine (coumarine)	scoparone	3,8-diméthyl- 5-isopropyl-6- hydroxycoumarine

Figure 01: structures de quelques composés phénylpropanoïdes et coumarines [24].

II-3-3. Rôle des composés phénoliques

Le rôle des composés phénoliques est maintenant reconnu dans différents aspects de l'utilisation que fait l'homme des végétaux.

Les polyphénols sont partiellement responsables des qualités sensorielles et alimentaires des aliments végétaux (couleur, astringence, amertume, qualités nutritionnelles...). L'astringence et l'amertume des nourritures et des boissons dépendent de la teneur en polyphénols [36].

Les polyphénols sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Les composés phénoliques représentent un système de défense pour les plantes contre les micro-organismes pathogènes [37].

Ils sont largement utilisés en thérapeutique comme vasculoprotecteurs [38], anti-inflammatoires [39, 40], antiradicalaires et antioxydants [41], analgésiques [42, 43]

II-4. LES FLAVONOÏDES

II-4-1. Définition

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs et des fruits. Ils existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides : les flavonosides [29].

Ils sont très largement répandus dans le règne végétal (les fruits, les légumes, les graines ou encore les racines des plantes) [44]. Les familles les plus riches en flavonoïdes sont: les *Fabacées*, les *Myrtacées* et les *Polygonacées* [45].

Tous les flavonoïdes (plus de 6000 structures) possèdent le même élément structural de base : le noyau flavane constitué de deux noyaux aromatique A et B et d'un hétérocycle oxygéné central C [15, 46] (Figure 02).

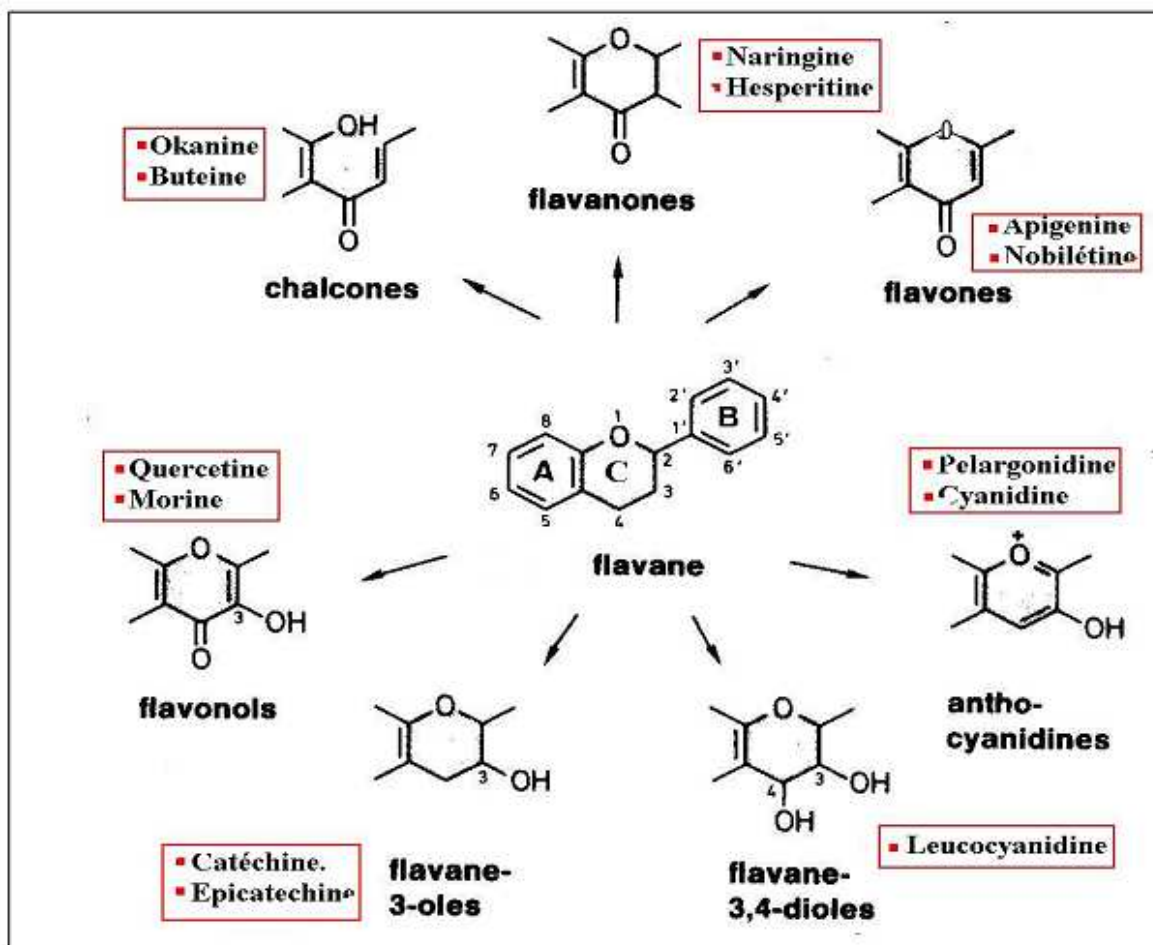


Figure 02 : Différents types de flavonoïdes [47, 48].

II-4-2. Activités biologiques et intérêts pharmacologiques des flavonoïdes

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, antispasmodiques, antitumorales, antiagrégation plaquettaires, antiallergiques, hypocholestérolémiantes, anti-inflammatoires, antihypertensives et antimicrobiennes [49-58].

Certains flavonoïdes (notamment du soja) ont un effet préventif sur le cancer du sein, de la prostate et l'ostéoporose [59].

Les flavonoïdes peuvent empêcher le diabète ou du moins le réduire en inhibant l'enzyme aldose réductase. Ong et Khoo ont reporté que la myricétine possède un effet hypoglycémiant chez les animaux diabétiques [60].

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant: par capture directe des espèces réactives de l'oxygène (ERO), par chélation de métaux de transition et par inhibition de certaines enzymes responsables de la production des ERO [44, 54, 61].

Parmi les composés les plus antioxydant on peut citer la catéchine, la quercétine, et l'apigénine mais aussi les acides phénoliques tels que les acide caféique et chlorogénique. Le thé est une source importante de flavonoïdes, sa consommation pourrait contribuer à diminuer les taux de cholestérol plasmatique et participerait à la protection des lipoprotéines.

Cependant, les influences nutritionnelles sont toujours très complexes et il est nécessaire de réunir le maximum de facteurs favorables pour bénéficier des effets protecteurs potentiels de l'alimentation [29].

II-5. LES SAPONINES

Les Saponines sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, composé d'un groupement sucre lié à un génine triterpénique ou de stéroïde [62]

La définition classique de saponines est basé sur leur tension de surface; les saponines ont des propriétés détergentes, donnent des mousses stables dans l'eau et montrent une activité hémolytique

Les Saponines représentent une famille de composés naturels fortement intéressants pour leurs propriétés pharmacologiques, alimentaires et physiologiques [63].

II-6. LES TANINS

Les tanins sont des composés phénoliques solubles dans l'eau, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines [28, 29].

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs deux groupes basés sur des différences structurales : les tanins hydrolysables et les tanins non hydrolysables, ou tanins condensés [44].

Les tanins ont un effet antidiarrhéique, et par voie externe, ils imperméabilisent les couches superficielles de la peau. Ces propriétés, ajoutées par ailleurs à leur effet antiseptique, en font des molécules intéressantes pour la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures, et les rendent utilisables dans le traitement des diarrhées infectieuses [64, 12].

Ils ont des grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénol. Les tanins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples [28, 65].

Des études menées en Nouvelle-Zélande ont montré que la consommation de plantes à tanins pouvait affecter la biologie de certaines espèces de parasites intestinaux en diminuant la production des œufs. De nombreuses études ont montré l'effet antimicrobien des tanins sur différents bactéries, virus et champignons [28, 66].

CHAPITRE – III –

RAPPELS SUR LES ANTIOXYDANTS

III-1. GÉNÉRALITÉS

Le concept selon lequel l'oxygène, molécule indispensable pour la vie, peut entraîner des dommages cellulaires importants par formation de dérivés oxygénés activés tel que les radicaux libres, est encore mal perçu dans le milieu médical. Pourtant, de très nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont suggéré le rôle de ces espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le développement de nombreux processus pathologiques comme l'athérosclérose et la cancérogenèse. Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants composés d'enzymes (la glutathion peroxydase), de vitamines (A, C, E), d'oligo-éléments (le sélénium), de protéines (la ferritine) [67].

En situation physiologique, ces systèmes antioxydants ont la capacité de réguler parfaitement la production des ERO. Un stress surviendra lorsqu'il y aura un déséquilibre dans cette balance prooxydants/antioxydants en faveur des ERO. Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie (le tabagisme), ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit. Déterminer le statut de stress oxydant d'un individu devient donc un sujet de priorité en termes de prévention de maladies. Ceci se justifie sur la base de très nombreuses études montrant que les personnes ayant des concentrations sanguines faibles en antioxydants (vitamines A, C ou E) ou des concentrations élevées en marqueurs d'oxydation des lipides ou de l'ADN, ont plus de risques de développer des maladies cardiovasculaires ou un cancer que des personnes ayant un bilan antioxydant normal résultant d'une alimentation équilibrée en fruits et légumes. Sur base de bilans sanguins perturbés, prendre des compléments en antioxydants à des doses physiologiques pourra donc se justifier à condition que ceci soit réalisé sous un contrôle médical strict [68].

Au niveau médical, les vitamines C et E tout comme les oligo-éléments, ont été et sont encore maintenant considérés comme des molécules permettant de lutter contre un état de fatigue.

Actuellement, il est toujours très difficile de convaincre le milieu médical du rôle potentiel que peuvent jouer ces vitamines comme antioxydants dans la prévention de différentes maladies. Ceci est pourtant connu de longue date. En 1960 le célèbre chercheur français Henry Laborit attirait déjà l'attention sur la toxicité de l'oxygène pressurisé et préconisait l'usage d'antioxydants comme agents protecteurs [69].

En 1968, le Food and Nutrition Board aux Etats-Unis reconnaissait la vitamine E comme étant une molécule essentielle en vertu de ses propriétés antioxydantes. L'implication des antioxydants dans notre vie de tous les jours a véritablement pris son essor lorsque les Américains McCord et Fridovich isolent en 1969 la SOD (superoxyde dismutase), enzyme capable de détruire l'anion superoxyde. Malgré un nombre incalculable de travaux scientifiques de haute qualité, il faudra attendre ce début de nouveau millénaire pour que l'importance des antioxydants soit reconnue en matière de médecine de prévention.

L'avènement de la biologie moléculaire nous permettra par ailleurs de découvrir d'autres faces cachées de ces antioxydants.

Bien qu'étant antioxydants, les flavonoïdes ont des effets prooxydants sur les protéines, sur la peroxydation des lipides et sur l'ADN.

On définit comme radical libre, n'importe quelle molécule indépendante contenant un ou plusieurs électrons non appariés. Bien que le terme de radical libre ait souvent été assimilé à une espèce réactive ou à un oxydant, il est important de signaler que tous les radicaux libres ne sont pas forcément des oxydants. De même que, tous les oxydants ne sont pas des radicaux libres.

On désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat.

L'origine des radicaux est diverse: tout d'abord, la pollution de notre environnement peut générer la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Une bouffée de cigarette contient environ 1014 radicaux. Ces mêmes cigarettes contiennent également des traces d'ions métalliques qui peuvent réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour former des radicaux hydroxyles.

Les antioxydants d'origine naturelle semblent contribuer de manière significative à la prévention de certaines maladies telles que les cancers et les maladies cardiovasculaires.

III-2. TYPES D'ANTIOXYDANTS

Il existe deux catégories d'antioxydants :

Les séquestrants de métaux et les phagocytes de radical libre. Les séquestrants de métaux précipitent un métal ou suppriment sa réactivité en occupant tous les sites de coordination; les phagocytes de radical libre comprennent l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'hydroxyanisole butylé (BHA), les tocophérols (vitamine E) et l'acide ascorbique (vitamine C) [67].

III-3. SOURCES D'ANTIOXYDANTS

En plus des substances propres à l'organisme, les médicaments, l'alimentation et les plantes peuvent être également des sources d'antioxydants [67].

III-3-1. Médicaments

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les anti-hyperlipoprotéïnémiques, les bêta-bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés antioxydantes :

- **AINS** (anti-inflammatoires non stéroïdiens): Le mécanisme d'action commun de tous les AINS est la diminution de la production de prostaglandines du fait de l'inhibition de la cyclo-oxygénase.
- **Antihypertenseurs**: Ils agissent en inhibant la réabsorption des ions Na^+ et Cl^- à différents niveaux.
- **Le probucol** par exemple est un médicament qui en plus de ses effets reconnus dans la baisse de cholestérol, prévient l'athérogenèse en agissant comme antioxydant et en supprimant la modification oxydative des lipoprotéines de basse densité (LDL).

III-3-2. Source alimentaire

Certaines substances ingérées sont utilisées par l'organisme comme antioxydants. Ce sont principalement : la vitamine C, la vitamine E, le sélénium et le β -carotène.

➤ La vitamine C ou acide ascorbique

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E. Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron, les agrumes [70].

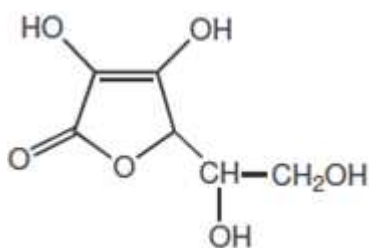


Figure 03 : Acide Ascorbique.

➤ La vitamine E ou tocophérol

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes. Elle est présente dans les huiles végétales, les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs et les légumes à feuilles vertes [71].

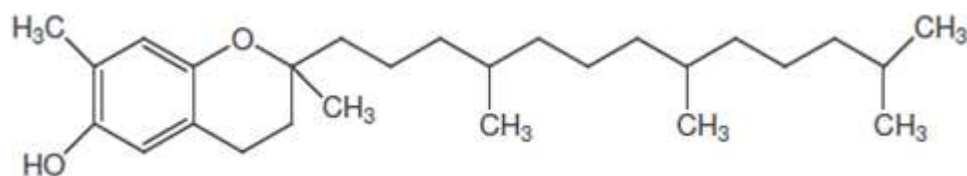


Figure 04 : *n*-tocophérol.

➤ Le sélénium

C'est l'oligo-élément le plus « à la mode » pour ses propriétés antioxydantes avérées. Jadis comme un toxique, ses effets bénéfiques sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers [71].

➤ Le β -carotène

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet. Il est retrouvé dans les légumes verts, les épinards, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, la papaye et d'autres fruits jaunes [71].

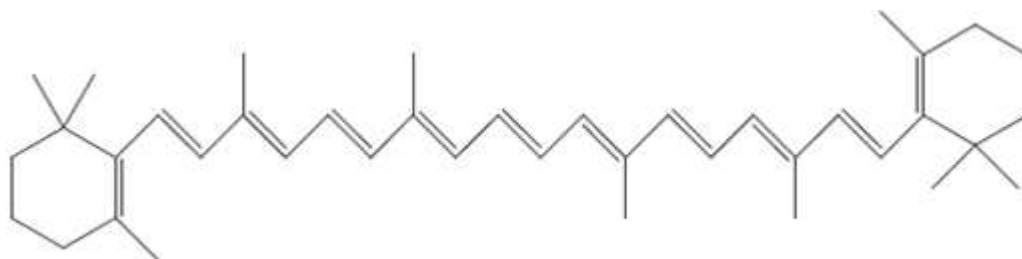


Figure 05 : β -carotène.

III-3-3. Antioxydants naturels

En ce qui concerne les plantes médicinales bien connues et économiquement importants, nous pouvons citer l'ail (*Allium sativum* L ; *Liliaceae*) et le ginkgo (*Ginkgo biloba* L ; *Ginkgoaceae*) qui sont utilisés dans le traitement des maladies cardio-vasculaires et circulatoires dues au vieillissement [72].

➤ Les flavonoïdes

Présentes dans la plupart des plantes, les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques qui sont responsable dans la plupart des colorations des fleurs et des fruits. Ils possèdent de nombreuses vertus thérapeutiques. Ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation. Certains ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et anti virales, d'autres ont des effets protecteurs sur le foie.

Des flavonoïdes comme l'héspéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le Sarrasin et le Citronnier, renforcent les parois capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins.

Les relations structure activités antioxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité antioxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation [72].

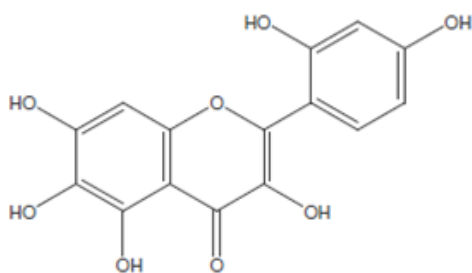


Figure 06 : *Morine*.

➤ Les tanins

Toutes les plantes en contiennent à des degrés différents. Ce sont des composés polyphénoliques qui permettent de stopper les hémorragies et de lutter contre les infections. Les plantes riches en tanins sont utilisées pour retendre les tissus souples, comme dans le cas des veines variqueuses, pour drainer les sécrétions excessives, comme dans la diarrhée et pour réparer les tissus endommagés par un eczéma ou une brûlure [72, 35].

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides [73].

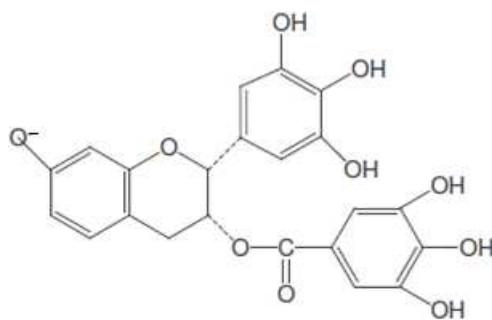


Figure 07 : *Gallate d'épigalocatéchine*.

➤ Les coumarines :

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses.

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Les conditions structurales requises pour

l'activité antiperoxydante des coumarines sont similaires à celles signalées pour les flavonoïdes [71].

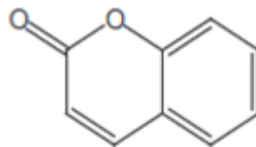


Figure 08 : *Coumarine.*

➤ Les phénols

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine, à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides. Les phénols sont anti-inflammatoires et antiseptiques. On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales.

Parmi les dérivés phénoliques, le resvératrol est le composé qui est le plus étudié. En effet, ce stilbène, isolé du raisin possède de fortes propriétés antioxydantes [72].

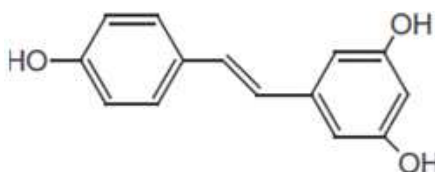


Figure 09 : *Resvératol.*

➤ Les xanthones

Les propriétés pharmacologiques reconnues des xanthones sont essentiellement: leur activité antimicrobienne, leur cytotoxicité et surtout l'inhibition de la monoamine-oxydase [74]

La manguiférine est une xanthone qui possède la propriété d'inhibition envers la peroxydation des lipides, ainsi que des propriétés de capteurs de radicaux libres contre les anions super oxydes [75]

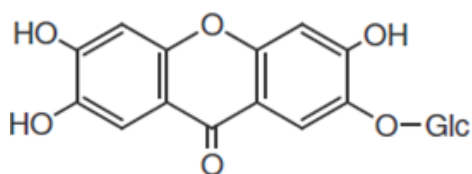


Figure 10 : *Mangiférine.*

III-4. QUELQUES PLANTES À ACTIVITE ANTIOXYDANTE

Le tableau suivant regroupe quelques plantes douées d'une capacité antioxydante :

Tableau 03 : *Quelques plantes à activité antioxydante [76].*

Plantes	Partie utilisée	Famille
<i>Diopyros abyssinica</i> Hiem.f.W	Feuilles	<i>Ebenaceae</i>
<i>Psorospermum guineense</i> Spach.	Feuilles	<i>Hypericaceae</i>
<i>Burkea africana</i> Hook.	écorces tronc	<i>Caesalpiniaceae</i>
<i>Cussonia barteri</i> Seenm.	écorces tronc	<i>Caesalpiniaceae</i>
<i>Entada africana</i> Guill et Perr.	écorces tronc	<i>Mimosaceae</i>
<i>Lannea velutina</i> Rich.	Feuilles, écorces (racines et tronc)	<i>Anacardiaceae</i>
<i>Guiera senegalensis</i> J.F Gmel.	Feuilles	<i>Combretaceae</i>

III-5. MÉCANISME D'ACTION DES ANTIOXYDANTS

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la complexation d'ions et de métaux de transition.

Cet intérêt a plusieurs origines; en tant que constituants alimentaires, ces antioxydants naturels semblent contribuer de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer ou encore des maladies cardio-vasculaires [67].

III-6. MÉTHODES DE TESTS ANTIOXYDANTS

Il existe plusieurs méthodes spectrophotométriques de détermination de l'activité antioxydante, les tests courants utilisés à cet effet selon Ozgen et al. [77] sont:

- le test de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS) ;
- le test du 2,2-diphényl picrylhydrazyl (DPPH) ;
- le test basé sur la réduction du molybdène (VI) à (V) (PPM)

Et autres méthodes utilisant des plaques CCM.

II-6-1. Le test d'ABTS

L'extrait de plante est mis en contact avec les radicaux libres d'ABTS préformés et l'absorbance est lue avec un spectrophotomètre à 734 nm. Les radicaux libres d'ABTS sont fondamentalement créés de deux manières :

A partir de l'ABTS et du persulfate de potassium $K_2S_2O_8$: les deux produits en solution aqueuse sont mélangés et mis à l'abri de la lumière pendant 12 à 16H; l'absorbance de la solution ainsi obtenue est ajustée à 0.700 ± 0.020 à 734 nm avant l'usage [63].

A partir de l'ABTS et du chlorure du 2, 2'-azobis (2-amidino-propane) (AAPH) jouant le rôle d'initiateur de réaction dans le tampon phosphate salin (PBS) à pH 7,4. Le mélange est chauffé à 68°C. L'absorbance de la solution obtenue (bleu – vert) est ajustée à $0,650 \pm 0,020$ à 734 nm [78]. Ce test est basé sur le principe de la détection de l'activité antioxydante d'une substance par l'oxydation des lysosomes par l'AAPH [79].

Dans les deux cas, on assiste à une oxydation partielle de l'ABTS selon l'équation suivante:

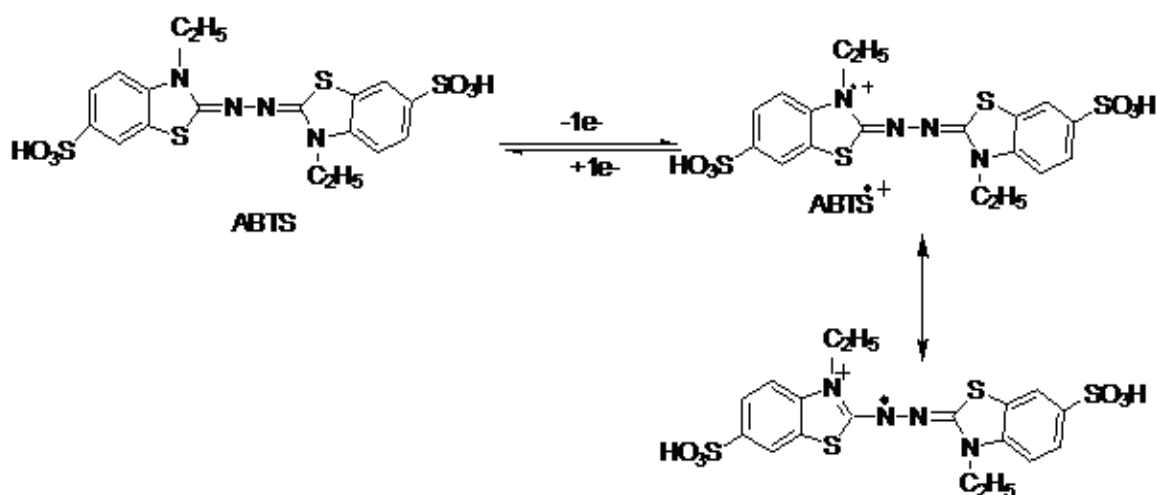


Figure 11 : Oxydation partielle de l'ABTS.

L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition. Les réactions qui se déroulent peuvent être de type ABTS / trans-3,3',4', 5,7-pentahydroxyflavan (catéchine) ou ABTS / 1, 3,5-trihydroxybenzène (phloroglucinol) schématisées par les réactions suivantes [80] :

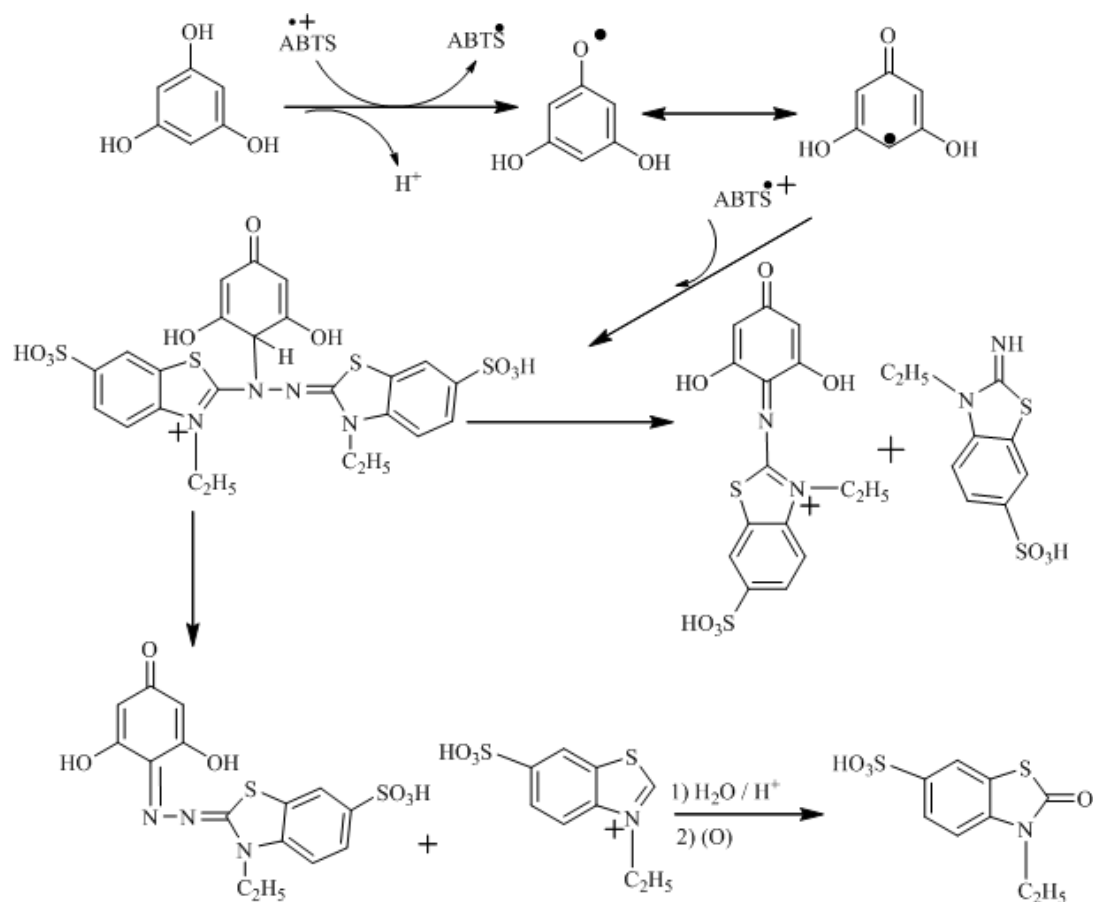
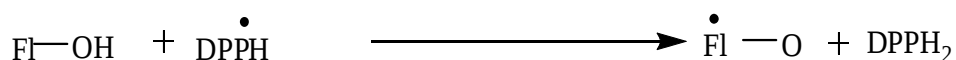


Figure 12: la réaction entre l'ABTS et l'antioxydant.

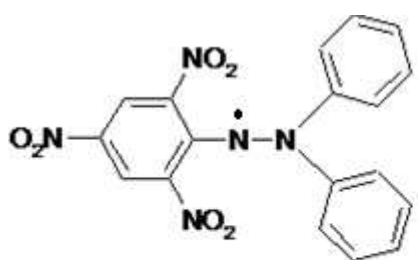
III-6-2 Le test du DPPH

Les radicaux du 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (figure 17) sont dissous dans du méthanol absolue, généralement à 0,004 % (P/V). L'extrait de plante ou l'antioxydant de référence est mis en contact avec la solution radicalaire de DPPH ; après incubation l'absorbance est lue à 515-517 nm. Les réactions qui se déroulent peuvent être de type

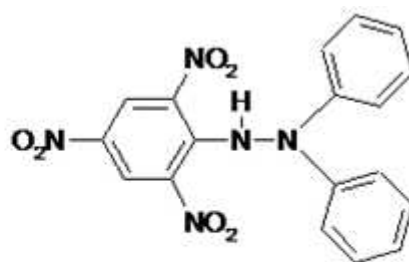


L'activité antioxydante de l'extrait est comparée à celle d'un antioxydant de référence en termes d'équivalence ou en termes d'inhibition [79].

Le radical libre stable (figure 13) possède une coloration violette foncée, lorsqu'il est réduit, la coloration devient jaune pâle.



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)



Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)

Figure 13 : *Forme libre et réduite du DPPH* [81].

III-6-3. Le test du PPM

Le test du PPM est une variante du test au DPPH. Au cours de ce test, l'hydrogène et l'électron sont transférés du composé réducteur (extrait-antioxydant) vers le complexe oxydant (PPM). Ce transfert dépend du potentiel redox, du pH du milieu et de la structure du composé antioxydant.

Le test est basé sur la réduction du molybdène de l'état d'oxydation (VI) à l'état d'oxydation (V). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/ Mo(V) à un pH acide).

On mesure la diminution de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tel que les vitamines (C, E...) [82].

III-6-4. Tests par CCM

❖ Réduction du radical diphenyl picrylhydrazyle

Il s'agit de déposer des extraits, fractions ou produits purs à tester sur des plaques CCM de gel de silice en aluminium et développées dans le système approprié.

Après séchage, gicler les plaques CCM avec une solution méthanolique à 2mg/ml de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

Des activités antiradicalaires apparaissent sous de spots de couleur jaune-blanc sur fond violet [73].

❖ Test mesurant l'activité antioxydante au moyen de caroténoïdes

Les plaques CCM sont préparées de la même manière que pour le test du DPPH, puis giclées avec une solution chloroformique à 0.5mg/ml de β -carotène. La plaque CCM est ensuite exposée sous une lampe UV à 254 nm jusqu'à décoloration de la plaque. Les zones antioxydantes apparaissent en jaune sur fond blanc. Il faut faire attention aux substances déjà colorées en jaune, car elles peuvent donner de faux positifs [73].

CHAPITRE – IV –

MICROORGANISMES ET PATHOLOGIES

IV-1. LES MICROORGANISMES

Les microorganismes sont définis historiquement comme des organismes vivants trop petits pour être distingués à l'œil nu et généralement formés d'une seule cellule. Ce terme est donc utilisé pour désigner des organismes unicellulaires ou constitués d'un nombre limité de cellules.

Parmi les organismes unicellulaires, nous trouvons des procaryotes (les archéobactéries et les eubactéries) et des eucaryotes (les protistes et certains champignons dont les levures). Le terme protiste désigne l'un des règnes du vivant regroupant tous les êtres vivants mobiles et unicellulaires. Le règne des protistes se divise généralement en deux parties: les *protozoaires* à affinités animales et les *protophytes* à affinités végétales (Photo 02) [83].

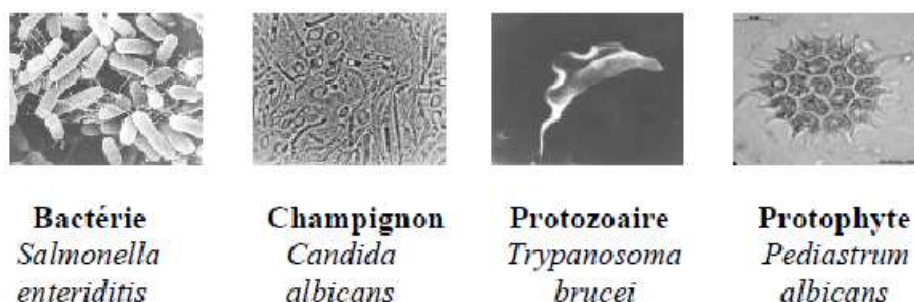


Photo 02 : *Microorganismes sous Microscope*

Les microorganismes sont donc présents dans toute la structure de la taxonomie. Ils vivent dans tous types d'environnements, y compris ceux hostiles. En effet, il existe des bactéries thermophiles (qui vivent à des températures avoisinant 100°C), des psychrophiles (qui se développent à des températures avoisinant 0°C), les barophiles (qui aiment les hautes pressions) et les halophiles (qui survivent dans des environnements très salés). Ainsi des bactéries ont été trouvées dans des environnements tels que les pôles (cyanobactéries), les volcans (*Thermoproteus uzoniensis*, *Desulfurococcus mucosus*), les geysers au fond des océans (*Methanococcus jannashii* et *Methanopyrus kandleri* vivent à des profondeurs de 2000 à 2600 m). De toutes les bactéries connues par l'homme, la plus résistante est *Deinococcus radiodurans* qui peut résister aux radiations, au froid, au vide, aux oxydants.

La peau et les muqueuses de l'homme hébergent une infinie variété de microorganismes commensaux ou saprophytes qui en constituent la flore normale ou résidente.

Les microorganismes peuvent être néfastes et/ou utiles pour l'environnement, les humains et les animaux, c'est pourquoi il est possible de distinguer :

- les microorganismes auxiliaires de l'homme dans les conditions naturelles,
- les microorganismes domestiqués,
- les microorganismes génétiquement transformés,
- les microorganismes pathogènes.

IV-1-1. Les microorganismes auxiliaires de l'homme dans les conditions naturelles

Les sols et les eaux regorgent de microorganismes dont les activités ont directement ou indirectement des répercussions sur notre vie.

Nul sol ne serait fertile si des microorganismes n'y provoquaient des transformations chimiques comme la transformation de l'azote en ammoniac. En effet, la décomposition de la fraction organique du sol se fait sous l'action de microorganismes et produit des composés minéraux comme le gaz carbonique, l'ammoniac, les nitrates, les carbonates et de l'humus (composés à noyaux aromatiques, riches en radicaux libres, acides fulviques et humiques).

D'autres microorganismes du sol s'associent directement aux plantes, en particulier au niveau des racines. Une telle association est souvent bénéfique à leur croissance (bactéries pour les légumineuses), voire à la germination des graines (champignons inférieurs pour les orchidées).

Dans le plancton marin, des microorganismes assurent environ le tiers de la "production primaire" mondiale, c'est-à-dire la conversion de substances minérales (nitrates, gaz carbonique) en matière vivante avec le concours de l'énergie solaire. Sans cette part de la production primaire, la mer n'offrirait à peu près aucune ressource exploitable pour l'alimentation humaine. De plus, de par leur capacité à dégrader ou à synthétiser des matières organiques et minérales, de nombreux microorganismes ont un rôle en terme de dépollution des eaux surchargées en carbone, en azote et en phosphore.

IV-1-2. Les microorganismes domestiqués

Des bactéries et des levures sont souvent utilisées par l'homme dans les processus de fermentation comme la transformation du lait en fromage, la fabrication de boissons fermentées comme le vin ou la bière, la fermentation des végétaux par exemple pour la choucroute. Elles sont également utilisées en boulangerie traditionnelle et industrielle.

Des microorganismes vivants, appelés " probiotiques " (des bactéries et des levures, présentes ou non dans la microflore intestinale résidente) peuvent également être ingérés sous forme de médicaments et de nombreuses études leur accordent des effets bénéfiques pour la santé de part leur action sur l'amélioration de l'équilibre microbien intestinal et sur la stimulation du système immunitaire.

L'action bactériostatique (inhibition de la croissance) de certains microorganismes envers d'autres a été mise en évidence par Fleming et a permis la découverte de la pénicilline par isolement de cette molécule à partir du champignon *Penicillium notatum*. En dehors de ce microorganisme, les bactéries du genre *Streptomyces* produisent de nombreux antibiotiques, environ deux tiers de tous les antibiotiques connus.

IV-1-3. Les microorganismes génétiquement transformés

Le « génie génétique » a permis d'inclure dans le matériel génétique de certaines bactéries (*E. coli* ou colibacille) les gènes responsables de la synthèse de molécules normalement produites par l'organisme humain et de faire fonctionner ces gènes étrangers.

Ainsi, il existe des microorganismes génétiquement modifiés capables de produire de l'insuline humaine: cette insuline peut être utilisée pour soigner des patients atteints de diabète plus efficacement que l'insuline extraite d'animaux, et sans danger de contamination par des organismes pathogènes présents chez les donneurs. Le nombre de médicaments produits de cette manière s'accroît constamment. De la même manière, on peut obtenir des vaccins contre des maladies graves (hépatite B, par exemple) sans aucun risque de déclencher la maladie [83].

IV-1-4. Les microorganismes pathogènes

A côté de ces microorganismes bénéfiques, il existe des organismes (bactéries, protozoaires ou champignons) qui pénètrent dans l'organisme humain et causent des maladies.

Les maladies les plus ravageuses ont été causées par des bactéries qui sont responsables de pathologies comme la tuberculose, le tétanos, la lèpre, la typhoïde, la diphtérie, la syphilis, le choléra, la peste etc. Ces maladies infectieuses sont responsables de 17 millions de décès par an, ce qui représente un tiers de la mortalité observée annuellement sur la planète. En effet, les maladies respiratoires aiguës bactériennes causent 3 millions de décès par an, les maladies diarrhéiques (*Escherichia coli* pathogènes, choléra, fièvre typhoïde ...) 2,5 millions, la tuberculose près de 2 millions [84].

D'autres microorganismes, et non des moindres, sont des eucaryotes, des protozoaires: l'agent responsable du paludisme (*Plasmodium*), qui atteint près d'un homme sur trois dans le monde (1.5 à 3 millions de personnes atteintes par an dont 1 million d'enfants de moins de cinq ans), celui de la maladie du sommeil (Trypanosome) ou encore celui de la dysenterie amibienne (*Entamoeba*). Les microorganismes s'attaquent également aux animaux domestiques. En effet, les coccidies, causent des pertes importantes dans les élevages de lapins et de volailles.

Des champignons sont également responsables de maladies. De plus, la dépression du système immunitaire favorise le développement de germes habituellement inoffensifs comme certaines levures du genre *Candida* (responsables de mycoses). Beaucoup plus rares, elles peuvent se localiser par exemple dans les poumons: aspergillose, cryptococcose, histoplasmosse. Les plantes cultivées peuvent être touchées par des champignons comme par exemple le mildiou de la vigne (un oomycète) ou les charbons des céréales (des eumycètes).

Les microorganismes sont nettement plus nombreux que les hommes et ont une capacité extraordinaire à s'adapter à leur environnement, plus la population humaine augmente, plus elle permet aux organismes pathogènes de se développer, et de les transmettre. Il est donc important de posséder des moyens efficaces pour lutter contre ces microorganismes néfastes pour l'homme [83].

IV-2. COLORATION DE GRAM

La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui a mis au point le protocole en 1884. C'est la méthode de coloration la plus utilisée en bactériologie médicale, elle permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

La coloration de Gram est fondée sur l'action successive d'un colorant d'aniline, le cristal violet, d'iode puis d'un mélange d'alcool et d'acétone. Dans un premier temps, le colorant pénètre dans la paroi et le cytoplasme. Dans un second temps, l'iode réagit avec le colorant et le rend insoluble. La perméabilité plus grande des bactéries à Gram négatif à l'alcool permet la décoloration (élimine le cristal violet et apparaît rose). Les bactéries à Gram positif restent colorées en violet ou mauve [85, 86].

IV-3. MOYENS DE LUTTER CONTRE LES MICROORGANISMES PATHOGENES

Il existe de nombreuses molécules utiles pour lutter contre les microorganismes pathogènes. Dans cette partie nous avons choisi de présenter quelques exemples de composés efficaces pour combattre les protozoaires les champignons et les bactéries [87].

IV-3.1. Contre les protozoaires ...

Il existe divers moyens pour lutter contre le protozoaire *Plasmodium falciparum* responsable du paludisme, véritable fléau actuel [88]. Les molécules les plus efficaces agissent lors de la phase d'infection des globules rouges responsable de la pathologie. Ce sont la chloroquine et la quinine qui est extraite de l'écorce des quinquinas et est aujourd'hui le médicament de référence (Figure 14). Ces composés se concentrent dans la vacuole du parasite en entraînant sa mort. En effet, la digestion de l'hémoglobine de l'hôte par le plasmodium libère une hémine. Ce composé est ensuite éliminé par complexation à une protéine produite par le parasite. L'antipaludique inhibe cette complexation de l'hémine en se fixant à cette protéine. Ainsi, l'hémine toxique s'accumule dans le parasite et provoque sa lyse [89]. Cependant, le développement de clones de *Plasmodium*

falciparum de plus en plus résistants à ces molécules pose de graves problèmes soulignant la nécessité de trouver de nouveaux agents antipaludéens.

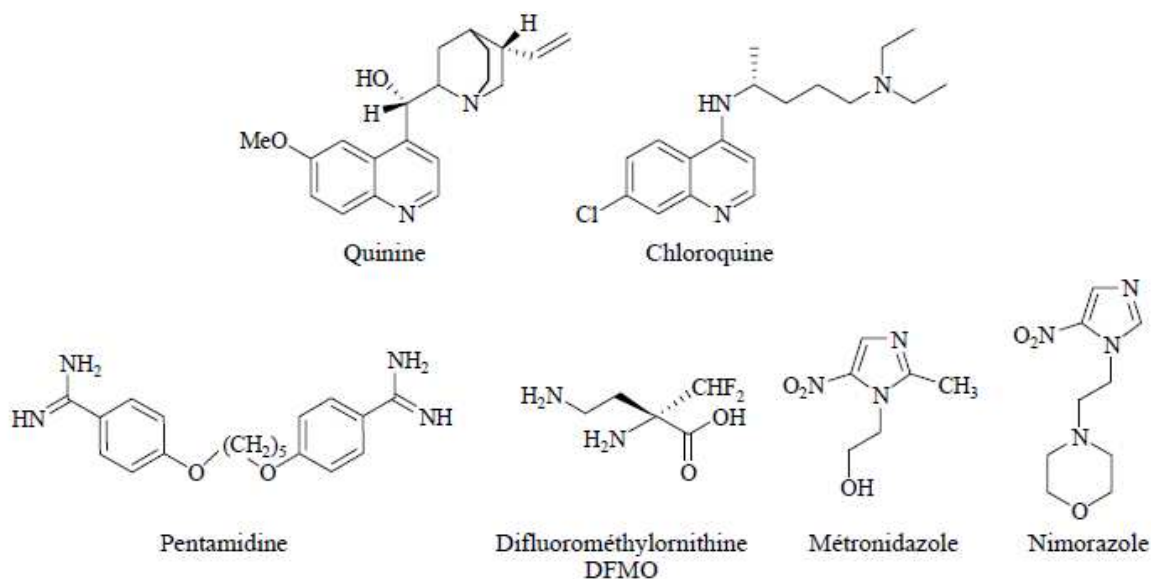


Figure 14 : Exemples de composés utilisés pour soigner des maladies causées par des protozoaires.

Un autre exemple concerne le trypanosome responsable de la maladie du sommeil. Les composés actifs jouent un rôle sur la biosynthèse des polyamines qui sont indispensables pour la croissance et la différenciation cellulaire de ce protozoaire. Les polyamines ont pour effet de moduler la structure ribosomale, de diminuer la flexibilité membranaire et de stabiliser le cytosquelette en se liant aux phospholipides. La difluorométhylornithine (DMFO) (Figure 14), analogue de l'ornithine, inhibe de façon irréversible l'ornithine décarboxylase, enzyme essentielle à la synthèse des polyamines, et de ce fait empêche la prolifération des trypanosomes [90]. La pentamidine (Figure 14) inhibe également la synthèse des polyamines en se liant à l'ADN du trypanosome ce qui détruit l'ADN mitochondrial dans le kinétoplaste et entraîne la mort du protozoaire [91].

La dysenterie amibienne ou amibiase, causée par *Entamoeba histolytica*, est traitée par des dérivés de l'imidazole comme le métronidazole ou le nimorazole (Figure 14). La réduction du groupement nitro de ces molécules s'opère préférentiellement à celle des coenzymes bactériens (NAD^+ et NADP^+), conduisant à une diminution du stock des enzymes importants pour le métabolisme du protozoaire [92].

Cependant, de nombreux protozoaires sont devenus résistants aux médicaments couramment utilisés et il est actuellement nécessaire de trouver de nouveaux composés efficaces [93, 94].

IV-3-2. Contre les champignons

Les principales maladies causées par des champignons sont les candidoses, affections dues à des levures du genre *Candida*, les cryptococcoses, mycoses dues à une levure encapsulée (*Cryptococcus neoformans*) et les aspergilloses, mycoses les plus souvent pulmonaires, provoquées par un champignon filamenteux du genre *Aspergillus*. Ces affections sont traitées par des composés comme l'amphotéricine B ou le fluconazole (Figure 15).

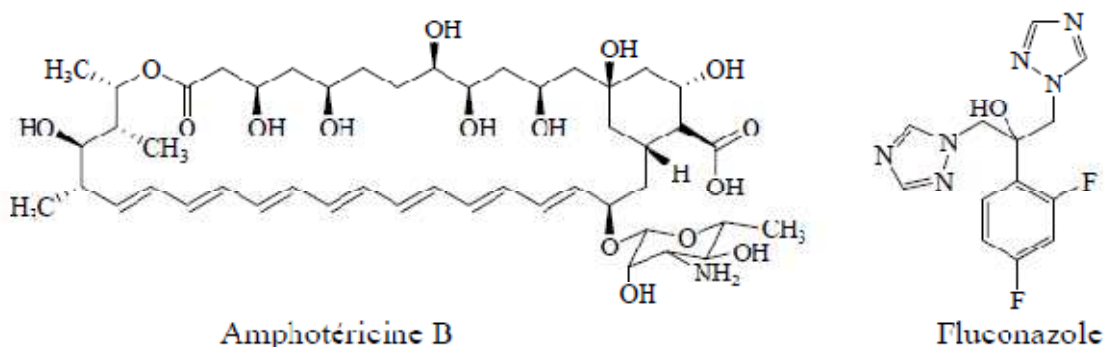


Figure 15 : Exemples de composés utilisés pour soigner des maladies causées par des champignons.

L'amphotéricine B se fixe sur les stérols de la membrane, en général l'ergostérol, en formant des structures toriques perturbant l'étanchéité de la membrane [95]. Le fluconazole empêche la constitution d'une membrane plasmique fongique normale en bloquant la biosynthèse des stérols [96].

IV-3-3. Contre les bactéries

Pour soigner les maladies infectieuses, les antibiotiques sont les outils efficaces les plus fréquemment utilisés. Ces composés qui altèrent le fonctionnement normal des bactéries peuvent inhiber leur croissance (antibiotique bactériostatique) ou les détruire (antibiotique bactéricide).

L'action bactériostatique de certains microorganismes envers d'autres avait été observée en 1877 par Pasteur et Joubert (à propos du bacille charbonneux), mais ce n'est

qu'en 1929 que Fleming constate que la culture en boîte de Petri de *staphylocoques* est inhibée par la présence de moisissures du genre *Penicillium*. Fleming proposa que le champignon sécrétait une substance chimique bactériostatique, utilisable en thérapeutique humaine. Un peu plus tard, la culture en masse permit de disposer de grandes quantités de cette substance: la pénicilline.

En dehors des microorganismes du genre *Penicillium*, les bactéries du genre *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* produisent de nombreux antibiotiques. En effet, les *Streptomyces* produisent environ deux tiers de tous les antibiotiques connus. L'abondance et la diversité structurale des antibiotiques synthétisés par ces bactéries ne se retrouvent dans aucun autre genre bactérien.

IV-4. QUELQUES PLANTES À ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

Les tableaux (04 et 05) regroupent quelques plantes douées d'une activité antifongique et antibactérienne :

Tableau 04 : Quelques plantes à activité antifongique [97].

Plantes	Partie utilisée	Famille
<i>Boscia senegalensis</i> L	Fruits	Capparidaceae
<i>Burkea africana</i> Hock	Ecorces	Caesalpinaceae
<i>Cussonia barteri</i> Sims	Racines	Araliaceae
<i>Fagara xanthoxyloïdes</i> L.	Feuilles	Anacardiaceae
<i>Mitracarpus scaber</i>	Ecorces de tronc	Mimosaceae
<i>Parkia bliglobosa</i> Benth	Feuilles, racines	Hypericaceae
<i>Psorospermum guineense</i> Hochr	Plante entière	Leguminosaeae

Tableau 05 : Quelques plantes à activité antibactérienne [97].

Plantes	Partie utilisée	Famille
<i>Alstonia scholaris</i> Linn .R.br	Bois	Apocynaceae
<i>Ardisa colorata</i> Roxb	Fruit	Myrsinaceae
<i>Boesenbergia rotunda</i> Linn.Mansf	Rhizome	Zinziberaceae
<i>Brucea javanica</i> Merr.	Noyaux	Simaroubaceae
<i>Cassia alata</i> Linn.	Tige	Caesalpiniaceae
<i>Peltophorum dasyrachis</i> Miq.Kurz .ex Baker	Ecorce	Fabaceae
<i>Sandoricum nervosum</i> Car.	Racine	Meliaceae
<i>Euphorbia thymifolia</i> Linn	Plante entière	Euphorbiaceae

IV-5. METHODES D'ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE

L'antibiogramme (ATB) a pour but de déterminer les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) d'une souche bactérienne vis-à-vis des divers antibiotiques. Par définition (O.M.S), la CMI est la plus faible concentration d'antibiotique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une bactérie donnée, appréciable à l'œil nu [98], après une période d'incubation donnée. La détermination de cette valeur est peu précise mais elle est consacrée par l'usage et elle bénéficie d'une masse importante d'informations recueillies à son sujet [99].

Deux genres de techniques sont utilisables :

IV-5-1. Méthode de diffusion

Les disques de papier buvard imprégnés d'une quantité définie d'antibiotique sont déposés à la surface d'un milieu gélosé (milieu de Müller Hinton) préalablementensemencé avec une suspension de bactéries. A partir du disque, l'antibiotique diffuse dans la gélose, sa concentration étant d'autant plus faible qu'on s'éloigne de la source (gradient

de concentration). Après incubation du milieu de culture (18 h à 37 °C), on constate que chaque disque est entouré d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne: la multiplication des microorganismes s'arrête là où il existe dans la gélose une concentration d'antibiotique supérieure ou égale à la concentration minimale inhibitrice (CMI).

On mesure le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne et on en déduit la valeur approchée de la CMI de l'agent antimicrobien vis à vis de la souche étudiée (l'aire circulaire qui entoure le disque et qui ne montre aucune culture visible permet de mesurer le diamètre d'inhibition qui indique le degré de sensibilité de la bactérie) [11].

IV-5-2. Méthode de dilution

C'est la méthode de référence, qui peut être pratiquée en milieu solide et liquide, lorsque la mesure de la CMI est effectuée selon une technique en milieu liquide, on distribue dans un premier temps, dans une série de tubes à hémolyse stériles (ou dans les capsules d'une plaque), sous un même volume, des concentrations décroissantes d'antibiotique que l'on ensemence avec un inoculum calibré de la souche étudiée. Après 18 à 24 h d'incubation à 37°C, la plus faible concentration de la gamme produisant l'inhibition de la culture microbienne est qualifiée de CMI.

Le principe de la technique en milieu solide est identique, différentes concentrations d'antibiotiques sont incorporées dans une série de boîtes qui contiennent un milieu nutritif solide par la présence de gélose. L'intérêt de cette technique en milieu solide réside dans la possibilité d'étudier un grand nombre de souches bactériennes [11].

IV-6. PRÉSENTATION DES MICRO-ORGANISMES TESTÉS

IV-6-1. *Escherichia coli* (colibacille)

Bâtonnets gram négatif apparentant à la famille des Entérobactérie, souvent mobiles, mais parfois immobiles, isolées pour la première fois par Thomas Escherich en 1855. *Escherichia coli* est un genre bactérien dans lequel on ne retrouve qu'une seule espèce; mais il existe plus de 1000 types antigéniques [100].

Escherichia coli (*E. coli*) se développe sur gélose ordinaire, fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production importante de gaz.

L'*E. Coli* est un aérobie facultatif fréquent dans l'intestin de l'homme et des animaux. Il a la forme d'un bâtonnet droit à bout arrondis, assez polymorphe d'une longueur de 2 à 3 µm et d'une largeur de 0,5 µm. Chez l'homme, il est présent à raison de 10^7 à 10^9 bactéries /g de selles, densité cependant très inférieure à celle des anaérobies [101].

La présence d'*E. Coli* dans l'environnement est le témoin d'une contamination fécale. C'est pour quoi on procède systématiquement à sa détection dans les eaux d'alimentation [102].

IV-6-2. *Candida albicans*

Candida albicans est l'ascomycète (levure) pathogène le plus répandu, responsable de la candidose, maladie des muqueuses de la bouche (muguet chez le jeune enfant), du vagin (vaginite) et des voies alimentaires (mycoses généralisées). D'autre part, des plaques blanchâtres au niveau du palais, une affection fréquente chez les nourrissons surviennent, des infections plus sérieuses touchent le cœur (endocardite), le sang (septicémie) et le cerveau (méningite).

Candida albicans est l'espèce de levure la plus connue du genre *Candida*. Au laboratoire médical, la culture en boîte pétri donne des colonies qui sont grandes, rondes, de couleur blanche ou crème, *candida albicans* produit un *pseudomycélium* et des *blastophores*, dans les milieux de culture appropriée on peut voir se développer des *chlamydospores*, c'est-à-dire des spores asexuées capables de résister aux conditions environnementales défavorables [103].

IV-6-3. *Citrobacter*

Les bactéries du genre *Citrobacter* sont des bacilles droits appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ils sont de coloration de Gram négatif et leurs réservoirs naturelles sont : Eau, égouts, aliments, tube digestif de l'humain et des animaux [104].

Les souches du genre *Citrobacter* sont constituées de bacilles droits, isolés ou groupés en paire, d'environ 1,0 µm de diamètre sur 2,0 à 6,0 µm de longueur et présentant les caractères généraux de la famille des *Enterobacteriaceae*.

Classiquement, le genre *Citrobacter* rassemblait des entérobactéries mobiles, capables d'utiliser le citrate de sodium comme unique source de carbone.

Ces Pathogènes opportunistes associent aux infections nosocomiales; causent la diarrhée et des infections secondaires chez les sujets immunocompromis et, à l'occasion, une septicémie primaire grave; *C. koseri* est associé à la méningite chez les nourrissons âgés <2 mois [105].

IV-6-4. *Shigella*

Genre de bactérie appartenant à la famille des entérobactéries et à l'espèce *Escherichiae*, constitué de bacille (bactérie en forme de bâtonnet) mis en évidence par la coloration Gram-. On distingue quatre espèces de *Shigella*: *dysenteriae*, *sonnei*, *flexneri*, *boydii*.

Shigella se caractérise par la présence de l'antigène somatique de surface O et par son mode de fermentation des hydrates de carbone (sucres).

D'autre part, les *Shigella* ont une capacité à envahir les cellules recouvrant l'intestin et à provoquer des infections et des maladies chez l'homme même en quantité très faible (quelques centaines à quelques milliers de micro-organismes) [106].

Les *Shigelles* sont des bâtonnets immobiles, courts et gram (-), de 2 à 3 µm de long sur 0.5 à 0.7 de large, mais animés de mouvements pendulaires. Leur température optimale de croissance est de 37°C en milieu aérobie.

Les *Shigella* sont pathogènes uniquement pour l'homme et les autres primates. Les humains constituent leur réservoir naturel. La période d'incubation varie de 12 heures à 7 jours (plus généralement 4 jours au plus) [107].

Habituellement, les symptômes d'une infection par *Shigella* apparaissent 1 à 3 jours suivant la consommation de l'aliment ou de la boisson contenant la bactérie (mais peuvent apparaître jusqu'à 7 jours après); et peuvent durer de 5 à 7 jours [108].

Ces symptômes sont : Fièvre, Nausée, Vomissements, Douleur abdominale, Crampes abdominales, Diarrhée (souvent accompagnée de sang).

IV-6-5. *Staphylocoques aureus*

Bactérie appartenant à la famille des Micrococcaceae (les staphylocoques), présentant une forme arrondie (coccus) et mis en évidence par la coloration gram +, non sporulé. La staphylococcie est le nom générique des maladies qui sont dues à une infection par staphylocoque. La staphylococcémie est l'infection générale secondaire à la présence de staphylocoque dans le sang.

Les staphylocoques se présentent comme des germes immobiles, et se caractérisent par leur regroupement rappelant celui des grains d'une grappe de raisins. Les staphylocoques sont des bactéries qui colonisent très largement la peau et les muqueuses (couche de cellules recouvrant l'intérieur des organes creux). Ils sont responsables d'infections diverses superficielles ou profondes, mais également d'intoxications et d'infections urinaires [109].

Les symptômes de l'intoxication à staphylocoques sont:

- Altération de l'état général et Fièvre élevée,
- Nausées ou vomissements,
- Douleurs abdominales et musculaires,
- Mal de gorge, Diarrhée et Céphalées (maux de tête),
- Apparition d'une plaque rouge caractéristique, apparaissant dans les deux

jours après le début de la maladie et susceptible de se généraliser. Quelquefois, elle est confinée à une seule zone

IV-6-6. *Streptocoques*

Les *streptocoques* sont des bactéries de forme arrondie, disposées en chaînette, et qualifiées de gram positif. Les variétés les plus souvent retrouvées chez l'homme sont le *streptocoque pneumoniae* (ou *pneumocoque*), et l'*entérocoque* [110].

Certains *streptocoques* (sont relativement nombreux) font partie de la flore normale d'un individu c'est-à-dire de l'ensemble des bactéries qui vivent habituellement à l'intérieur ou sur le corps humain. En effet, les *streptocoques* colonisent habituellement et normalement les poumons, le tube digestif, l'appareil urinaire et génital [110].

Les infections les plus connus du public, liées aux *streptocoques*, sont :

- La pharyngite qui est le résultat d'une infection par un *streptocoque A* ou *streptocoque pyogène*. Il s'agit de l'une des infections bactériennes les plus fréquentes concernant les enfants d'âge scolaire.
- Le rhumatisme articulaire aigu et la glomérulonéphrite post-streptococcique est le résultat d'une infection par un *streptocoque A* également.
- Certaines infections urinaires sont le résultat d'une infection par un *entérocoque*.
- Les septicémies et les méningites du nouveau-né sont dues à une infection par un *streptocoque* du groupe B ou *streptocoque agalactiæ*. Les endométrites et la fièvre des parturientes sont également liées à une infection par ce type de *streptocoque*.
- Les maladies nosocomiales (à cause d'une hospitalisation) et plus précisément des bactériémies (présence de bactéries dans le sang) et les endocardites sont dues à une infection par un *entérocoque*.
- Les endocardites bactériennes sont le résultat d'une infection par un *streptocoque viridans* le plus fréquemment.

- CHAPITRE – I –

CARACTÉRISATIONS CHIMIQUES ET ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIOXYDANTE

I-1. INTRODUCTION

Le but de cette étude est d'essayer de valoriser *Ampelodesma mauritanica*, en déterminant sa composition chimique, et en évaluant l'activité antioxydante de ces différents extraits; méthanolique, butanolique et l'extrait de l'acétate d'éthyle.

Ainsi, nous avons débuté notre travail expérimental par un screening phytochimique de la plante, puis une évaluation de l'activité antioxydante par différentes méthodes: DPPH, ABTS, PPM.

Cette étude est réalisée au laboratoire de chimie organique appliquée de l'Université BADJI Mokhtar –Annaba, l'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre : **Perkin Elmer (Model Lambda 3B UV-VIS)**.

I-2. PRÉPARATION DU MATERIEL VÉGÉTAL

La plante est cueillie dans la région d'Annaba (Séraïdi). La récolte a été effectuée vers la fin du mois de septembre 2010. L'identification a été réalisée par les botanistes du Département de Biologie (Université Badji Mokhtar-Annaba). Une fois les racines et les feuilles sont isolées, elles sont mises dans un endroit sec et à l'abri de la lumière afin de les sécher, et puis elles sont broyées. La poudre végétale obtenue est conservée à l'abri de la lumière dans des flacons en verre hermétiquement fermées.

I-3. SCREENING PHYTOCHIMIQUE

Le screening phytochimique a été réalisé selon la méthode classique de Harborne [33]. Les différents protocoles pour chaque famille de produits sont décrits ci-dessous. Les résultats de ces screening sont récapitulés dans le tableau 06.

I-3-1. Alcaloïdes

On prend 2g de matériel végétal et on ajoute 40ml de HCl 1%, on laisse le mélange pendant 2 heures. Après filtration, on ajoute au filtrat, le réactif de Mayer (quelques gouttes). L'apparition d'un précipité blanc indique la présence des alcaloïdes.

I-3-2. Flavonoïdes

Macérer 2g de matériel végétal dans 40ml de HCl dilue 1% pendant 24h. Filtrer 2ml du filtrat est rendu basique par l'ajout de NH_4OH .

L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

I-3-3. Tanins

Prendre 2g de matériel végétal, les macérer pendant 2 heures dans du $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ à 1%. Filtrer puis ajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 2% (2g FeCl_3 dans 100ml de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

L'apparition d'une couleur verte indique la présence des tanins.

I-3-4. Saponines

On prend 2g de matériel végétal dans 50ml de H_2O , on chauffe jusqu'à ébullition puis on filtre le mélange et on laisse refroidir.

Quelques millilitres du filtrat sont mis dans un tube à essais puis on agite fortement.

L'apparition d'une mousse qui persiste quelques secondes indique la présence des saponines.

I-3-5. Cardenolides

Macérer 2g de matériel végétal dans 40ml d'eau distillée pendant 2 heures. Filtrer et prélever 5ml du filtrat, l'extraire avec un mélange de 5ml de CHCl_3 et de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Evaporer la phase organique et dissoudre le précipité dans 1,5ml de CH_3COOH .

Ajouter quelques gouttes de FeCl_3 suivi de 0,5ml de H_2SO_4 concentré.

Sur les parois du tube à essai, l'apparition d'une couleur vert-bleu dans la phase d'acide indique la présence des cardénolides.

I-3-6. Stérols et terpènes

Prendre 2g de matériel végétal dans 30ml d'éther de pétrole ou du toluène, pendant une heure. Filtrer et évaporer; le résidu obtenu est dissout dans 0,5ml d'acide acétique et 0,5ml de CHCl_3 .

Les deux phases sont transférées dans un tube à essai puis 1ml de H_2SO_4 concentré est ajouté. Dans la zone de contact entre les 2 liquides un cercle violet ou marron est formé puis il devient gris, ce qui indique la présence des stérols et terpènes.

Les résultats du screening phytochimique des deux parties de la plante sont récapitulés dans le tableau suivant :

Tableau 06: Screening phytochimique des racines et des feuilles d'*Ampelodesma mauritanica*.

Métabolites secondaires	Alcaloïdes	Flavonoïdes	Saponines	Tanins	Cardénolides	Stérols et terpènes
Racines	–	++	++	–	+	–
Feuilles	–	++	+++	+	+	+

- (+ + +) : test franchement positif.
- (+ +) : test positif.
- (+) : test moyennement positif.
- (–) : test négatif.

D'après ces tests phytochimiques, on s'aperçoit que les deux parties de *Ampelodesma mauritanica* (partie aérienne et racine) sont riches en saponines et en flavonoïdes.

Une présence, en quantité minime, des cardénolides est aussi observée dans les deux parties.

On remarque aussi la présence des tanins, des stérols et des terpènes dans la partie aérienne et l'absence totale d'alcaloïdes des deux parties de la plante.

I-4- EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE

L'activité antioxydante a été évaluée par trois méthodes différentes : Le test DPPH, le test ABTS et le test PPM.

I-4-1. Préparation de l'extrait de *Ampelodesma mauritanica*

On met 5g de la poudre végétale dans 50 ml du solvant et on laisse macérer pendant 24h dans l'obscurité, puis on filtre. L'extrait obtenu est conservé à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation.

L'extraction est faite avec quatre solvants organiques de polarités différentes : le méthanol, le butanol, le chloroforme et l'acétate d'Ethyle.

Ces extraits sont utilisés par les trois méthodes exploitées pour évaluer l'activité antioxydante.

I-4-2. Protocole du test DPPH

L'extrait de la plante (0,1ml) est ajouté à 2,9 ml de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) à 0,04 g/l dans une solution de méthanol-eau (80:20). La lecture est faite à 517 nm, après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité. Un blanc constitué de 2,9 ml de la solution de DPPH et 0,1ml de méthanol accompagne la lecture de chaque série.

L'acide ascorbique (vitamine C) est utilisé comme étalon. La solution radicalaire est préparée fraîchement.

Toutes les mesures sont reproduites au moins trois fois afin de minimiser les erreurs.

Une courbe d'étalonnage est tracée dans la figure 16 en utilisant des solutions de vitamine C de concentration allant de 0 à 30 mg/l (Tableau 07).

Tableau 07: Variation de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions standards de la vitamine C (Test DPPH).

C (mg/l)	A1	A2	A3	A moy
0	0,414	0,411	0,418	0,414
5	0,381	0,383	0,379	0,381
10	0,367	0,366	0,359	0,364
20	0,31	0,301	0,308	0,306
30	0,285	0,275	0,278	0,279

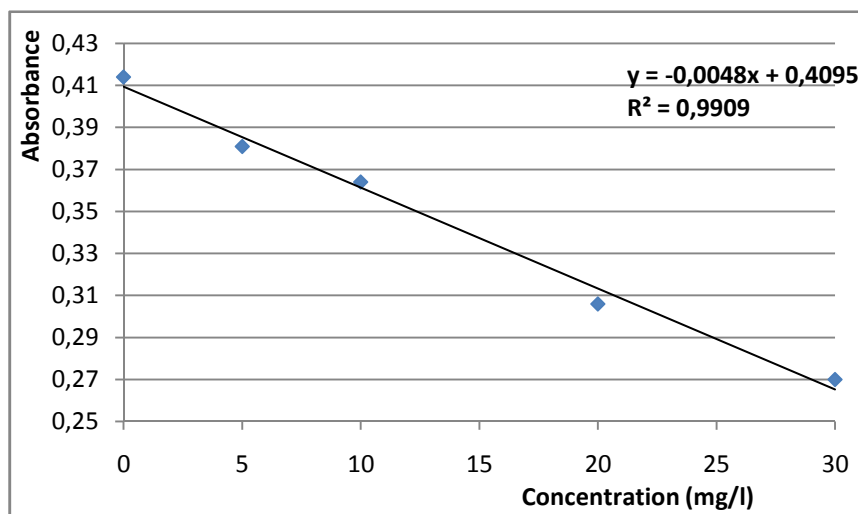


Figure 16 : Courbe d'étalonnage de la vitamine C (Test DPPH).

Avec $r = -0,9954$; $a = -0,0048$; $b = 0,4095$

Tels que : Absorbance = $a \cdot C + b$; r est le coefficient de corrélation.

I-4-3. Protocole du test ABTS

Une solution de 7 mmol d'ABTS (Acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) réagit avec 2,45 mmol de $K_2S_2O_8$ conservée entre 12 et 16 heures dans l'obscurité pour avoir une couleur sombre contenant les radicaux $ABTS^{\bullet}$. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde maximale de 734 nm. Cette solution mère est diluée avec le méthanol pour avoir une absorbance finale égale à $0,70 \pm 0,02$.

L'extrait de plante (0,1ml) est ajouté à 4,9 ml de la solution radicalaire d'ABTS. Le mélange est incubé à 37 °C dans un bain marie à l'abri de la lumière pendant 20 mn à 37°C. Un contrôle constitué de 0,1ml de méthanol et de 4,9 ml de la solution d'ABTS est lu avec chaque série d'extrait à 734 nm. La capacité antioxydante totale des extraits de plante ainsi déterminée est exprimée en mg de vitamine C équivalent (mg VCE) par 100g de matière sèche. La solution radicalaire d'ABTS est préparée fraîchement. Tous les tests sont reproduits au moins trois fois.

La courbe d'étalonnage est représentée par la figure 17 en utilisant les valeurs condensées dans le tableau 08.

Tableau 08: Variation de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions standards de la vitamine-C (Test ABTS).

C (mg/l)	A1	A2	A3	A moy
60	0,573	0,568	0,569	0,570
80	0,494	0,482	0,51	0,495
100	0,385	0,381	0,387	0,384
120	0,319	0,316	0,329	0,321
140	0,247	0,245	0,248	0,247

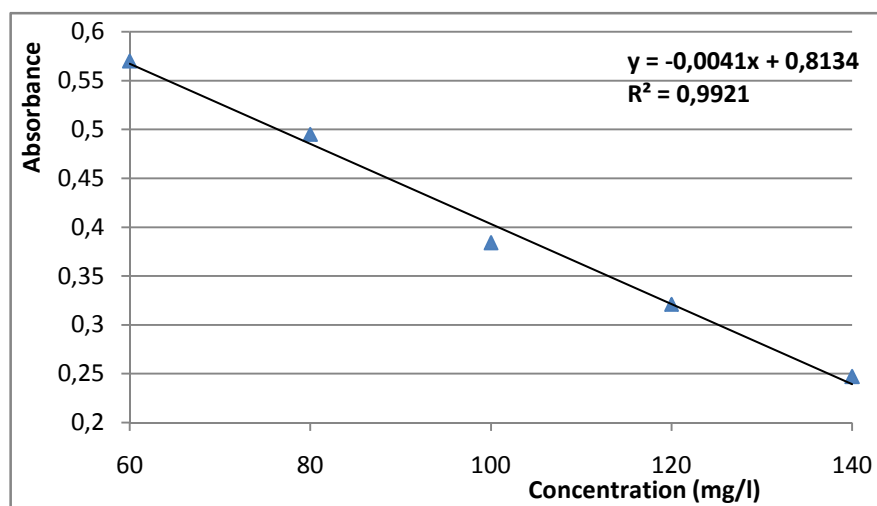


Figure 17: Courbe d'étalonnage de la vitamine C (Test ABTS).

Avec $r = -0,9960$; $a = -0,0041$; $b = 0,8134$

Tels que : Absorbance = $a \cdot C + b$; r est le coefficient de corrélation.

I-4-4. Protocole du test PPM

0,1 ml de l'extrait est mélangé avec 1 ml de la solution du réactif (0,6 M H_2SO_4 + 28 mM Na_2HPO_4 + 4 mM de molybdate d'ammonium).

Les tubes sont bien fermés avec du papier aluminium puis incubés à 95 °C pour une durée de 1h30 min. Après refroidissement à une température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc constitué de 0,1 ml de méthanol et 1 ml de réactif.

Tous les tests sont reproduits au moins trois fois.

Une courbe d'étalonnage est tracée en utilisant des solutions de vitamine C de concentration allant de 60 à 360 mg/l (Tableau 09). La droite obtenue est représentée par la figure 18.

Tableau 09: Variation de l'absorbance en fonction des concentrations des solutions standards de la vitamine-C (Test PPM).

C (mg/l)	A1	A2	A3	A moy
60	0	0	0	0,000
80	0,049	0,037	0,03	0,039
100	0,092	0,06	0,058	0,070
120	0,134	0,146	0,139	0,140
140	0,179	0,185	0,201	0,188
160	0,255	0,245	0,243	0,248
180	0,295	0,287	0,279	0,287
200	0,315	0,321	0,316	0,317
220	0,34	0,35	0,365	0,352
240	0,41	0,421	0,402	0,411
260	0,473	0,452	0,485	0,470
280	0,533	0,523	0,524	0,527
300	0,611	0,599	0,609	0,606
320	0,675	0,68	0,679	0,678
340	0,755	0,765	0,759	0,760
360	0,839	0,839	0,845	0,841

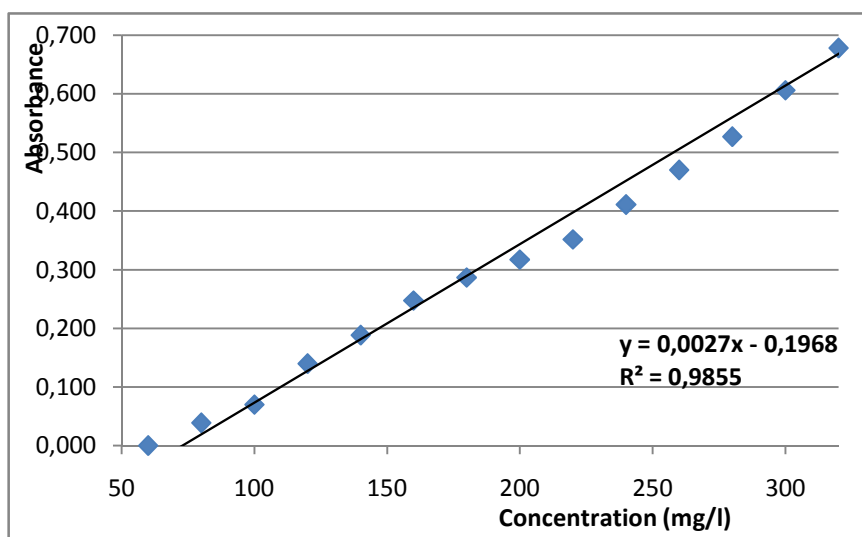


Figure 18: Courbe d'étalonnage de la vitamine C (Test PPM).

Avec $r = -0,9927$; $a = 0,0027$; $b = -0,1968$

Tels que : Absorbance = $a \cdot C + b$; r est le coefficient de corrélation.

I.5. Résultats et Discussion

En se basant sur les valeurs d'absorbance des solutions d'extrait (extrait de la partie aérienne et extrait des racines), ayant réagi, et comparées à la solution étalon en vitamine C comme décrit ci-dessus, les résultats de l'activité antioxydante déterminée à l'aide des tests d'ABTS, DPPH et PPM sont résumés dans le tableau 10 et sont représentés par les figures 19 et 20 où l'activité antioxydante est exprimée en milligramme équivalents de la vitamine C (mg VCE). Ces résultats se rapportent à 100 gramme de matière sèche et les valeurs représentent les moyennes de trois mesures $\pm$ déviation standard.

Tableau 10 : Résultats de l'activité antioxydante des extraits de la partie aérienne et des racines de *Ampelodesma mauritanica*.

	VCE (mg/100 g de M.S) - Partie aérienne -			VCE (mg/100 g de M.S) - Racines -		
	DPPH	ABTS	PPM	DPPH	ABTS	PPM
Extrait du Méthanol	68 $\pm$ 1,04	509 $\pm$ 4,390	1263 $\pm$ 1,48	27 $\pm$ 0,830	405 $\pm$ 1,220	827 $\pm$ 4,070
Extrait du n-Butanol	31 $\pm$ 0,42	461 $\pm$ 3,66	1203 $\pm$ 8,52	19 $\pm$ 0,830	374 $\pm$ 1,950	779 $\pm$ 3,100
Extrait d'Acétate d'Ethyle	28 $\pm$ 8,75	279 $\pm$ 0,73	681 $\pm$ 4,44	6 $\pm$ 0,630	281 $\pm$ 1,460	499 $\pm$ 2,220
Extrait du Chloroforme	4 $\pm$ 1,04	296 $\pm$ 1,71	721 $\pm$ 2,22	2 $\pm$ 1,040	226 $\pm$ 1,220	394 $\pm$ 1,480

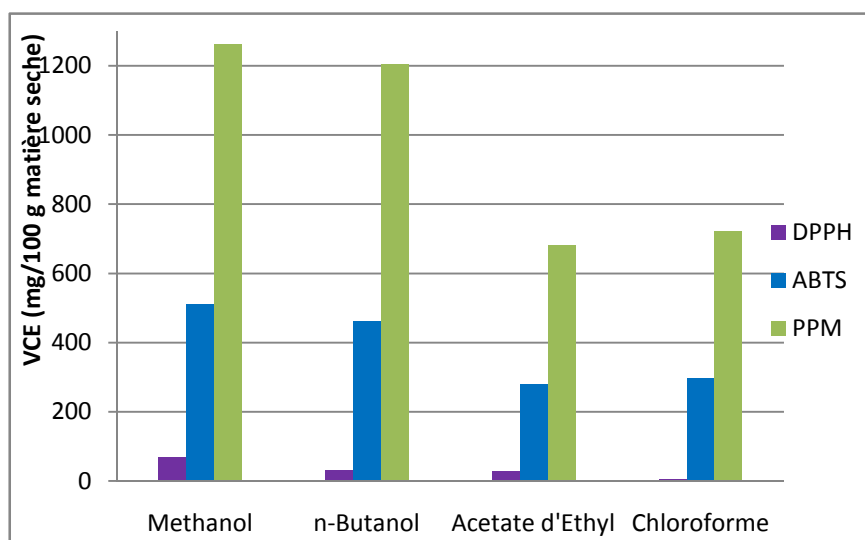


Figure 19 : Capacité antioxydante des extraits de la partie aérienne de l'*Ampelodesma mauritanica* exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et PPM.

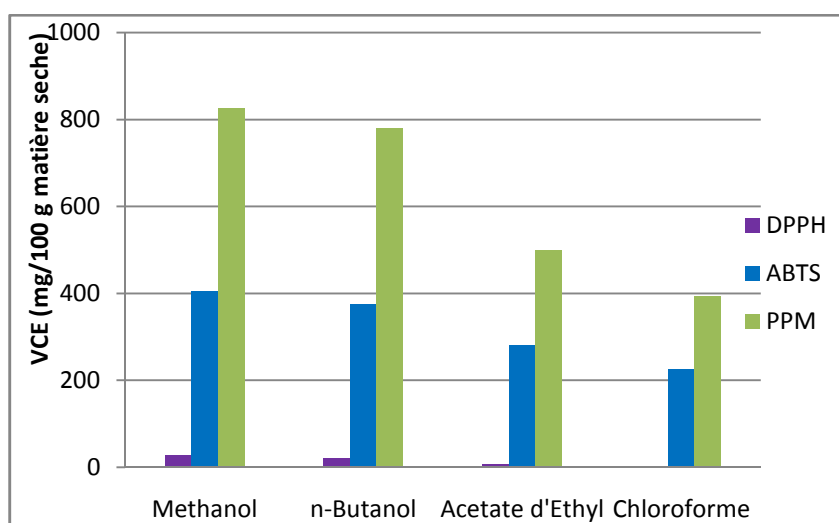


Figure 20 : Capacité antioxydante des extraits des racines de l'*Ampelodesma mauritanica* exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et de PPM.

Comme on peut le voir, d'après ces résultats, tous les extraits des différentes parties de la plante, exhibent une activité antioxydante ; la plus grande valeur de cette activité est observée dans le cas du test PPM de l'extrait méthanolique de la partie aérienne (1263 mg/100g de matière sèche). En effet, on s'aperçoit que les extraits au méthanol donnent les

plus grandes valeurs de l'activité antioxydante et que les extraits au chloroforme donnent les plus faibles valeurs.

L'examen de ces résultats, montrent aussi que le test du DPPH donne la plus faible valeur dans les deux parties de la plante et pour les différents extraits. Cette sous estimation de la capacité antioxydante par le test du DPPH est aussi observé par Kim et al. [111] et par Arnao [112], elle s'expliquerait par les interférences qui se produiraient à 517 nm et par la non solubilité du DPPH en milieu aqueux.

De plus, nous avons constaté que la partie aérienne de la plante présente une capacité antioxydante plus élevée que celle des racines.

Les figures suivantes confirment ces constatations.

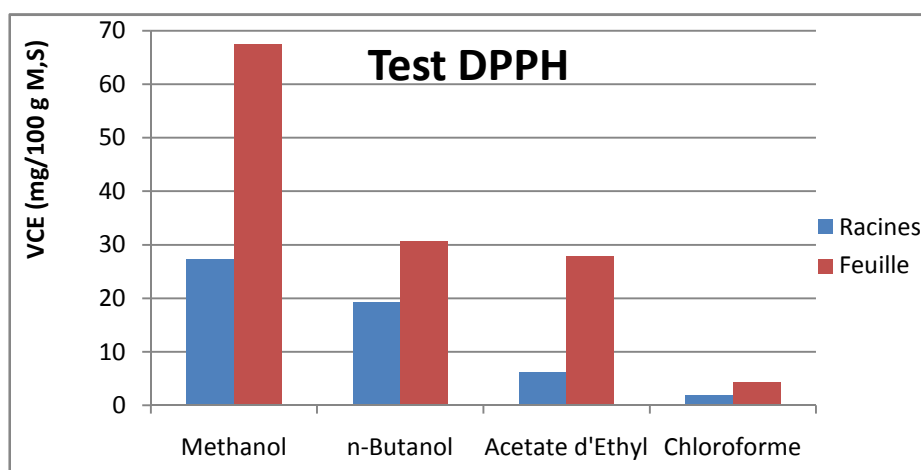


Figure 21 : Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon le test DPPH.

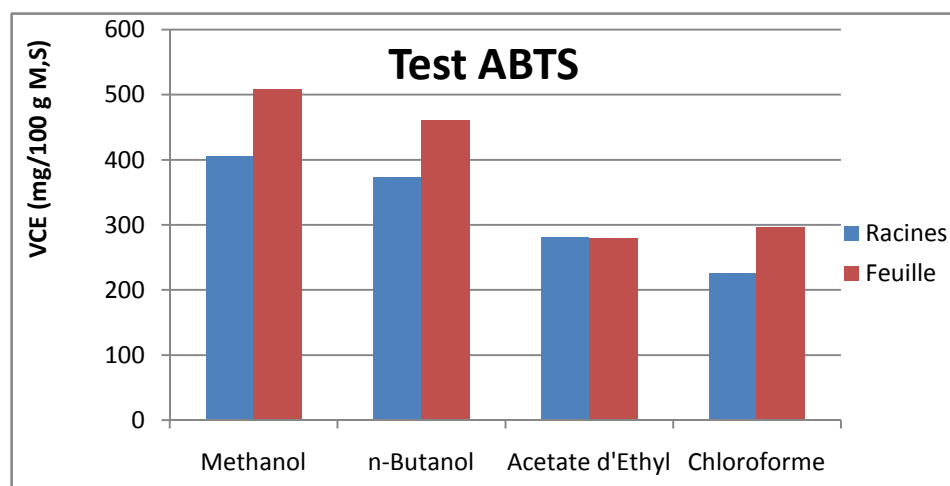


Figure 22 : Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon le test d'ABTS.

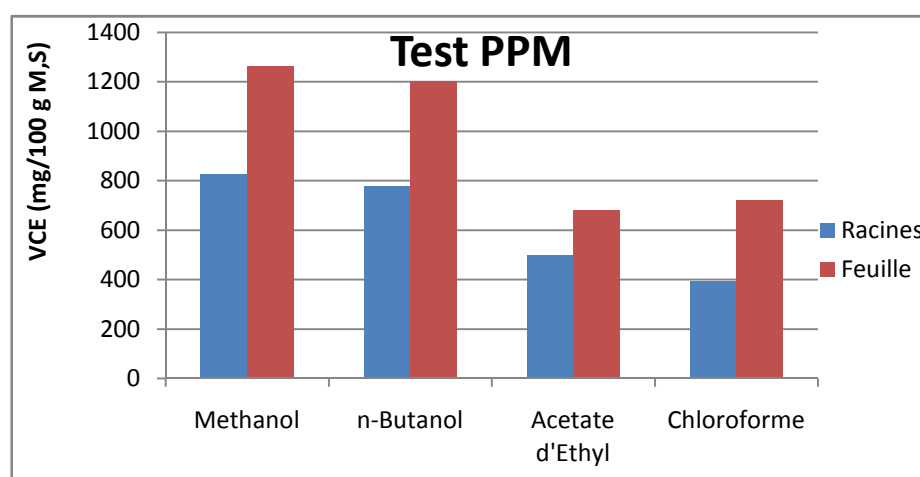


Figure 23 : Capacité antioxydante exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon le test PPM.

Une étude complémentaire a été effectuée sur l'activité antioxydante des extraits de *Ampelodesma mauritanica* provenant des solutions de méthanol-eau à différentes proportions.

Les résultats de cette étude sont regroupés dans le tableau 11 et sont présentés par les figures 24 et 25.

Tableau 11 : Résultats de l'activité antioxydante des différents extraits méthanol/eau de la plante.

Extrait (MeOH / H ₂ O)	VCE (mg/100 g de M.S) - Partie aérienne -			VCE (mg/100 g de M.S) - Racines -		
	DPPH	ABTS	PPM	DPPH	ABTS	PPM
100 / 0	68 ± 1,04	509 ± 2,44	1263 ± 1,48	27 ± 0,83	405 ± 1,22	827 ± 4,07
90 / 10	76 ± 2,50	561 ± 0,73	1330 ± 3,33	43 ± 2,08	423 ± 1,46	851 ± 3,70
80 / 20	123 ± 1,67	706 ± 2,68	1724 ± 10,37	101 ± 1,25	481 ± 1,95	950 ± 1,48
70 / 30	236 ± 2,29	772 ± 2,93	1871 ± 2,22	129 ± 1,46	522 ± 1,46	1265 ± 4,81
60 / 40	114 ± 2,08	678 ± 0,76	1670 ± 16,67	92 ± 0,83	471 ± 0,49	979 ± 6,66
50 / 50	106 ± 1,87	599 ± 3,41	1393 ± 3,70	29 ± 1,25	407 ± 0,24	850 ± 2,96
40 / 60	93 ± 2,29	576 ± 0,73	1320 ± 1,85	13 ± 2,92	379 ± 1,22	816 ± 3,33

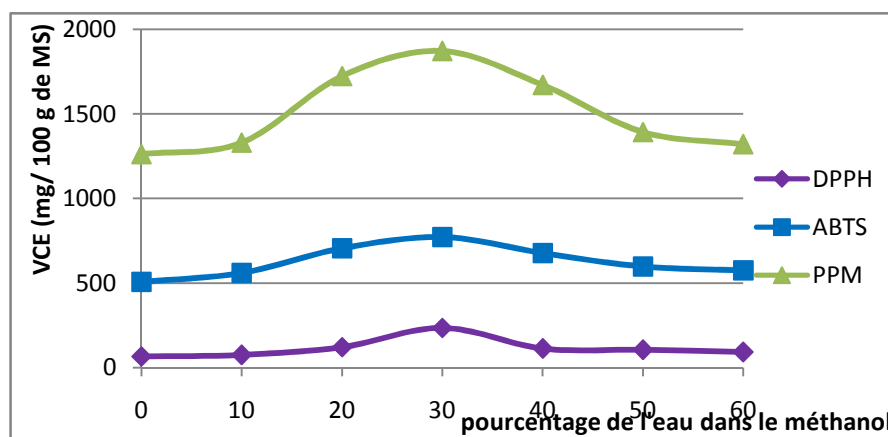


Figure 24 : Capacité antioxydante des extraits de méthanol/eau de la partie aérienne exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et de PPM.

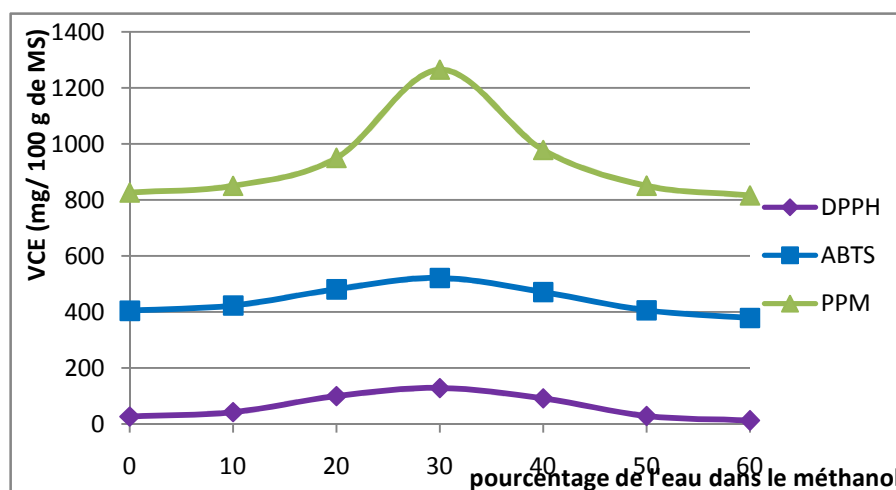


Figure 25 : Capacité antioxydante des extraits de méthanol/eau des racines exprimée en vitamine C (mg VCE / 100g de matière sèche) selon les tests d'ABTS, DPPH et de PPM.

On observe que pour les deux parties de la plante, la proportion du méthanol/eau qui donne la capacité antioxydante la plus élevée est toujours la proportion (70/30) quelque soit le test utilisé.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que cette dernière proportion de la solution méthanol/eau, extrait le mieux possible, les polyphénols et en l'occurrence les flavonoïdes, responsables de l'activité antioxydante des plantes.

En fin, on peut dire que l'étude de l'activité antioxydante de *Ampelodesma mauritanica* a montré le potentiel scavenger de radicaux libres de cette plante qui pourrait être considérée comme source d'antioxydants naturels. L'activité antioxydante observée serait due à leur teneur élevée en polyphénols totaux et flavonoïdes totaux.

- CHAPITRE – II –

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE ET ANTIFONGIQUE

II-1. TEST DE DIFFUSION DU DISQUE (ANTIBIOGRAMME)

L'activité antibactérienne des extraits de la plante à été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion du disque [113].

A partir des souches conservées, on fait l'enrichissement dans le bouillon cœur-cerveille (BHIB : Brain Heart Infusion broth) avec incubation de 18 à 24 h à 37°C où le bouillon devient trouble. On prend une goutte de ce dernier et on fait un réisolement sur la gélose Nutritive (GN) par la méthode d'ensemencement sur les quatre cadrans avec incubation de 18 à 24 h à 37°C.

On prend une colonie ou deux isolées et uniformes et on prépare un inoculum dans l'eau physiologique stérile, puis on fait l'ensemencement sur Mueller-Hinton (MH) à l'aide d'un écouvillon (ou tige de coton).

On impose les discs du papier Buvard de 6 mm de diamètre qui contient 20 µl du l'extrait dissout dans le DMSO sur la surface de la gélose MH (6 disques au maximum par boîte) avec incubation de 18 à 24 h à 37°C.

Des disques imprégnés de DMSO (20 µl) servant de témoin négatif, ont aussi été déposés sur la surface de la gélose inoculée.

L'apparition d'une zone claire autour des disques (à l'intérieur de laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée) indique l'action antibactérienne de l'extrait de la plante vis-à-vis la souche bactérienne testée et les bactéries seront classées selon le diamètre d'inhibition dans l'une des catégories suivantes: résistance, sensibilité limitée, sensibilité moyenne et très sensible comme le montre le tableau 12 :

Tableau 12 : Sensibilité et degré d'activité selon le diamètre d'inhibition [114].

Diamètre d'inhibition	≤ 8 mm	8 à 14 mm	14 à 20 mm	≥ 20 mm
Sensibilité du germe	Résistante	Sensibilité limitée	Sensibilité moyenne	Très sensible
Degré d'activité	(-)	(+)	(++)	(+++)

II-2. SOUCHES PATHOGÈNES UTILISÉES

Les tests biologiques sont réalisés auprès du laboratoire de microbiologie de l'hôpital d'El-Harrouche – SKIKDA. Les germes pathogènes utilisés dans notre étude ont été obtenus au même laboratoire, sont les suivants :

- *Streptocoques* (conservées le : 20/04/2011)
- *E. Coli* ATCC 25922
- *Citrobacter* (conservé le : 20/04/2011 – 9034)
- *Candida albicans* (conservé le : 27/04/2011 – 9916)
- *Staphylocoques aureus* (conservé le : 20/04/2010 – 8805)
- *Shigella* (conservé le : 11/10/2009 – 7678 CPS II)

L'activité antibactérienne des extraits de *l'Ampelodesma mauritanica* a été évaluée donc sur deux souches bactériennes gram-positif : *S. aureus*, et *Streptococcus* et trois souches gram-négatif : *E. coli*, *Shigella* et *Citrobacter* ainsi que sur une levure : *Candida albicans*.

II-3. PRÉPARATION DES EXTRAITS

On s'est intéressé à l'activité antibactérienne de trois extraits : extrait méthanolique, butanolique et l'extrait de l'acétate d'éthyle des deux parties de la plante (partie aérienne et racines).

a- Préparation de l'extrait méthanolique

20 grammes de matière végétale est macérée dans 100 ml de méthanol pendant 24 h sous agitation. Après filtration du mélange, le solvant est chassé sous vide, la masse obtenue est stockée à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'au moment de son utilisation, on a obtenu un rendement de **8.51 %** pour les feuilles et **7.41%** pour les racines.

b- Préparation des extraits butanolique et Acétate d'éthyle

Des extractions successives avec des solvants organiques de polarité croissante sont réalisées sur 20 g de matériel végétal. Après macération sous agitation, le mélange est filtré, le marc est récupéré et l'opération est renouvelée afin de réaliser trois épuisements pour chaque solvant que nous avons gardés séparément, les phases sont évaporées à sec à

l'aide du Rotavapor et les masses obtenues sont stockées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à la mise en marche des tests.

Les rendements des extractions sont condensés dans le tableau 13:

Tableau 13 : *les rendements des extractions.*

	Rdt (%) des Feuilles	Rdt (%) des Racines
Extrait butanolique	02,74	02,18
Extrait d'acétate d'éthyle	01,50	01,54

Le schéma de la figure suivante résume les étapes des extractions liquide–liquide à polarité croissante :

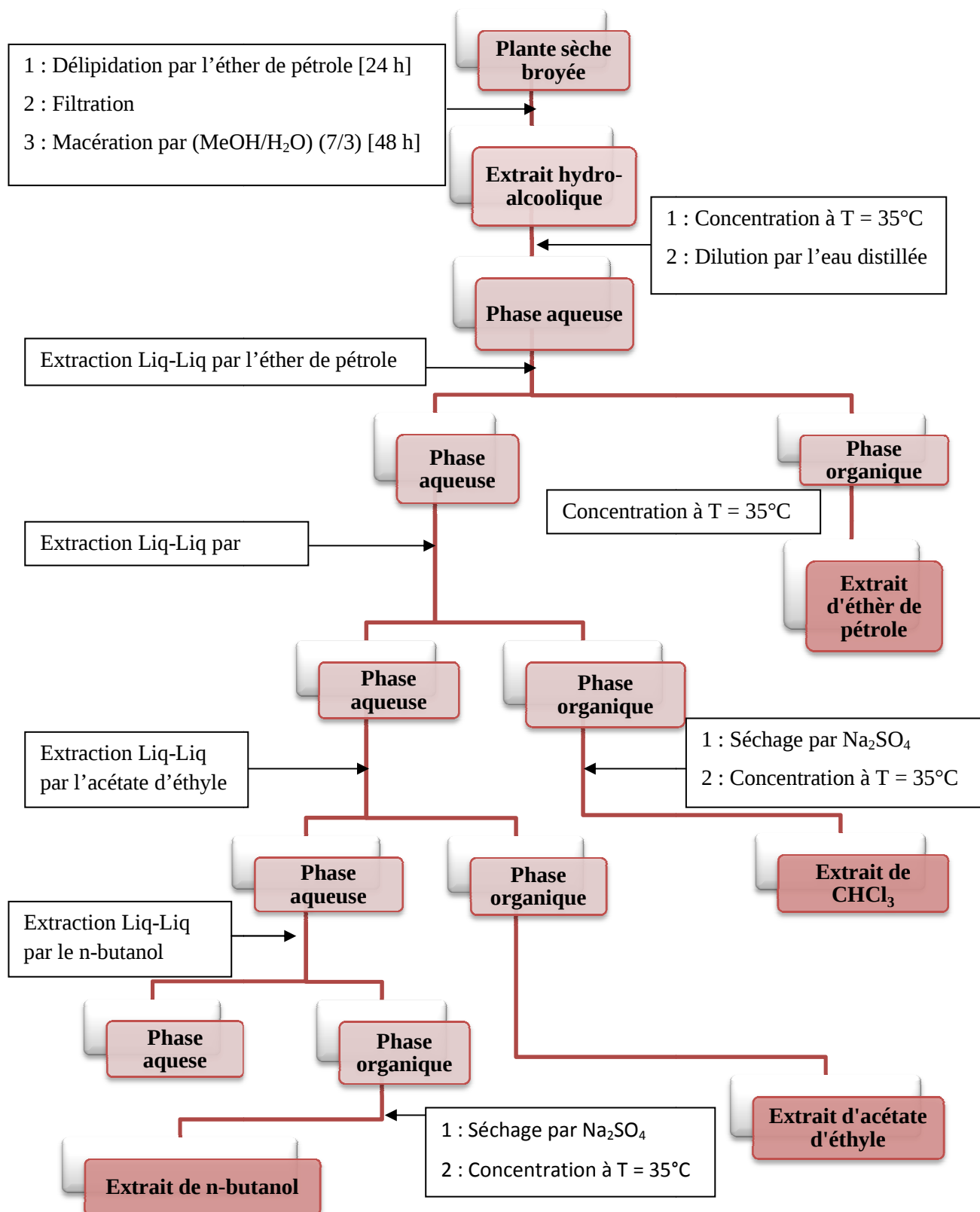


Figure 26: Protocole d'extraction classique des flavonoïdes.

II-4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats de l'activité antibactérienne des différents extraits sont condensés dans les tableaux 14 et 15.

Tableau 14: *Activité antibactérienne des extraits des feuilles par la méthode de diffusion du disque.*

Extrait des Feuilles en (mg/ml) dans le DMSO		Diamètre d'inhibition en mm					
		<i>Citrobacter</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Shigella</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Streptocoques</i>	<i>Staphylocoque aureus</i>
Extrait méthanolique	10	16	17	20	08	16	12
	5	10	-	-	-	12	09
	2	-	-	-	-	-	-
Extrait butanolique	10	18	12	20	-	16	16
	5	13	-	-	-	13	11
	2	-	-	-	-	-	-
Extrait d'acétate d'éthyle	10	21	15	15	07	21	07
	5	17	11	07	-	18	-
	2	-	-	-	-	-	-

Tableau 15: *Activité antibactérienne des extraits des racines par la méthode de diffusion du disque.*

Extrait des racines en (mg/ml) dans le DMSO		Diamètre d'inhibition en mm					
		<i>Citrobacter</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Shigella</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Streptocoques</i>	<i>Staphylocoque aureus</i>
Extrait méthanolique	10	13	-	17	-	14	13
	5	08	-	-	-	12	-
	2	-	-	-	-	-	-
Extrait butanolique	10	12	14	12	-	15	-
	5	-	-	07	-	11	-
	2	-	-	-	-	-	-
Extrait d'acétate d'éthyle	10	23	20	24	11	24	08
	5	09	-	08	-	20	-
	2	-	-	-	-	-	-

En observant ces résultats, on s'aperçoit que pour la plus faible concentration à savoir 2 mg/ml, tous les extraits des deux parties de la plante sont inactifs et ne manifestent aucune activité bactérienne sur l'ensemble des microorganismes étudiés.

En ce qui concerne les deux autres concentrations, 5 et 10 mg/ml, on remarque d'une manière générale, une inhibition de la poussée des souches bactériennes (gram+, gram – et levure) avec des diamètres différents.

L'Escherichia coli apparaisse la souche la plus résistante :

- Elle présente une sensibilité limitée pour l'extrait d'acétate d'éthyle des racines avec un diamètre d'inhibition qui ne dépasse pas les 11mm pour la concentration de 10 mg/ml.
- Une résistance aux extraits de méthanol et d'acétate d'Ethyle des feuilles avec une zone d'inhibition de 8 et 7 mm respectivement.
- Elle est totalement inactive vis-à-vis de l'extrait butanolique des deux parties de la plante (partie aérienne et racines) et ceci avec les trois concentrations testées.

Concernant le *Candida albicans* qui est la seule levure testées dans notre étude, on observe qu'il présente une sensibilité limitée ou moyenne vis à vis tous les extraits (le diamètre d'inhibition varie entre 11 et 20 mm) à l'exception de l'extrait méthanolique des racines, qui ne présente aucune activité inhibitrice.

L'extrait d'acétate d'éthyle des racines présente une activité antibactérienne intéressante sur l'ensemble des bactéries avec un diamètre d'inhibition de 23, 24 et 24 mm pour *Citrobacter*, *Shigella*, et *Streptococcus* respectivement.

L'ensemble des extraits étudiés montrent une modeste activité antibactérienne sur *Staphylococcus aureus* avec un diamètre d'inhibition qui varie entre 7 et 16 mm.

Quelques unes ces observations sont illustrées par les photos 03 à 06.



-A-



-B-

Photo 03 : *Effet inhibiteur des extraits sur Candida albicans*
(A : Extrait des feuilles ; B : Extrait des racines).



-A-



-B-

Photo 04 : *Effet inhibiteur des extraits sur Citrobacter*
(A : Extrait des feuilles ; B : Extrait des racines).



-A-



-B-

Photo 05 : *Effet inhibiteur des extraits sur Staphylocoques aureus*
(A : Extrait des feuilles ; B : Extrait des racines).



-A-



-B-

Photo 06 : *Effet inhibiteur des extraits sur Streptocoques*
(A : Extrait des feuilles ; B : Extrait des racines).

Les histogrammes suivants récapitulent tous les résultats de l'évaluation de l'activité antibactérienne pour les différents extraits de *Ampelodesma mauritanica* :

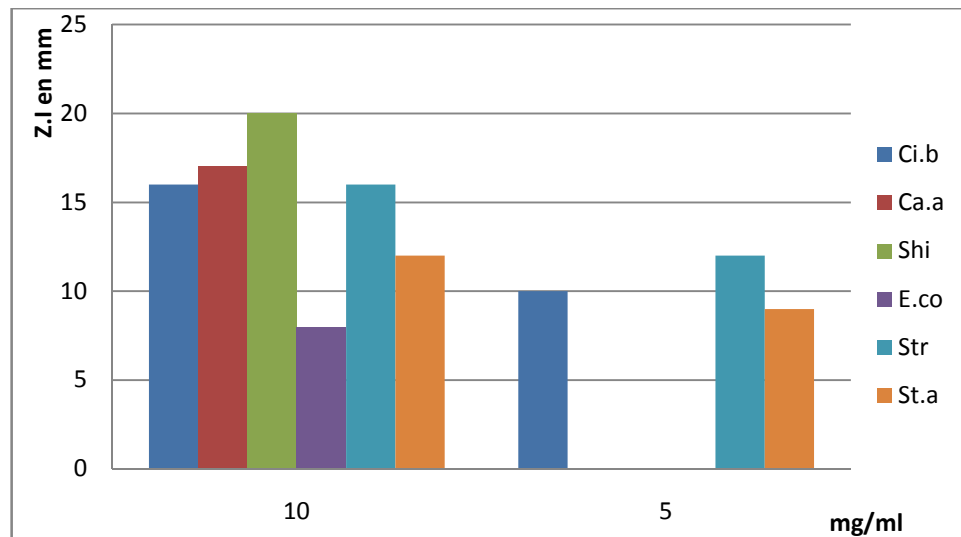


Figure 27 : Effet inhibiteur de l'extrait méthanolique des feuilles sur quelques micro-organismes.

Légende : Ci. b : *Citrobacter* ; Ca. a: *Candida albicans* ; Shi : *Shigella* ; E. co: *Escherichia coli* ; Str : *Streptocoques* ; St. a : *Staphylococcus aureus*

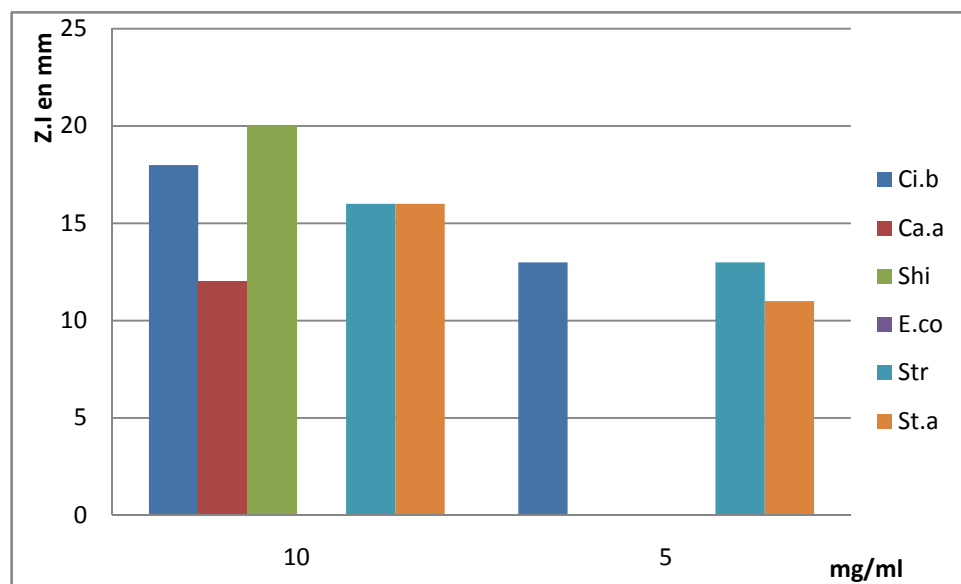


Figure 28 : Effet inhibiteur de l'extrait Butanolique des feuilles sur quelques micro-organismes.

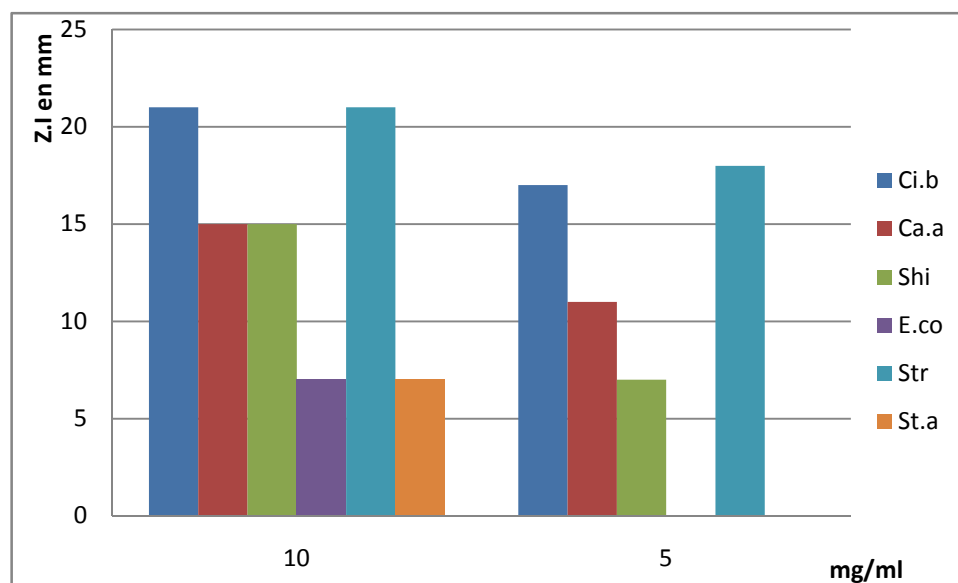


Figure 29 : Effet inhibiteur de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles sur quelques micro-organismes.

Légende : Ci.b : *Citrobacter* ; Ca.a : *Candida albicans* ; Shi : *Shigella* ; E.co : *Escherichia coli* ; Str : *Streptocoques* ; St.a : *Staphylococcus aureus*

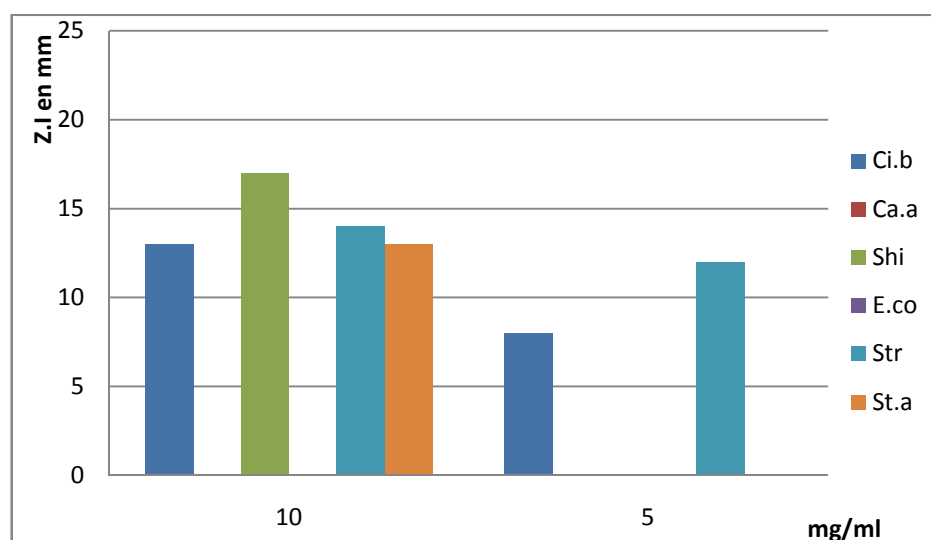


Figure 30 : Effet inhibiteur de l'extrait Méthanolique des racines sur quelques micro-organismes.

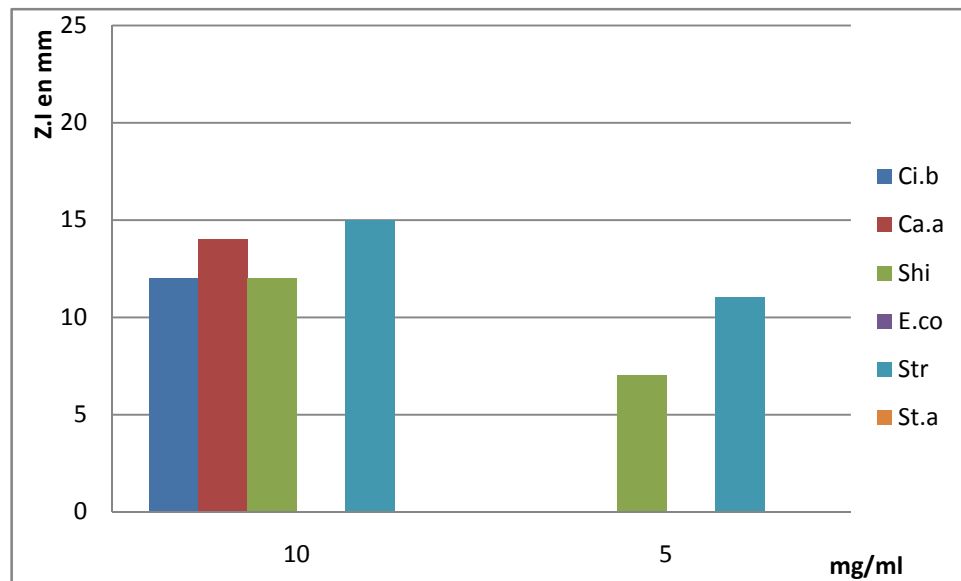


Figure 31 : Effet inhibiteur de l'extrait Butanolique des racines sur quelques micro-organismes.

Légende : Ci.b : *Citrobacter* ; Ca.a : *Candida albicans* ; Shi : *Shigella* ; E.co : *Escherichia coli* ; Str : *Streptocoques* ; St.a : *Staphylococcus aureus*

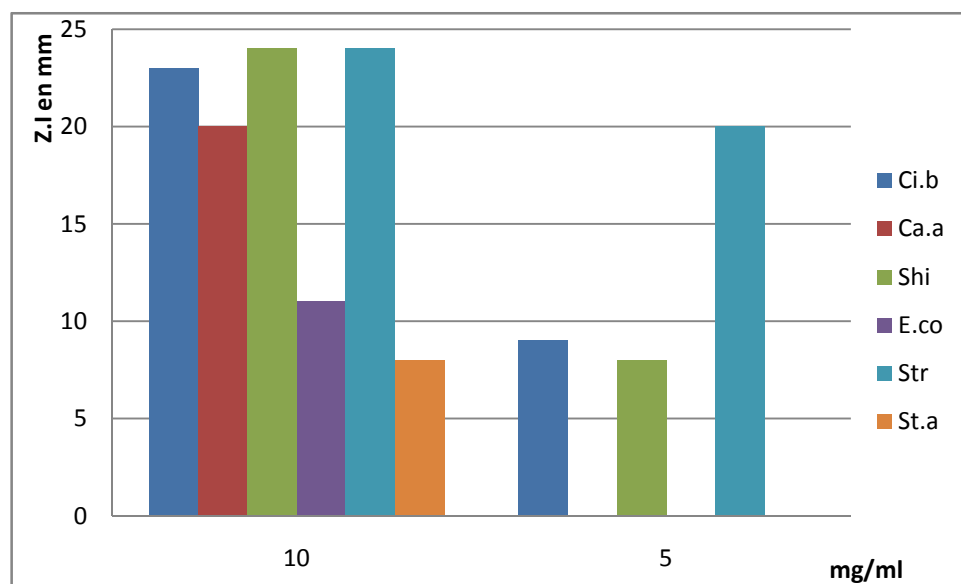


Figure 32 : Effet inhibiteur de l'extrait d'acétate d'éthyle des racines sur quelques micro-organismes.

Sur l'ensemble de ces résultats, il ressort que l'activité inhibitrice dépend de la dose de l'extrait et qu'en général, ces extraits possèdent une activité contre les microorganismes étudiés à l'exception de l'extrait butanolique qui présente une modeste activité antibactérienne ce qui nous amène de dire que cet extrait est pauvre en principes actifs.

On remarque aussi que les *Streptocoque*, *Citrobacter*, *Shigella* et *Candida albicans* sont les plus sensibles par rapport à *Escherichia Coli* et *Staphylocoques aureus*.

Enfin et pour pouvoir faire une comparaison entre l'activité antibactérienne de nos extraits et celle de quelques antibiotiques connus, on a effectué une étude complémentaire in vitro sur l'effet inhibiteur de ces antibiotiques et antifongiques sur trois de nos micro-organismes testés, à savoir, *Staphylocoques aureus*, *Escherichia Coli* et *Candida albicans*.

Nos résultats sont regroupés dans les tableaux 16 et 17.

Tableau 16: Effet inhibiteur de quelques Antifongiques sur *Candida albicans*.

Antifongique (en µg)	<i>Candida albicans</i>
Amphoteric -B (AP – 50)	14
Clotrimazole (CC – 10)	27
Nystatin (NS- 50)	21
Itraconazole (IT – 10)	18
Ketoconazole (KT – 10)	26
Miconazole (MIC -30)	24

Tableau 17: *Effet inhibiteur de quelques Antibiotiques sur Staphylococcus aureus et Escherichia Coli.*

Antibiotique (en µg)	Staphylocoque aureus	E. Coli ATCC 25922
Levofloxacin (LEV – 5)	12	§
Gentamycin (G- 10)	08	20
Amikacin (AK – 30)	14	22
Kanamycin (K – 30)	-	21
Chloramphenicol (C -30)	30	23
Lincomycin (L- 2)	07	§
Spiramycin (SP - 15)	15	§
Penicillin G (P -10)	-	-
Oxacillin (OX – 1)	-	-
Erythromycin (E – 15)	27	-
Prishiumicin (PM -15)	27	-
Vancanycin (VA – 30)	20	-
Rifampicin (R -5)	§	09
Streptomycin (S – 10)	§	15

En comparant ces résultats avec ceux de nos extraits, on remarque que pour *Staphylococcus aureus* et *Escherichia Coli*, les extraits de la plantes donnent un résultat négatif et présentent un effet antibactérien très faible par rapport à celui des antibiotiques.

A l'inverse, pour le *Candida albicans*, nos extraits révèlent une activité antifongique remarquable et comparable à celle des antifongiques de référence, surtout pour l'extrait de l'acétate d'éthyle des racines qui manifeste une certaine activité avec une zone d'inhibition de 20 mm, supérieur à celle de l'Amphoteric –B et l'Itraconazole qui possèdent, respectivement, un diamètre d'inhibition de 14 et 18 mm.

CONCLUSION

Etant donné que l'*Ampelodesma mauritanica* «Diss», n'a pas fait l'objet de beaucoup d'études, nous nous sommes intéressés dans ce modeste travail, à l'étude phytochimique de cette plante en essayant de chercher d'éventuelle activité antioxydante et antibactérienne.

Les résultats obtenus nous ont permis de dégager ce qui suit :

Le criblage phytochimique de la plante (partie aérienne et racine) a mis en évidence la richesse de celle-ci en Saponines et en Flavonoïdes. Elle contient, également, d'autres familles de composés comme les Tanins, les Stérols et les Terpènes.

Nous avons pu constater aussi l'absence totale d'Alcaloïdes des deux parties de la plante.

Il ressort de l'étude de l'activité antioxydante, évaluée par trois méthodes différentes à savoir, le test DPPH, le test ABTS et le test PPM que tous les extraits des différentes parties de la plante, exhibent une activité antioxydante; les extraits au chloroforme donnent les plus faibles valeurs.

Effectivement, l'extrait méthanol-eau (70 : 30) de la partie aérienne est doué d'une activité antioxydante remarquable. Ce résultat peut être expliqué par le fait que cette dernière proportion de la solution méthanol/eau, extrait le mieux possible, les polyphénols et en l'occurrence les flavonoïdes, responsables de l'activité antioxydante des plantes.

De plus, nous avons constaté que d'une manière globale, la partie aérienne présente une capacité antioxydante plus élevée que celle des racines et que le test du DPPH donne la plus faible valeur dans les deux parties de la plante et pour les différents extraits. Cela s'expliquerait par les interférences qui se produiraient à 517 nm et par la non solubilité du DPPH en milieu aqueux.

Concernant l'activité biologique, des tests antibactériens et antifongiques des extraits de différentes parties de la plante ont été entrepris in vitro. Ces extraits possèdent en générale, une activité contre les six microorganismes étudiés à l'exception de l'extrait butanolique qui présente une modeste activité antibactérienne ce qui nous amène de dire que cet extrait est pauvre en principe actifs.

Les observations faites démontrent aussi que *Escherichia coli* possèdent un haut niveau de résistance pour les différents extraits.

L'étude nous indique également que l'extrait méthanolique des racines possède une action inhibitrice remarquable et intéressante sur *Candida albicans*.

En conclusion, nous pouvons dire que ces résultats sont très encourageants et démontrent la richesse de cette plante en saponines et en flavonoïdes qui sont connus pour leurs propriétés pharmacologiques.

De ce fait le *Diss* ou *l'Ampelodesma mauritanica* peut constituer une ressource naturelle de nouvelles substances à activité antioxydante et antibactérienne.

Nous envisageons dans un avenir proche d'approfondir cette étude en essayant d'isoler et d'identifier les molécules bioactives responsables des différentes activités observées.

La réalisation d'une éventuelle étude sur la capacité antioxydante et antibactérienne in vivo est d'une importance capitale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]: G. Pastor (2006). Précis de phytothérapie, édition Alpen, p. 3,4.
- [2]: A. Lhuillier, thèse de doctorat (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). Institut national polytechnique de Toulouse, France.
- [3]: <http://www.who.int> (consultée le 25/07/2011).
- [4]: C. Stedman (2002). Semin Liver Dis, 22 195-206.
- [5]: D. Larrey (1997) J. Hepatol; 26 [suppl. 1]: 47-51.
- [6]: D. Schuppan, J.D. Jia, B. Brinkhaus and E.G. Hahn (1999). Hepatology, 30 1099-1104.
- [7]: G. Pageaux and D. Larrey (2003). Drug-Induced liver disease. N. Kaplowitz and L.D. Deleve, Eds. Marcel Dekker, New York, Basel.
- [8]: L. Peyrin-Biroulet, H. Barraud, F. Petit- Laurent, D. Ancel, J. Watelel, L. Chone, H. Hudziak, M-A. Bigard and J-P. Bronowicki (2004). Gastroenterol Clin. Biol., 28 540-50.
- [9]: A.Gurib-Fakim (2006). Medicinal plants, 27 1-93.
- [10]: N. Hanifi (1991). Importance des ressources phytogénétiques et leur utilisation en Algérie. In conservation des ressources végétales. Publication des Actes éditions, p. 47-49.
- [11]: N. Toudert, thèse de doctorat (2011). Etude phytochimique et évaluation de quelques activités biologiques de *Ampelodesma mauritanica*. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- [12]: N. Toudert, S.E. Djilani and A. Djilani (2009). Antimicrobial Activity of Flavonoids of *Ampelodesma mauritanica*, American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture, 3 (2) 227-228.
- [13]: N. Toudert, S.E. Djilani, A. Djilani, A. Dicko and R. Soulimani (2009). Antimicrobial Activity of the Butanolic and Methanolic Extracts of *Ampelodesma mauritanica*. Advances in Natural and Applied Sciences, 3 (1) 19-21.
- [14]: A. Djilani.; N, Touder; S,E, Djilani and A, Dicko (2010). Hypoglycemic Activity and Antioxidant Potential of *Ampelodesma mauritanica* Extract. The IUP Journal of Biotechnology, Vol. IV, (3) 55-62.
- [15]: J. Bruneton (1999). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Lavoisier Technique & Documentation, 3eme édition, Paris, France.

- [16]: J.Kerharo, Adam, J.G. (1974). La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle: plantes médicinales et toxiques. Editions Vigot Frères, Paris.
- [17]: J. Bruneton, (2001). Plantes toxiques: Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux, Lavoisier Technique & Documentation, Paris.
- [18]: R. Hegnauer, (1990). Chemotaxonomie der Pflanzen - Band IX. Birkhäuser Verlag, Basel, Suisse.
- [19]: A. Boutiti, mémoire de Magister (2006). Etude Phytochimique de l'espèce *Globularia alypum* L. Université Mentouri, Constantine.
- [20]: P.P. Principe, (1989). Economic and Medicinal Plant Research, Volume 3. Academic Press, London.
- [21]: K. Hostettmann, O. Potterat, & J.-L. Wolfender (1998b). *Chimia*, 52 10-17.
- [22]: M. Merzoud and M.F. Habita (2007). Research Journal of Applied Sciences, 2 (4) 410-415.
- [23]: http://zipcodezoo.com/Plants/A/Ampelodesma_mauritanica (consultée le 21/11/2010).
- [24]: R. Seghiri, thèse de doctorat d'état. Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*. Université Mentouri, Constantine.
- [25]: J. Kühnau (1976). *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 24 117-191.
- [26]: J.B. Harborne (1994). The flavonoids: Advances in research since 1986. Chapman & Hall, Cambridge.
- [27]: S. Ramos (2007). *J. Nutr. Biochem.*, 18, 427.
- [28]: S. Peronny, thèse de doctorat (2005). La perception gustative et la consommation des tannins chez le maki (*Lemur catta*). Muséum national d'histoire naturelle, France, 151p
- [29]: W. Bouzid, mémoire de magister en biologie (2009). Etude de l'Activité Biologique des Extraits du Fruit de *Crataegus monogyna* Jacq. Université -Elhadj Lakhdar-Batna.
- [30]: T. Beta, S. Nam, J.E. Dexter and H.D. Sapiirstein (2005). *Cereal chem.*, 82 390-393.
- [31]: N. Boizot et J.P. Charpentier (2006). Le cahier des techniques de l'INRA, pp. 79-80.
- [32]: I. Fumio, F. Yuichi, I. Kazuhisa, and S. Tetsuo (2003). *Chemio-biological Interactions*, 145 235-250.

- [33]: J.B. Harborne (1989). *Methods in Plant Biochemistry in Plant Phenolics*, Academic Press, London, UK.
- [34]: P. Sarni-Manchado, V. Cheynier (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire*. Editions Technique & Documentation, p.398.
- [35]: J.J. Macheix, A. Fleuret, C. Jay-Allemand (2005). *Presses polytechniques et universitaires romandes*, p. viii, 1, 67, 162.
- [36]: A. Lugasi, J. Hóvári, K. V. Sagi and L. Bíró (2003). *Acta Biologica Szegediensis*. 47 119-125.
- [37]: S.B. Rees and J.B. Harbone (1985). *Phytochem.*, 24 2225-2231.
- [38]: E. Padilla, E. Ruiz, S. Redondo, A. Gordillo-Moscoso, K. Slowing and T. Tejerina (2005). *European Journal of Pharmacology*, 517 84–91.
- [39]: Z. Nowakowska (2007). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 125-137.
- [40]: J.Y. Kim, H.J. Lim, D.Y. Lee, J.S. Kim, D.H. Kim, H.J. Lee, H.D. Kim, R. Jeon, and J.H. Ryu (2009). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 937–940.
- [41]: T. Baborun (1997). *Food and Agricultural Research Council, Réduit, Mauritius*, 83-94.
- [42]: R. Da Silva, G.H.B. De Souza, A.A. Da Silva, V.A. De Souza, A.C. Pereira, V.D.A. Royo, M.L.A.E. Silva, P.M. Donate, A.L.S. De Matos Araujo, J.C.T. Carvalho, and J.K. Bastos (2005). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15 (4) 1033–1037.
- [43]: R. K. Sutradhar, A.K.M. Matior Rahman, M.U. Ahmad and S. C. Bachar (2008). *Phytochemistry Letters*, 1 (4) 179–182.
- [44]: S. Fiorucci, thèse de doctorat (2006). *Activités biologiques de composés de la famille de flavonoïdes: approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire*. Nice, 211p.
- [45]: A. Ghestem, E. Seguin, M. Paris and A.M. Orecchioni (2001). *Le préparateur en pharmacie. Dossier 2, Botanique-Pharmacognosie-Phytothérapie-homeopathie*. Tec et Doc (Ed), 272p.
- [46]: J. Reynaud and M. Lussignol (2005). *Lotus Newsletter*, 35 75- 82.
- [47]: Y. Dacosta (2003). *Les phytonutriments bioactifs*. Yves DACOSTA (Ed). Paris, 317p.
- [48]: S. Louis, thèse de doctorat (2004). *Diversité structural et d'activité biologique des Albumines sentomotoxiques de type 1b des légumineuses*. Lyon, 259p.
- [49]: H.C. Das, J.H. Wang and E. Lien (1994). *Journal of Food Engineering*, 69 133-136.

- [50]: J.V. Formica and W. Regelson (1995). *Food Chem Toxicol*, 33 1061-1080.
- [51]: L.B.M. Tijburg, T. Maller, J.D. Folts, U.M. Weisberger and M.B. Katan (1997). *Crit. Rev. Food Sci.*, 37 771-785.
- [52]: H. Groot (1998). *Tabula*, 3 4-9.
- [53]: L. Yochum, L. Kusli, K. Meyer and A.R. Folsom (1999). *Am. J. Epiderma.* 149 943-949.
- [54]: S. Tahrouch, C. Audary, S. Rapior, L. Moudolot, A. Gargadennec and A. Fruchner (2000). *Acta Bot. Gallica*, 147 (3) 225-232.
- [55]: H.P. Kim, K.H. Son, H.W. Chang and S.S. Kong (2004). *J. Pharmacol. Sci.*, 96 229-254.
- [56]: T.P.T. Cushine and A.J. Lamb (2005). *Int. J. Antimicrob. Agent*, 26 343-356.
- [57]: K. Asres, A. Seyoum, C. Veereshan, F. Bucar and S. Gibbons (2005). *Phytother. Res.*, 19 557-581.
- [58]: F. Kini, A. Saba, M. Tits, L. Angelot and P.I. Guisson (2008). *J. Soc. Ouest-Afr. Chim*, 25 117-121.
- [59]: J.M. Besle, J.L. Lamaison, P. Pradel, D. Fraisse, D. Viala and B. Martin (2004). *Renc. Rech. Ruminants*, 11 :67-70.
- [60]: A. Marfak, thèse de doctorat (2003). Radiolyse Gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides. Université de Limoges, France, 220 p.
- [61]: L. Bartosikova, J. Necas, V. Suchy and R. Kubinova (2003). *Drug and Chemical Toxicology*, 72 87-94.
- [62]: K. Hostettmann, and A. Marston (1995). The chemistry and pharmacology of natural products, vol. 4. J.D. Phillipson, D.C. Ayres and H. Baxter (Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. Pp 1 – 548.
- [63]: D. Kone, thèse de doctorat (2009). Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes-extraction, identification d'alcaloïdes-caractérisation, quantification de polyphénols : Etude de leur activité antioxydante. Université Paul Verlaine-Metz, France.
- [64]: T. Okuda, Y. Kimura, T. Yoshida and T. Hatanv (1983). *Chem. pharm. Bull.*, 31 1625-1631.
- [65]: C. Perret, thèse de doctorat (2001). Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers Fr. Université de Neuchâtel, Suisse. 173p.
- [66]: N. Backous, C. Delporte and C. Andrad (1997). *Journal of Ethnopharmacology*, 57 81-83.

- [67]: D. Amadou, thèse de doctorat en pharmacie (2005). Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* WILLD. (MYRTACEAE) et d'Odonto-Stomatologie Mali.
- [68]: J. Pincemail, K. Bonjean, K. Cayeux et J-O. Defraigne(2002). Nutrition Clinique et Métabolisme, 16 (4) 233-239.
- [69]: H. Laborit, J. Drouet, J. Gerard, J.M. Jouany, C. Narvaes, P. Niauxsat and B. Weber (1960). Presse Médicale, 68 305-308.
- [70]: E. Colette, thèse de doctorat en pharmacie (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Université de Bamako, 147 P.
- [71]: S. Ahamet, thèse de doctorat en pharmacie (2003). Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitaceae). Université de Bamako, 117 P.
- [72]: LB. Igor Passi, thèse de doctorat en pharmacie (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara zanthoxyloides* Lam (Rutaceae). Université de Bamako, 133 P.
- [73]: A. Cavin, thèse de Doctorat (1999). Investigation phytochimique de trois plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydante et antiradicalaire : *Tinospora crispa* (Ménispermaceae), *Merremia emarginata* (Convolvulacées) et *Oropea enneandra* (annonacées). Université de Lausanne, Suisse, 241 P.
- [74]: F. Sidibé, thèse de doctorat en pharmacie (2003). Etude phytochimique et pharmacologique de *Stereospermum kunthianum* Cham. (Bignoniaceae). Université de Bamako, 79 P.
- [75]: C.M. Anderson, A. Halleberg and T. Hogberg (1996). Adv. Drug. Res., 28 pp 65-180.
- [76]: R. Keïta, thèse de doctorat en pharmacie (2002). Etude de l'activité antifongique et antioxydante de 14 plantes utilisées dans le traitement traditionnel des infections sexuellement transmissibles. Université de Bamako.
- [77]: M. Ozgen, R.N. Reese, A.Z. Tulio Jr, J.C. Scheerens and A.R. Miller (2006). J. Agric. Food Chem., 54 1151-1157.
- [78]: D-O. Kim, W.J. Seung and C.Y. Lee (2003). Food Chemistry, 81 (3) 321–326.
- [79]: A. Salvi, thèse de pharmacie (1998). Esterase-like activity of human serum albumin: Pharmacokinetic significance, loss by free radical attack, and protection by antioxydants. Faculté des sciences, Université de Lausanne, Suisse.
- [80]: A.M. Osman, K.K. Wong, A. Fernyhough (2006). Biochemical and Biophysical Research Communications, 346 321–329.
- [81]: P. Molyneux (2004). J. Sci. Technol., 26 (2) 211-219.

- [82]: P. Prieto, M. Pineda and M. Aguillar (1999). *Anal Biochem.*, 269 337-341.
- [83]: M. Odile, thèse de doctorat (2004). Biosynthèse des isoprénoïdes : synthèses d'analogues du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate, inhibiteurs potentiels de la voie du méthylérythritol phosphate. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- [84]: <http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/> (consultée le 25/05/2011).
- [85]: <http://www.bacteriologie.net/generale/gram.html> (consultée le 07/12/2009).
- [86]: T.J. Beveridge (1990). Mechanism of gram variability in select bacteria. *J. Bacteriol.*, 172 (3) 1609-1620.
- [87]: <http://arachosia.univ-lille2.fr/labos/parasito/Internat/courspar/index.html> (consultée le 25/05/2011).
- [88]: J. Wiesner, R. Ortmann, H. Jomaa and M. Schlitzer (2003). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42 5274-5293.
- [89]: T. J. Egan and H.M. Marques (1999). *Coord. Chem. Rev.*, 190-192, 493-517.
- [90]: R. Poulin, L. Lu, B. Ackermann, P. Bey and E. Peggs (1992). *J. Biol. Chem.*, 267 150-158.
- [91]: I.O. Donkor, T.L. Huang, B. Tao, D. Rattendi, S. Lane, M. Vargas, B. Goldberg and C. Bacchi (2003). *J. Med. Chem.*, 46 1041-1046.
- [92]: G.L. Kedderis, L.S. Argenbright and G.T. Miwa (1989). *Chem. Res. Toxicol.*, 2 146-149.
- [93]: D.J. Krogstad (1996). *Epidemiol. Rev.*, 18 77-89.
- [94]: P. McKean (2002). *Microbiology today*, 29 129-131.
- [95]: A. Vertut-Croquin, J. Bolard, M. Chabbert and C. Gary-Bobo (1983). *Biochemistry*, 22 2939-2944.
- [96]: T.C White, K.A. Marr and R.A. Bowden (1998). *Clin. Microbiol. Rev.*, 11 382-402.
- [97]: M.D. Judith, thèse de doctorat en pharmacie (2005). Etude phytochimique et pharmacologique de *Cassia nigricans Vahl (Caesalpinaceae)* utilisé dans le traitement des dermatoses au Tchad. Université de Bamako.
- [98]: J.L. Fauchère et J.L. Avril (2002). *Bactériologie générale et médicale*. Edition Ellipses, Paris.
- [99]: <http://www.bacteriologie.net/generale/antibiogramme.html> (consultée le 15/07/2011).
- [100]: <http://www.liste-hygiene.org/> (consultée le 25/07/2011).

- [101]: J.L. Avril, H. Dabernat, F. Denis and H. Montiel (1992). Bactériologie clinique, 2^{ème} édition Marketing, p 277-279.
- [102]: J.L. Avril (1991). Dictionnaire pratique de bactériologie générale. Edition Ellipses-Marketing, Beecham-Sévigné, Paris, p 43.
- [103]: <http://www.liste-hygiene.org/arccandida.html> (consulté le 27/07/2011).
- [104]: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/msds33f-fra.php> (consulté le 27/07/2011).
- [105]: <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/cc/citrobacter.html> (consulté le 27/07/2011).
- [106]: <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/shigella-4243.html> (consulté le 27/07/2011).
- [107]: <http://www.liste-hygiene.org/SHIGELLA.html> (consulté le 27/07/2011).
- [108]: <http://www.inspection.gc.ca/francais/fssa/concen/cause/shigf.shtml> (consulté le 27/07/2011).
- [109]: <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/staphylocoque-dore-4351.html> (consulté le 27/07/2011).
- [110]: <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/streptocoque-4386.html> (consulté le 27/07/2011).
- [111]: D.O. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee, and C.Y. Lee, (2002). J. Agric. Food Chem., 50 3713-3717.
- [112]: M.B. Arnao, (2000). Food Science & Technology 11 419 – 421.
- [113]: A.W. Bauer, W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and M. Turck (1966). American Journal of Clinical Pathology 45 493-496.
- [114]: C. Duraffourd et J.C. Lapraz (2002). Traité de Phytothérapie clinique. Endobiogénie et Médecine. Edition Masson, Paris.