

République Algérienne Démocratique et Populaire

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences de la Nature et de la Vie**

N° D'ORDRE :
N° DE SERIE :

MEMOIRE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE :

MAGISTER

Option : Biochimie et Microbiologie Appliquée

THEME

**Etude des propriétés biochimiques des
polyphénols et tannins issus de *Rosmarinus
officinalis* et *Vicia faba L.***

Présenté par : M^{elle} SOUAD AKROUM

Devant le jury :

Président :	Mr. BOUSSEBOUA H.	Prof. Univ. Constantine
Rapporteur :	Mr. MERGHEM R.	Prof. Univ. Constantine
Examineurs :	Mr. LAHOUEL M.	MC. Univ. Jijel
	Mr. BELKHIRI A.	MC. Univ. Constantine

Année universitaire 2005-2006

Introduction :

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. Après plusieurs études, on a su qu'elles étaient pour la majorité attribuées aux composés secondaires dont les alcaloïdes, les terpènes et les composés polyphénoliques.

Les polyphénols sont en effet doués de multiples vertus thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et agroalimentaires : ils jouent un rôle très important, principalement, dans la lutte contre les cancers, les maladies cardiovasculaires et la peroxydation lipidique. Expliquant de ce fait leur grande utilisation dans la fabrication des médicaments.

Ils interviennent aussi dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation.

En cosmétologie, ces composés phénoliques sont de premier ordre grâce à leur grand pouvoir colorant et leur capacité à restituer et protéger les fibres du collagène.

Notre contribution porte sur des polyphénols issus de deux plantes *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* Des études phytochimiques basées principalement sur l'extraction, la chromatographie sur couche mince et la spectrophotométrie de ces composés nous permettent une approche de la structure moléculaire.

Des testes antibactériens mettent en évidence l'action des flavonoides et des tannins contre *Escherichia coli*, *Streptococcus sp* et *Proteus mirabilis* qui sont des germes pathogènes responsables de plusieurs infections chez l'homme.

Les tannins de *Vicia faba L.* prouvent leur action antinutritionnelle en précipitant *in vitro* différents composés organiques présents dans l'alimentation.

Aspergillus niger et *Penicillium sp* sont testés sur des milieux à base de tannins pour essayer de démontrer leur aptitude à synthétiser la tannase capable de dégrader les tannins condensés.

Enfin, des applications antiradicalaires nous confirment l'action des flavonoides de *Rosmarinus officinalis* et des tannins de *Vicia faba L.* contre les radicaux libres.

Partie 1 : Bibliographie :

1* Quels sont les derniers résultats de la recherche sur les polyphénols ?

1.1-Présentation générale des polyphénols et de leurs propriétés :

1.1.1- Que sont les polyphénols ? Où les trouve-t-on ?

Les polyphénols sont des molécules aromatiques synthétisées par les végétaux et qui appartiennent à leur métabolisme secondaire. Ils participent à la défense des plantes contre les agressions environnementales ; c'est pourquoi 80% des composés phénoliques sont essentiellement localisés dans les tissus épidermiques de la plante. Ce sont des phytoconstituants, généralement des pigments, responsables des tintes automnales des feuilles et des couleurs des fleurs et fruits (jaune, orange, rouge...). Ils sont associés à de nombreux processus physiologiques : croissance cellulaire, différenciation, organogénèse, dormance des bourgeons, floraison, tubérisation... (UNUP 1986).

Ces composés jouent aussi un rôle important dans la qualité alimentaire des fruits et déterminent aussi leurs saveurs (les tannins sont à l'origine de la sensation d'astringence des fruits non mûrs, les flavones sont responsables de l'amertume des *Citrus* et peuvent donner naissance, par transformation chimique à des dihydrochalcones à saveur sucrée (DRYUNE et al.1999).

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles des végétaux. Les principales sources du point de vue alimentaire sont les légumes à feuilles, les fruits et les boissons. Et du point de vue médicinal, principalement les labiés et les composés (RESEMY 1998).

La biosynthèse des flavonoides se fait par deux voies principales qui sont :

La voie de l'acide shikimique :

Dans cette voie, les hydrates de carbones produisent lors de leur dégradation par la voie des pentoses-P et la glycolyse, l'érythrose 4-P et le phosphoenol pyruvate respectivement.

Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C₆C₁ formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoides et tannins condensés (SEIGLER 1998, HASLEM 1993, NAKANISHI et al. 1975)

La voie de l'acide malonique :

La glycolyse ainsi que la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate.

C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités "Acétate " qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (RICHTER 1993, SEIGLER 1998).

Comme tous les composés secondaires, les phénols sont impliqués étroitement dans les rôles défensifs de la plante :

- Dissuader les prédateurs :

a- par les odeurs repoussant les herbivores, ex : les polyphénols des pélargoniums.

b- les plantes toxiques " éduquent " les herbivores à les éviter pour ne pas être broutées.

- Attirer les pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.

- Décourager la compétition vis-à-vis d'autres espèces. On parle d'allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.

1.1.2- Rôle antioxydant des polyphénols.

1.1.2.1-Les radicaux libres:

Notre organisme produit en permanence des radicaux libres en réponse à des agressions environnementales (cigarettes, polluants, infections.....). Les radicaux libres sont des espèces chimiques très instables qui jouent un rôle dans l'action de certains traitements anticancéreux, de même qu'à l'origine du vieillissement. Leur structure comprend un électron célibataire qu'ils cherchent à apparier en attaquant et en endommageant les molécules voisines (ROBERT 2005).

En réalité le radical libre vole un électron à une molécule stable qui à son tour deviendra un radical libre, induisant ainsi une création en chaîne. Cette chaîne de vols d'électrons est cumulative et explique plusieurs maladies (FORTIN 2001-2003).

Dans les membranes cellulaires, ces composés néfastes provoquent des peroxydations lipidiques responsables de nombreux troubles liés ou non au cancer. Dans le noyau des cellules, ils coupent l'ADN, ce qui entraîne la mort cellulaire. C'est le plus souvent une molécule d'oxygène qui, directement ou par l'intermédiaire d'autres radicaux libres, donne

les espèces radicalaires les plus réactives : le radical superoxyde et le radical hydroxyle. Le radical superoxyde peut être détoxiqué dans la cellule par une enzyme spécialisée, mais le radical hydroxyle ne l'est pas ; il est responsable des dommages moléculaires les plus importants. Les radicaux libres sont produits par des médicaments anticancéreux (comme la bléomycine ou la doxorubicine) ou par les rayonnements ionisants, ce qui détermine leur activité cytotoxique. (ROBERT 2005).

1.1.2.2-Rôle antiradicalaire des polyphénols :

Le polyphénols sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, et dernièrement dans celle de flavay (MASQUELIER 2006).

Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux bon-mauvais (qui peuvent être les deux), comme l'oxyde nitrique qui permet une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (FLORENTIN 2004, MASQUELIER 2006).

En raison de ces vertus, les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et cosmétiques.

1.1.3- Quelles différences entre acides phénols, flavonoïdes, tannins... ?

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou sans autres fonctions (alcooliques, carboxyles...). Dans cette catégorie, on trouve de nombreuses substances, qui peuvent se classer en cinq groupes principaux :

Les acides phénols : Ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature.

Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides. Ex : l'Acide gallique qui est un élément principal de la structure des tannins hydrolysables. (figure1).

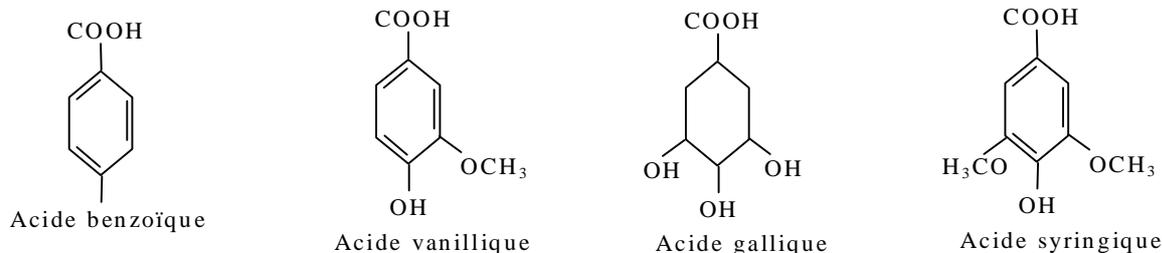


Figure 1 : Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque.

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide salicylique, l'acide caféique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique. (NEWSLETTER. 2005). (figure2).

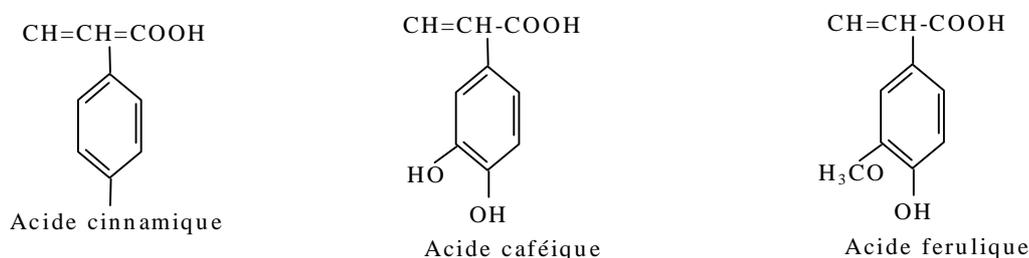


Figure 2 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique.

Les flavonoïdes : Ont des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux de leur squelette de base en C15, les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones.

Ces composés existent sous forme libre ou sous forme d'hétérosides. (HELLER1993).

Les anthocyanes : donnent des couleurs très variées : bleu, rouge, mauve, rose ou rouge. Toutes les anthocyanes sont chargées positivement. Ceci est dû à leur structure de base commune : le cation flavylum ou 2 phenyl 1-benzopyrilium. (HELLER 1993).

Les trois anthocyanes principales sont :

- * La pélagonidine : a un OH en 4' et donne une couleur rouge-orange.
- * La cyanidine : a deux OH en 3', 4' ou en 4', 5'. Elle donne une couleur rouge magenta.
- * La delphinidine : a trois OH en 3', 4', 5'. Elle donne une couleur mauve.

Les flavanes : sont sous forme de monomères (ex : la catéchine) ou sous forme de polymères (dimères, trimères...de catéchine). On les trouve dans les écorces végétales.

Les tannins : sont des macromolécules se divisant selon leur structure en deux groupes principaux :

- * Les tannins condensés : proanthocyanidines : qui sont des composés phénoliques hétérogènes. Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 desoxy 3- flavonols et flavan-3,4-diols.

Les polymères ont une structure hérissée d'OH phénoliques, capables de former des liaisons stables avec les protéines (figure 3)

- * Les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose: un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique (WAWIZYNIAK. 1999-2000). (Figure4).

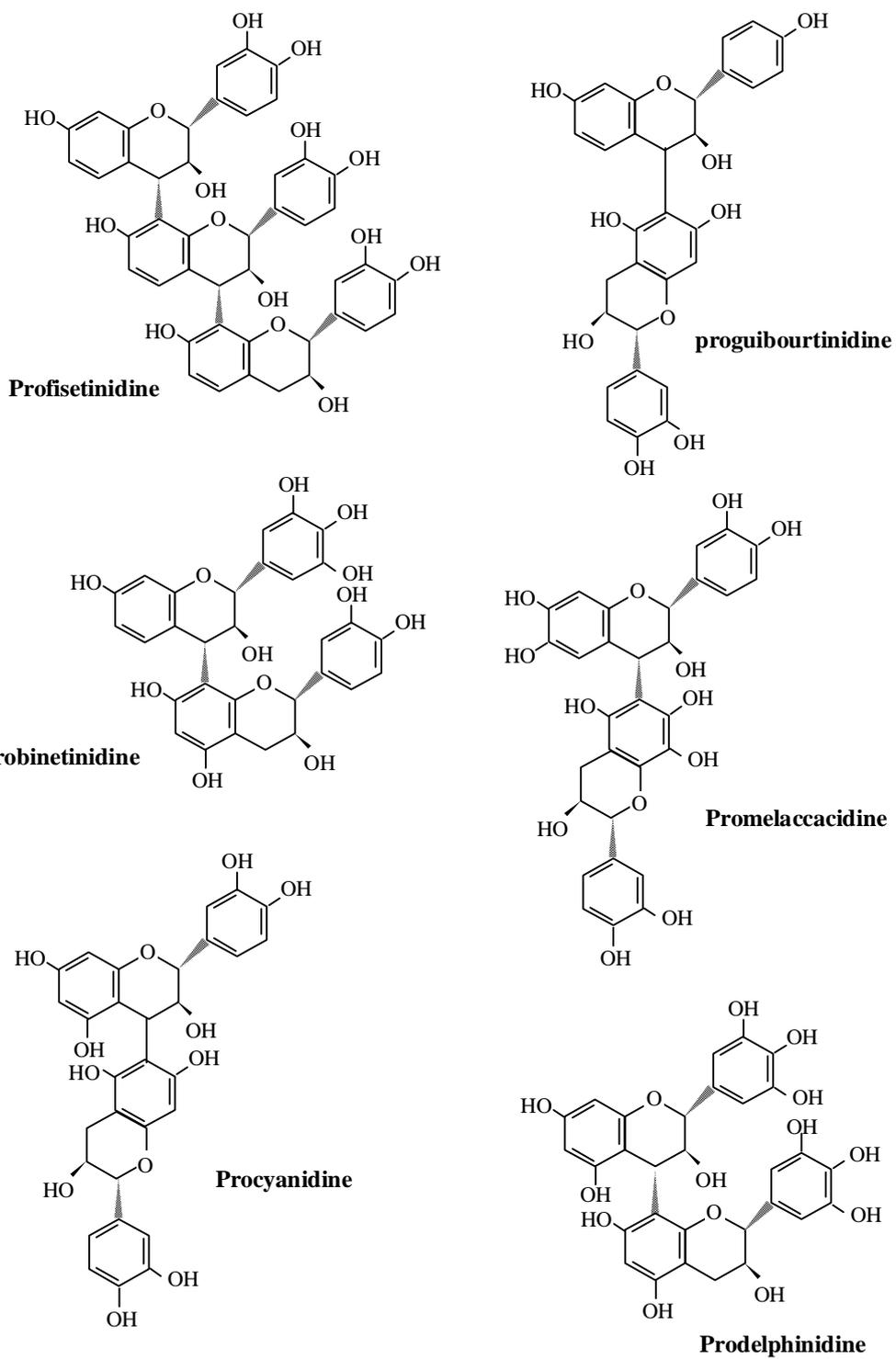


Figure 3: Quelques proanthocyanidines sélectionnés. (SEIGLER 1998).

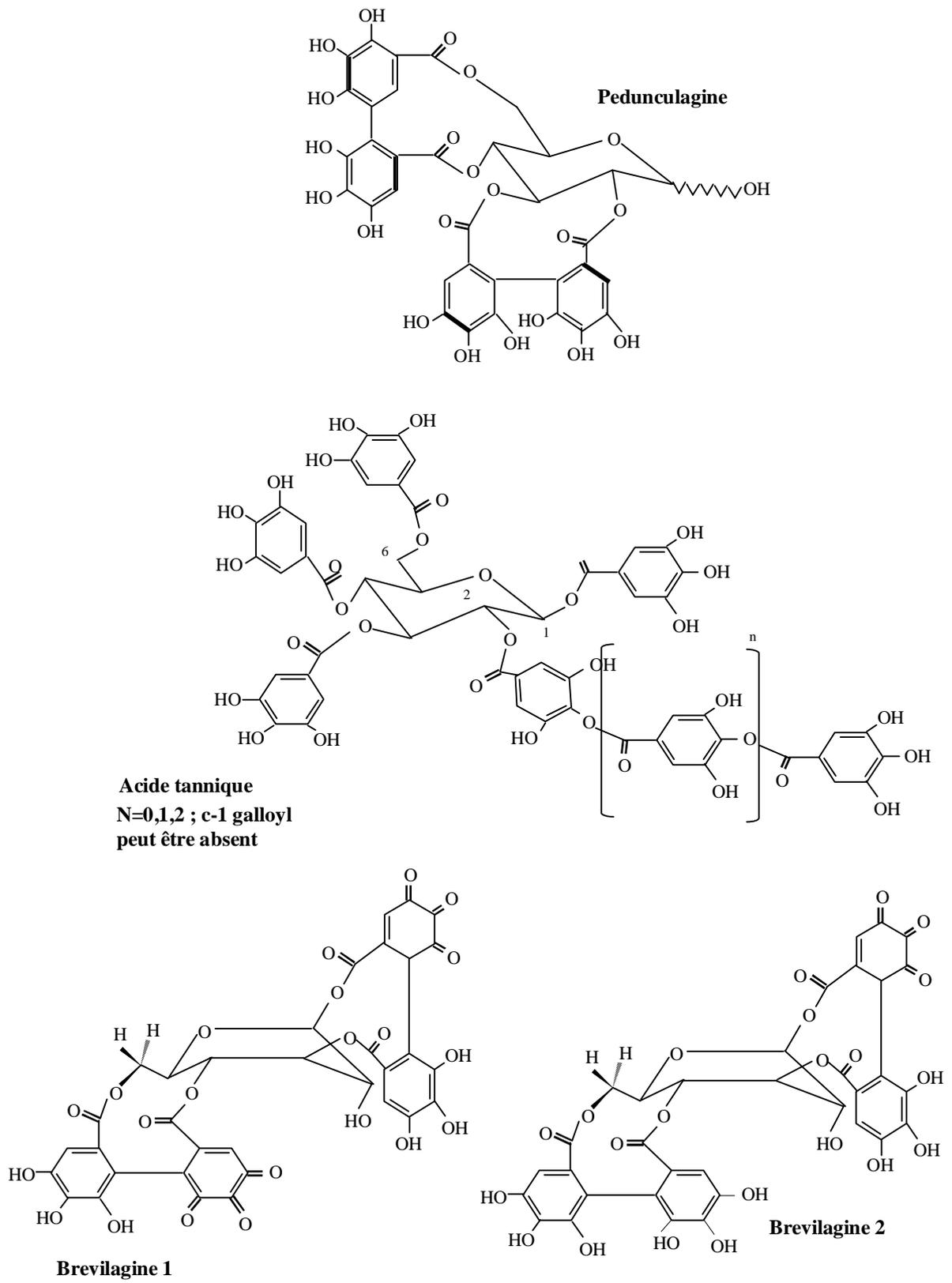


Figure 4 : Quelques tannins hydrolysables représentatifs (SEIGLER 1998).

1.2 - Quel est le potentiel des polyphénols dans le traitement des cancers ?

1.2.1- Prévention contre les cancers :

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de défense anticancéreuse. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes. Des cellules comme les hépatocytes, synthétisent des enzymes dites de phase I (notamment des monooxygénases, telle que les cytochromes P-450) qui peuvent oxyder les substances mutagènes hydrophobes en produits constituant le substrat des enzymes de phase II (glucoronyl transférases, sulfotransférases...) qui convertissent ces produits en espèces hydrolysables facilement excrétables hors cellules. Les enzymes de phase I et II agissent également dans la muqueuse intestinale. Elles sont synthétisées sous l'action des substances polyphénoliques trouvées dans les légumes, et aussi sous l'action des isothiocyanates (dérivés des glucosinolates). (JHONSON 1999, AMES et GOLD 1999).

1.2.2- Cas particulier : flavonoïdes et les tannins contre le cancer.

***Les flavonoïdes contre le cancer :** parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, on cite la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans l'alimentation : La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20% de quercétine à l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du colon et y prévient l'apparition des cryptes anormales.

Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales.

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un DNA anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-OHDG (8-hydroxydesoxyguanosine), un marqueur des dommages oxydatifs du DNA. La catéchine est plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. Elle est très abondante dans le thé sous forme d'épigallocatechingallate (EGCG). (BONCHY 2001).

***Les tannins contre le cancer :**

* Les proanthocyanidines, pris à faibles doses et à long terme procurent une protection contre le cancer du côlon (NOMOTO 2004). Mais d'une façon générale, les tannins ; hydrolysables comme condensés ; ne font pas qu'augmenter la résistance contre les différents cancers, ils ont même une action anticancéreuse qui diminue, et parfois même, élimine totalement les tumeurs.

Plusieurs travaux ont porté sur cette activité.

*Les tannins hydrolysables, tout comme les épigallocatechines ont montré une grande capacité à supprimer les tumeurs. Ces deux groupes agissent en inhibant les métalloprotéinases matricielles (MMP), surtout les MMP-2 et MMP-9, alors que le β -D-glucose des tannins hydrolysables qui a ses groupement hydroxyles complètement substitués par les groupements galloyl forme des groupes (ex : l'hexahydroxydiphenoyl) capables d'éliminer les invasions des cellules tumorales. (TANIMURA. 2005).

* Les proanthocyanidines (PA) oligomériques causent une apoptose des cellules tumorales chez les individus humains atteints du cancer colorectal. Ceci en augmentant l'activité de l'enzyme Carpase-3 et en diminuant l'expression de l'RNA-VCL-2 (NOMOTO 2004 , KIM 2005). Ces mêmes composés (PA) jouent un rôle dans l'augmentation de l'effet anticancéreux de certains médicaments. En effet, l'action antitumorale des proanthocyanidines augmente celle des substances utilisées habituellement, comme la doxorubicine (ZHANG 2005).

* Les procyanidines, quant à eux, ont montré une action protectrice contre le cancer du colon chez les rats et les humains. Chez les rats, ils inhibent le nombre total des cryptes tumorales de 50%. Ces polyphénols agissent en inhibant l'activité des Kinases 1 et 2 et l'expression de leurs jonctions C-terminales, en activant l'enzyme Carpase-3 et en diminuant la biosynthèse du polyamine (GOSSE 2005).

1.3- Que devient-il des polyphénols ingérés dans l'alimentation ? (biodisponibilité) :

Les polyphénols sont présents dans la plupart des végétaux. Leur nature chimique et leurs teneurs sont extrêmement variables d'une espèce à l'autre et donc d'un aliment à l'autre. Les jeunes feuilles de théier en contiennent environ 300 mg/g de matière sèche et une infusion de thé environ 200 mg. Ces valeurs peuvent être comparées à la consommation moyenne quotidienne en polyphénols apportée par l'ensemble des aliments d'origine végétale, qui est estimée à un gramme. Le thé constitue donc, pour les buveurs réguliers, une source majeure de polyphénols. Ceux-ci sont également présents en concentrations importantes dans divers fruits (pomme, raisin) et boissons dérivées (jus de fruits, vin, cidre). Le thé vert s'en distingue cependant de tous ces produits par une concentration en catéchines très nettement supérieure (SCALBERT 2001).

L'effet santé ne peut être dissocié de la biodisponibilité de ces micro-constituants. Les sites associés à la biodisponibilité : estomac, intestin supérieur, colon permettent aux polyphénols d'assurer la première de leur fonction : l'effet antioxydant des lipides (SFA 2005).

Afin de comprendre les effets de la consommation des polyphénols sur la santé, il est essentiel de connaître leur devenir dans l'organisme une fois ingérés afin de déterminer s'ils atteignent ou non les tissus cibles présumés. La biodisponibilité des polyphénols varie très largement d'une molécule à l'autre. Certains polyphénols sont bien absorbés à travers la barrière intestinale et se retrouvent dans le sang. Leur concentration plasmatique est maximale environ 2 heures après leur consommation. Cette concentration diminue ensuite pour atteindre une valeur nulle 6 à 9 heures plus tard. Elle ne peut être maintenue élevée que par une consommation renouvelée au cours de la journée. L'absorption des polyphénols est conditionnée par leur différence de structure. L'absorption intestinale des polyphénols est d'autant plus limitée que leur masse moléculaire est élevée (SCALBERT 2001, SFA 2005).

La part des polyphénols qui n'est pas absorbée à travers l'intestin grêle, est cependant métabolisée en molécules aromatiques de faible masse moléculaire par la microflore du côlon. Ces métabolites sont eux-mêmes bien absorbés et apparaissent dans les urines 3 heures après consommation du thé avec un pic d'excrétion vers 10 heures (SCALBERT 2001). Les taux urinaires représentent 1 à 25 % des doses ingérées en fonction de la nature des polyphénols (RESEMY 2001). Des études *in vitro* sur la microflore fécale humaine ont montré, que les polyphénols complexes étaient dégradés en divers acides aromatiques, phénoliques et non phénoliques.

Les polymères phénoliques non absorbés pourraient exercer des effets protecteurs au niveau du tube digestif où leurs concentrations peuvent atteindre des valeurs très supérieures à celles des catéchines dans les tissus internes (SCALBERT 2001)

1.4- Dernières avancées sur le rôle bénéfique des polyphénols face aux maladies cardio-vasculaires , hormonodépendantes,.... :

Parmi les nombreuses actions préventives assurées par les polyphénols, on cite :

***Prévention contre les maladies cardiovasculaires (CV) :**

La consommation des polyphénols se traduit par une augmentation temporaire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent les repas.

Au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) (YAMANAKA 1996) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués).

Les polyphénols inhibent l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de

thrombose, qui induit l'occlusion des artères.

Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (FLORENTIN 2004).

De nombreuses études ont démontré l'action antioxydante des polyphénols, (NATURFORSK 2004, C. RESEMY 1998). On utilise même ces composés comme nouvelle méthode de traitement de l'hypercholestérolémie, l'hyperlipidémie, l'athérosclérose et l'ulcère gastrique. (CHERUVANKY 2003, KHENNOUF 2004).

***Prévention contre les maladies hormono-dépendantes; telle que l'ostéoporose :**

Ceci en modulant la réponse aux oestrogènes endogènes. Certains polyphénols et plus particulièrement les isoflavones du soja ont une affinité remarquable pour les récepteurs des oestrogènes et sont qualifiés pour cela de phyto-oestrogènes. Les fruits et légumes contiennent aussi des polyphénols tels que la quercétine de l'oignon ou le kaempferol de la chicorée qui possèdent également des propriétés pseudo-oestrogéniques ou inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. Mais, de nouvelles études restent nécessaires pour confirmer ces effets chez l'homme. (FLORENTIN 2004, BERTA-VAURALLEN 2005).

***Action gastro protectrice des polyphénols :**

Les polyphénols, surtout les flavonoïdes comme la quercétine et la rutine, ainsi que les acides phénoliques comme l'acide caféique, l'acide gallique, l'acide é gallique réduisent la surface des lésions gastriques produites par l'andométhacine chez les rates, (acutissimine B, phillyraeoïdine A) isolés et purifiés de *Quercus Suber*, et *Q. coccifera*. (KHENNOUF 2004).

***Flavonoïdes contre la radiotoxicité, la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique :**

L'effet antioxydant des flavonoïdes est largement utilisé actuellement dans les industries thérapeutiques et pharmaceutiques (surtout pour la préparation des médicaments : Daflon, Tannakan, Veinamitol... (VIDAL 1996)).

Ces composés sont connus pour leur rôle préventif contre la cardiotoxicité (SADZUKA 1997), leur inhibition de la peroxydation lipidique et leur prévention contre l'atteinte hématologique. (LAHOUEL 2004).

En effet, les flavonoïdes apportent une protection contre les radicaux libres en empêchant leur liaison avec les lipides membranaires de cellules, ce qui se traduit par une diminution du malonyl dialdéhyde (Peroxyde lipidique), et en protégeant la composition hématologique, ceci en permettant une bonne régénération érythrocytaire et une prévention contre la leucopénie et la thrombopénie observées en présence des radicaux libres. (LAHOUEL 2004).

Les flavonoïdes ont une capacité à capturer et désactiver les radicaux libres (SIESS 2000, LOPEZ-LAZARO.2000). Cette activité antiradicalaire nécessite :

- Une structure orthodiphénolique du cycle B des flavonoïdes.
- Une double liaison en 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo, responsable de la délocalisation d'électrons.
- Les hydroxyles en position 3 et 5 qui permettent une activité antiradicalaire maximale. (LAHOUEL 2004).

1.5- Polyphénols en cosmétique.

Les polyphénols sont des colorants très importants dans le domaine cosmétique (GOFFART 2002). Leur diversité de couleur (jaune, vert, bleu, rouge, rose....) permet la production d'une large gamme de produits de maquillage, à savoir les rouges à lèvres et poudres maquillantes (fars à paupières, fars à joues.....etc).

De plus, ces composés sont capables d'activer la biosynthèse du collagène et de jouer un rôle imminent dans la lutte contre l'altération de ses fibres, ralentissant de ce fait le vieillissement et permettant le maintien du tonus musculaire.

En effet, rendu lipophile par estérification avec les acides gras, les polyphénols dérivés pénètrent l'épiderme et piègent les radicaux libres (ROULIER 2002, CASTIGNINO 2005). Mais malgré tous les avantages que peuvent fournir les polyphénols dans cette industrie, leur utilisation reste limitée en raison de leur instabilité (perte ou changement de couleur, oxydation....) vis-à-vis des facteurs physicochimiques (température, lumière, pH....) et de leur réaction avec les autres composés présents dans les produits cosmétiques. Ceci est notamment le cas des anthocyanes (GOFFART 2002)

2* Flavonoides et tannins : biosynthèse et importance:

2.1- Présentation :

2.1.1- Les flavonoïdes:

L'appellation "flavonoïdes " rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques. Ce terme est dû à leur couleur jaune (=flavus, en latin). D'ailleurs leur fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration (au delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes), même si leur présence est parfois marquée sous forme " Leuco ".

Les flavonoides sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois... certains sont plus spécifiques de certains tissus,

ex : les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales de fleurs.

2.1.1.1-Biosynthèse des flavonoïdes:

Les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbones (C) constitués de deux cycles en C₆ (A et B) reliés par une chaîne en C₃.

Leur biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun : la chalcone (HELLER 1993, GRISBACH 1982). Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action de l'enzyme chalcone isomérase en flavanone : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)- flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones : apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R)- dihydrokaempférol respectivement. Les deux enzymes citées fonctionnent différemment ; la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C₃. Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4- reductase, se métabolise en flavonol, kaempférol ou en flavan-3, 4- diol, leucoanthocyanidol respectivement. Ce dernier semble être le précurseur des flavan 3-ols et anthocyanidols.

Le pelargonidol, sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase se transforme en anthocyanoside: pelargonidol-3-glucoside (MARFAK 2003).

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

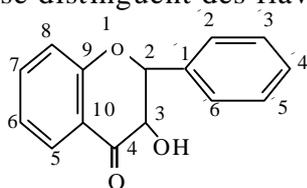
A l'état naturel, on trouve souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est dite : aglycone (MARFAK 2003). (figure 5).

2.1.1.2-Classification :

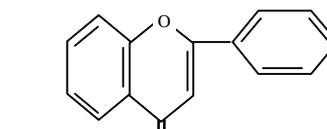
Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit :

Flavones et flavonols : le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C₅ et en C₇. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C'₄ ou di-substitué en C'₃' et C'₄' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃).

Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C₃. (figures 6, 7).



(figure7) : squelette des flavanols



(figure6) : squelette des flavones

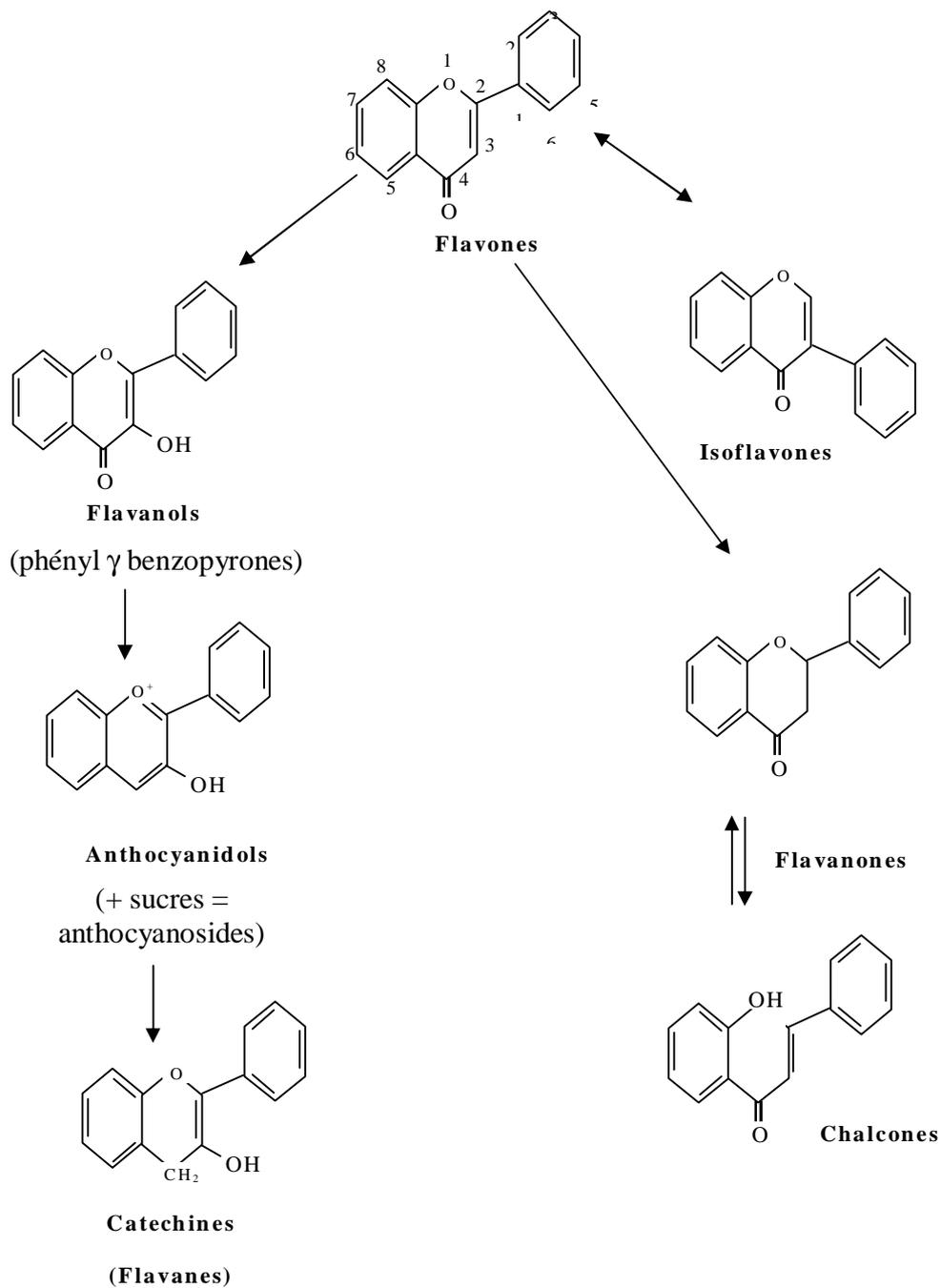
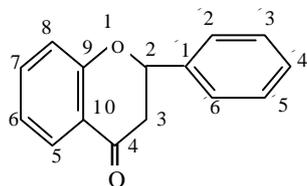


Figure 5 : Schéma de biosynthèse de différentes classes de flavanoïdes (WAWIZYNIAK 1999-2000).

Flavanones et hydroflavonols : se caractérisent par l'absence de la double liaison entre C₂ et C₃ et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites dans le paragraphe précédent.

Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C₃.

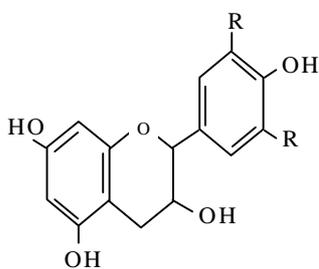


(figure8) : squelette des flavanones

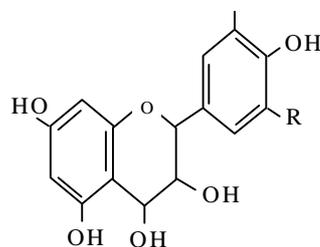
Flavan-3-ols, flavan-3, 4- diols et anthocyanidols : ces molécules sont toujours hydroxylées en C₃ et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C₄. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3, 4- diols).

Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C₃ dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3, 4-O-glucoside et le cyanidol-3-O-rutinoside ou keracyanine.

Les flavan-3-ols et les flavan-3, 4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés. (SEIGLER 1998). (figures 9,8 et 11).



(figure9) : squelette des flavan-3-ols



(figure10) : squelette des flavan-3,4-diols

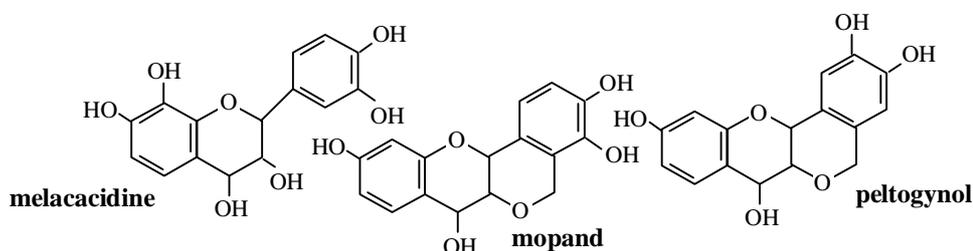
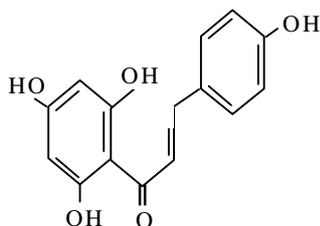


Figure 11 : Melacacidine, un flavan-3, 4 diol, et autres composés reliés. (SEIGLER 1998).

Chalcones et aurones : les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique, α,β insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone. (MARFAK 2003). (figure12).



(figure12) : squelette des chalcones

2.1.1.3-Intérêts des flavonoïdes :

Parmi les nombreux avantages de la présence des flavonoïdes dans notre alimentation, on cite:

- Inhibition des décharges de l’histamine, évitant ainsi la production des leucotriènes inflammatoires.
- Augmentation de la fluidité des membranes cellulaires.
- Réduction des réactions inflammatoires et des allergies.
- Rôles antiviraux, antitumoraux, anticancéreux.
- Renforcement du tonus et de l’élasticité des veines, surtout la diosmine et l’hespéridine qui améliorent la circulation périphérique, la résistance capillaire et la perméabilité vasculaire.
- Diminution des symptômes de ménopause comme les bouffées de chaleur et la sécheresse vaginale .Ce rôle a été observé surtout pour les isoflavones du soja. (NUTRANEWS 2005. JOURNAL OF UROLOGY 2002).

2.1.2- Les tannins :

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes (tannins condensés) et les dicotylédones (tannins hydrolysables) (SEIGLER 1998). Ces composés ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d’une protéine à une autre selon les degrés d’affinités (BLYTT et al. 1988, HAGERMAN 1989, HARBORN 1989, MOLE et WATERMAN 1987).

Le terme tannin vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d’animaux en cuir. (DICTIONARY AND ENCYCLOPEDIA 2005). Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et

bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 K Da (3000 pour les structures les plus complexes). (HAGERMAN ET BUTTLER 1981).

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (MITJAVILA 1980).

2.1.2.1-Types et structures :

Selon la structure, on a deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés, dits aussi : proanthocyanidines.

a/ Les tannins hydrolysables : sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate (généralement le glucose). On parle de gallotannins. Aussi des unités galloyles peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C₃ de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins.

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres).

L'acide gallique provient de la β-oxydation des composés C₆-C₃, comme l'acide coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Mais, l'acide shikimique est considéré comme le meilleur précurseur. (SEIGLER 1998). (figure 13).

b/ Les tannins condensés : ce sont des proanthocyanidines, composés phénoliques hétérogènes: dimères, oligomères ou polymères du flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols (BUFFNOIR 1998).

Ces composés ont tous comme précurseur des flavonoïdes C₆-C₃-C₆, et diffèrent entre eux par le type de liaison, les monomères de flavonoïdes impliqués, la position stéréochimique des carbones 2, 3 et 4, les hydroxylations et la présence ou non de substituants comme l'acide gallique.

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelpinidines. Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou des sucres, généralement en position 3 ou plus rarement en position 7. Ces monomères de prodelpinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocalatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine. (BUFFNOIR 1998).

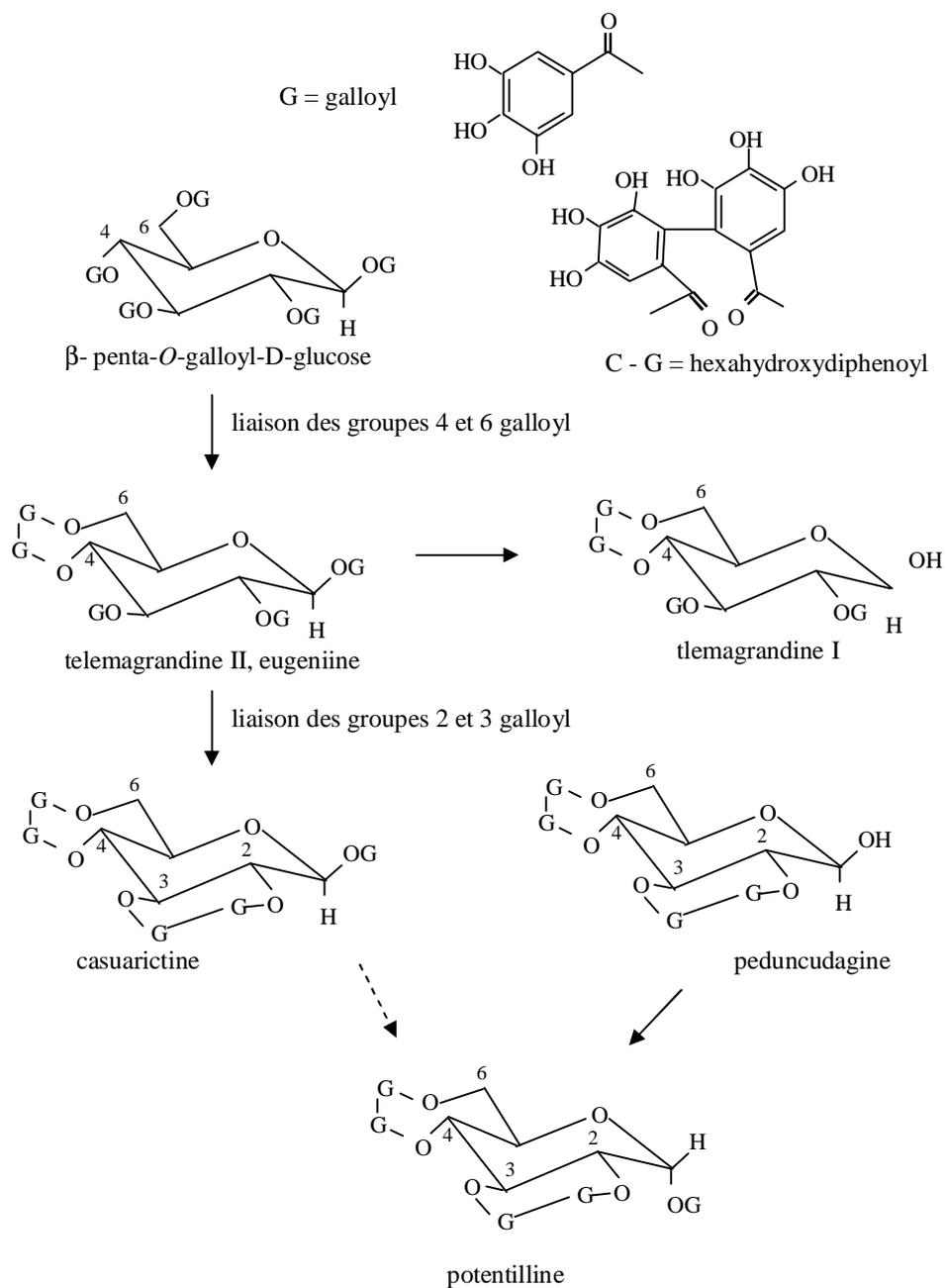


Figure 13: Ellagitannins formés par simple liaison des groupes galloyl. (SEIGLER 1998).

En s'hydrolysant, les tannins condensés ne donnent pas de composés simples comme le glucose ou les acides phénols comme c'est le cas pour les tannins hydrolysables, mais plutôt des anthocyanidines. (BUFFNOIR 1998).

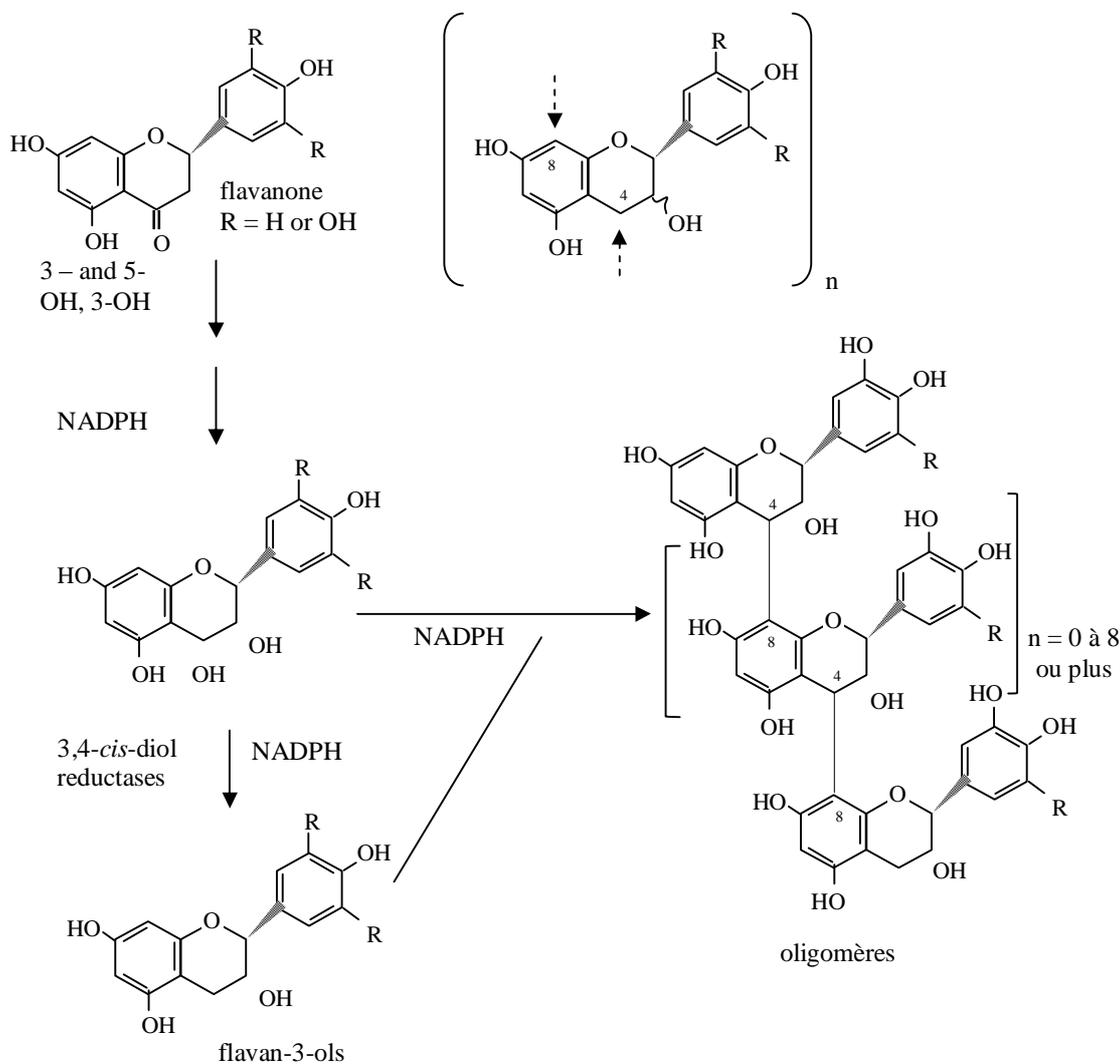


Figure 14 : proposition pour la biosynthèse des oligomères de procyanidines. (SEIGLER 1998).

2.1.2.2-Propriétés pharmacologiques des tannins :

Plusieurs observations, chez les humains comme chez les animaux de laboratoires suggèrent que les tannins exhibent un large spectre de propriétés pharmaceutiques, thérapeutiques et chimioprotectrices dues à leur propriété antiradicalaire (TOHGE 2005).

En effet, les tannins protègent contre les toxicités induites par différents agents (hydrogène peroxyde, acétaminophène, extraits contenus dans la fumés du tabac...), contre l'hypercholestérolémie et les changements de la formule sanguine (ALT, BUN et CK). (CHARUVANKY 2004).

Ils jouent aussi un rôle dans la prévention contre les deux formes de mort cellulaire connues ; apoptose et nécrose, diminuant ainsi les dommages causés dans le DNA lors de ces 2 dernières.

L'action cytoprotectrice des proanthocyanidines est supérieure à celle des vitamines C, B et bêta-carotène (RAY 2000).

2.2- Flavonoïdes et tannins comme antimicrobiens :

2.2.1-Activité antimicrobienne des flavonoïdes.

2.2.1.1- Activité antibactérienne des flavonoïdes :

Une activité antibactérienne est connue pour les flavonoïdes. En effet, ils sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (BABAYI 2004), *Escherichia coli* (ULANOWSKA 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ...(MODAK 2001, OKIGBO 2005, MAMATHA 2005, DIDRAK 1999).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Ex : l'apigénine ne montre une faible activité que contre *S.aureus* et la galangine une activité seulement contre cette même espèce (CUSHNIE 2003, BASILE 1999, MARTINI 2004).

Aussi dans certains travaux, il est cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95% sont actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60% de la même plante ne le sont pas, comme c'est le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *S.aureus*.(SLAVICA et al. 2004)

La diffusion radiale est souvent utilisée pour mettre en évidence cette activité, mais la mesure par le biais de cette méthode demeure difficile du fait que les zones sont parfois diffusionnelles (ILIC et al. 2004).

2.2.1.2-Activité antifongique des flavonoïdes :

Comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des plus récentes études sur cette activité est celle de ORTURNO (2005), qui démontre l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Cirtus parasidi* de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'héspéridine, la nobiletine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *P. digitatum*. (ORTURNO 2005).

Aussi, les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.* ont une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida zeylanoïdes*. (BATAWITA 2002).

D'autres flavonoïdes extraits de la poudre des inflorescences mâles de *Borassus dethiopum* ont une activité contre des dermatophytes comme *T. rubrun* grâce à des fractions flavoniques (GUANON 2003).

2.2.2- Activité antimicrobienne des tannins.

2.2.2.1- Activité antibactérienne des tannins :

Les tannins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certaines sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirio fibrisolvens*, *C.proteoclasterium* (LEITAO 2005, CHATTERJEE et al. 2004), Ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *E.coli*, *S.aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*.

L'inhibition bactérienne par les tannins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (SIVAKUMARAN 2004).

2.2.2.2- Activité antifongique des tannins :

Les tannins condensés comme les hydrolysables, ont une action inhibitrice contre les moisissures et les levures. Comme exemple, on a les proanthocyanidines du thé qui ont montré un rôle dans la protection de cette plante contre *Exobasidium vexans* (PUNYASIRI 2005), et les tannins hydrolysables des différentes plantes qui agissent contre une large gamme de champignons filamenteux (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum cassis*, *Trichophyton rubrun*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*,...) et de levures opportunistes (*Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus néoformans*...) (LATTE 2000).

Cette action antifongique est couramment utilisée pendant les opérations oenologiques lors de la manufacture des vins car les tannins polaires de ces derniers ont une grande capacité à se

fixer sur les champignons néfastes. (MAZANRIC 2005).

2.3- Désagréments causés par l'ingestion des tannins

2.3.1- Inhibition des enzymes digestives :

Les tannins sont capables de se lier aux enzymes digestives et de les inhiber. Plusieurs de ces polyphénols ont une action sur l' α -amylase (KANDRA 2004), l' α -glucosidase (DOUGALL 2005), les protéases (KICISKO 2004), la trypsine et les hémagglutinines (GILANI 2005, DE MEJIA 2005).

L'inhibition de ces enzymes cause un trouble de l'activité du tube digestif et diminue la valeur nutritive des aliments ingérés qui ne pourront pas être assimilés.

Deux extraits du sorgho et du mil chandelle ne présentent aucune activité inhibitrice contre l' α -amylase, alors que d'autres variétés du sorgho, de mil chandelles, de millet des oiseaux et d'éleusine présentent une activité appréciable ; ce qui indique que cette activité inhibitrice des enzymes digestives est propre seulement à certains composés phénoliques. (ONUAA. 1995).

2.3.2- Effets antinutritionnels des tannins :

Les tannins ont une grande capacité à se lier à d'autres molécules présentes dans l'alimentation : polysaccharides (pectines, xyloglucon, amidon, cellulose..... (LE BOUVERLLEC 2005, EUZEBY 2002), minéraux (fer, argent.... (CHAPLIN 1985)), vitamines, alcaloïdes (MITJAYILA 1980), mais surtout aux protéines (ZIMMER 1996, MERGHEM 1996).

Plusieurs études *in vitro* ont été menées sur cette action. Principalement par la diffusion radiale (HAGERMAN 1987) qui a démontré que les proanthocyanidines naturels ainsi qu'industriels (comme le quebracho) se liaient aux différents composés protéiques et glucidiques. La BSA (bovin serum albumin), le gluten, l' α -amylase et la bêta-galactosidase sont les principales protéines utilisées, et l'amidon ainsi que la pectine les principaux polysaccharides (GEDIR 2005).

Ces liaisons dépendent de plusieurs facteurs liés au milieu, à la structure des molécules combinantes (exemple : l'importance de la proline dans la structure des protéines) (ZIMMER 1996), comme à la nature hydrophile ou hydrophobe et à la concentration des tannins impliqués (ZHANG et al. 2002).

Il a été démontré que la liaison des protéines aux tannins dans le rumen cause une diminution

de la dégradation et de l'assimilation de ces protéines ce qui cause une perte de la valeur nutritive des aliments et provoque une malnutrition. A long terme, la grande teneur en tannins de l'alimentation cause chez les ruminants une perturbation de la microflore du rumen (et donc de son activité), une limitation de l'absorption du nitrogène, une diminution de l'ingestion et même une toxicité.

Chez certains animaux, la présence de microorganismes gastrointestinaux ayant une capacité à dégrader les tannins limite ces effets néfastes (c'est le cas de: *Streptococcus gallolytians*, *Lonepinella koalarum*, *Selemomona ruminantium*) (ZIMMER 1996, GOEL 2005, EUZEBY 2002). En réalité, ces microorganismes possèdent une enzyme dite: tannase.

Les effets antinutritionnels ont été observés aussi chez les rats, les poussins et le bétail. En effet, on a remarqué qu'une alimentation à teneur élevée en tannins a un effet négatif sur la digestibilité des protéines et des hydrates de carbone, et réduit la croissance, l'efficacité de l'alimentation, l'énergie métabolisable et la disponibilité biologique des acides aminés. (GILANI et al. 2005, ONUAA 1995).

La plante qui a permis de réaliser une grande partie de ces recherches est le sorgho brun. Etant riche en tannins, ses graines ont montré une résistance contre les oiseaux dévastateurs et les moisissures.

Au cours de la maturation, la graine du sorgho brun devient très astringente; cette qualité organoleptique est importante dans les régions arides et semi-arides où les autres cultures échouent (ONUAA 1995).

2.3.3-Présentation de la tannase :

La tannase ou tannin-acyl- hydrolase, E.C (3.1.1.20), est une enzyme permettant la dégradation des tannins, qu'ils soient condensés ou hydrolysables. Elle est optimale à 40°C, pH=6 et après 15 minutes d'incubation. Les ions métalliques comme le Zn, Mn, Cu, Mg, Fe inhibent son activité, seul le K l'augmente.

Elle est efficace sur un large intervalle de température et de pH ce qui permet son utilisation dans plusieurs processus industriels (SABU 2004).

La tannase n'est produite que par un nombre restreint de microorganismes (bactéries, moisissures, levures). Actuellement, plusieurs travaux portent sur sa production et sa purification à fin de pouvoir l'utiliser dans le domaine alimentaire. A cet effet, les

moisissures, étant très disponibles et faciles à cultiver, sont utilisées ; surtout les espèces d'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. (SABU 2004, MAKAPATRA 2005, PINTO 2001). Les aspergilles sont considérées comme les meilleurs producteurs de tannase (ALBERTSE 2002)

3* *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba* L. comme source de polyphénols :

3.1- Présentation et description :

3.1.1- Le romarin : *Rosmarinus officinalis* :

Le romarin est un arbrisseau de la famille des labiées (lamiacées), poussant à l'état sauvage sur le pourtour méditerranéen, en particulier sur sol calcaire. Il possède de nombreuses vertus phytothérapeutiques et est aussi une herbe condimentaire et une plante mellifère, ainsi qu'un produit utilisé en parfumerie. (WIKIPEDIA 2001).

Son nom signifie en latin Rosée de mer ; ros = rosée et marinus : = marin.

Description :

Le romarin peut atteindre jusqu'à 1,50m de hauteur. Il est facilement reconnaissable en toute saison par ses feuilles persistantes sans pétioles, coriaces, plus longues que larges, vert sombre luisant sur le dessus et blanchâtres sur le dessous. Leur odeur, très camphrée, évoque l'encens. La floraison commence en février et se poursuit jusqu'en juin. La couleur des fleurs varie du bleu pâle au violet (rarement on trouve des fleurs blanches, ex : *R.officinalis albiflorus*). Comme pour la plupart des lamiacées le fruit est un tetrakène (de couleur brune). (WIKIPEDIA 2001).

3.1.2- La fève : *Vicia faba* L. :

La fève est une légumineuse de la famille des fabacées. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées. Cette espèce s'accommode de tous les sols (sauf ceux trop secs), de préférence argilo-calcaires, profonds et frais. C'est une plante méditerranéenne.

Description :

Les tiges sont simples, creuses, carrées et dressées, tandis que ses feuilles sont composées, ovales, charnues, vert pâle à grises. Les fleurs sont de couleur blanche tachetée de noir ou de violet. Elles se disposent en petites grappes à l'aisselle des feuilles.

Cette espèce est cultivée pour ses graines renfermées dans des gousses charnues, vertes puis noires à maturité. Les graines sont grosses, aplaties et jaunâtres.

C'est l'une des plantes les plus anciennement cultivées, haute de 30cm à 1m suivant les variétés. Elle ne se trouve pas à l'état sauvage.

3.2- Diverses utilisations :

3.2.1- Diverses utilisations du romarin :

-Cuisine : Le romarin est un aromate apprécié, aux utilisations culinaires diverses. On l'emploie dans les ragoûts et les civets, les soupes, les marinades, sur les grillades sous forme de feuilles séchées. On s'en sert aussi pour parfumer les flans et les confitures. Mais, la crème de romarin reste de loin la forme la plus utilisée.

-Phytothérapie : Le romarin est réputé pour activer et faciliter les fonctions digestives, en particulier le travail de la vésicule biliaire (il est cholagogue, facilitant l'évacuation de la bile). Il est également antispasmodique, et son action stimulante sur le système nerveux permet de le recommander pour traiter les divers cas d'asthénie.

Ces propriétés phytothérapeutiques sont contenues dans les feuilles et les extrémités florales.

-Parfumerie : l'utilisation du romarin en parfumerie est très ancienne. L'essence est obtenue par distillation des feuilles des sommités fleuries. Cette plante est surtout utilisée dans la composition des parfums masculins. (WIKIPEDIA 2001, RODZOKO 1999-2000).

3.2.2- Utilisation de la fève :

La principale utilisation de *Vicia faba L* est alimentaire : les fèves se consomment crues, dans ce cas les gousses sont cueillies à demi-maturité, ou se conservent à sec, et là les gousses se récoltent quand elles sont noires.

Si la cuisson est insuffisante ou la consommation est excessive, cette plante provoque de graves affections, en raison des substances toxiques qu'elle contient (RENAUD et DUDONET 1996).

3.3- Constituants actifs :

3.3.1- Constituants de *R.officinalis* :

*Huile essentielle : 1,8 cinéole, alpha-pinène, camphre de romarin.

La constitution de l'huile essentielle varie selon la phase de développement et l'origine des feuilles utilisées pour l'extraction.

*Diterpènes : acide carnosolique, rosmadial.

*Triterpènes et stéroïdes : acide aléanolique, acide ursotique.

*Lipides : n-alkanes, isolalkanes, alkènes.

3.3.2- Constituants de *V.vicia L.*

La fève est essentiellement alimentaire, renfermant des acides aminés nécessaires et que l'on ne trouve pas dans les céréales.

Elle contient aussi des vitamines, ex : C, PP, B1, B2, A, E et divers minéraux dont le calcium, le cuivre, le fer, le magnésium...

Toutes ces propriétés lui confèrent des fonctions diurétiques, énergétiques, expectorantes, nutritives, reconstituantes et toniques.

3.3-Les polyphénols de *R.officinalis* et de *V.vicia L.*

3.3.1- Acides phénols et flavonoïdes de *R.officinalis* :

* **Acides phénols** : principalement l'acide carnosique, carnosol, acide rosmarinique.... Ils ont une grande action antimicrobienne qui change d'une variété à une autre du romarin. Ce qui témoigne du changement de la teneur en polyphénols. (MORENO 2006).

* **Flavonoïdes** : Cette plante est très riche en flavonoïdes, dont 07 sont principaux : lutéoline (03 structures connues : 3'-O-bétabéta-D-glucuronide, 3'-O-(4''-O-acyl)-bétabéta-D-glucuronide, 3'-O-(3''-O-acyl)-bétabéta-D-glucuronide), ériocitrine, hespiridine, diosmine, isoscutellarin 7-O-glucoside, hispidulin 7-O-glucoside, genkwanine.

Ces composés sont localisés dans les feuilles, les fleurs, les racines et les tiges. Leur concentration change durant l'évolution de la plante. La lutéoline 3-O-bétabéta-D-glucuronide qui a été longuement étudiée montre un pic de concentration aux environs de juin-août. Ceci indique qu'il y a une relation entre les phyto-régulateurs et les flavonoïdes (DEL BANO et al. 2004, OKAMURA 1994)

3.3.2-Tannins de *V. faba L.* :

Les tannins de *Vivia faba L.* sont en majorité localisés dans les téguments des graines.

Des études ont montré la présence de deux types principaux:

-Des molécules de flavan-3-ols : (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (+)-gallocatéchine, (-)-épigallocatéchine (MERGHEM 2004).

-Des molécules de flavan-3,4-diols : Principalement la leucocyanidine et la leucodelphinidine.

La nature des tannins de *V.faba L.* varie selon les variétés de l'espèce, sa maturité, sa localisation et ses conditions de croissance (UNUP 1986, DIXON 2005).

Partie 02 : Méthodes et applications :

1*Partie phytochimique :

1.1-Extraction des flavanoïdes :

Des extrémités fleuries de *Rosmarinus officinalis* ont été cueillies en mai 2005 de l'université de Constantine.

Classification classique du romarin:

Règne: Plantae.

Division: Magnoliophyta.

Classe: Magnoliopsida.

Ordre: Lamiales.

Famille: Lamiaceae.

Genre: *Rosmarinus*

Espèce: *Rosmarinus officinalis*.

Classification phylogénétique:

Ordre: Lamiales.

Famille: Lamiaceae.

Les flavanoïdes sont extraits de ce végétal séché et broyé (250g), par macération dans un mélange éthanol/eau (80/20 : V/V) équivalent à 2400ml. Cette macération se fait en trois temps, c'est-à-dire pendant trois jours successifs avec changement du solvant chaque 24h (2400=800 x 3). Ceci pour permettre une meilleure extraction des composés flavoniques.

Le volume total de ces macérations hydroalcooliques est filtré puis évaporé à sec sous agitation et chauffage réduit à 35°C (l'éthanol est très volatil) dans un rotavapor.

Le résidu sec est repris dans 200ml d'eau distillée bouillante qui aide à la récupération des composés restés accolés aux parois du ballon d'évaporation.

Une décantation de 24h est nécessaire pour éliminer les boues, graisses et résines risquant de gêner la suite des opérations, et récupérer une phase aqueuse limpide.

1.2-Extraction des tannins :

Le matériel végétal ici est les téguments de graines de *Vicia faba L. Seville* cueilli en 2000, séchés et broyés finement.

Classification classique de la fève:

Règne: Plantae.

Division: Magnoliophyta.

Classe: Magnoliopsida

Ordre: Fabales.

Famille: Fabaceae.

Genre: *Vicia L.*

Espèce: *Vicia faba L.*

Classification phylogénétique:

Ordre: Fabales.

Famille: Fabaceae

Les graines sont de couleur marron.

L'extraction des tannins à partir de 30g de téguments se fait avec un solvant acétone/eau (70/30 : V/V) de 350ml, en trois macérations successives de 24h chacune. On ajoute au solvant, avant chaque macération, 8ml d'une solution de métabisulfite de sodium (0.2%) pour éviter l'oxydation des tannins.

Le solvant est ensuite filtré avec du papier wattman et évaporé à sec dans l'évaporateur rotatif (rotavapor). Ce résidu sec est repris dans 300ml d'eau bouillante.

Après une décantation de toute une nuit, on récupère la phase limpide dégagée des produits impurs.

1.3-Affrontements :partitions entre solvants :

Cette étape permet de séparer les polyphénols selon leur structure et leur degré de polymérisation ; en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire :

-Affrontement avec l'éther du pétrole : permet d'extraire les impuretés (composés non phénoliques). Surtout les lipides qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques.

-Affrontement avec l'éther diéthylique : pour les extraits éthanoliques, cette étape permet d'isoler (de soutirer) les composés phénoliques simples tels que les acides phénols et les flavones lipophiles. Pour les extraits acétoniques, elle soutire les tannins monomériques.

-Affrontement avec l'acétate d'éthyle : entraîne les aglycones, les mono-O-glycosides et partiellement les di-O-glycosides présents dans les extraits éthanoliques. Et les tannins dimériques des extraits acétoniques.

-Affrontement avec le butanone (méthyl-éthyl-cétone (MEC)) et le butanol: cette étape n'est faite que pour les extraits acétoniques, permettant ainsi d'entraîner les tannins trimériques, oligomériques et une partie des polymériques. Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter. La phase aqueuse et le solvant (V/V) sont mélangés énergiquement en laissant sortir à chaque fois les gaz produits.

Après un repos d'une heure et demie, on récupère séparément la phase eau et le solvant utilisé chargé de ses composés spécifiques.

Pour chaque solvant (chaque partition), on refait deux à trois fois cette opération pour un entraînement optimal des groupes polyphénoliques séparés.

Les phases éther de pétrole ne renfermant pas de composés phénoliques sont rejetées. Quant aux autres phases, elles sont évaporées à sec avec le rotavap et reprises dans du méthanol (4 à 5ml) pour le diagnostic chromatographique.

On prend aussi 4 à 5ml des phases aqueuses restantes (après plusieurs lavages) contenant les flavonoïdes et les tannins non entraînés. (Figure 15).

1.4-Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince est une méthode facile à mettre en œuvre. Elle donne l'avantage de nécessiter peu de matériel et de fournir des résultats facilement interprétables et toujours très reproductibles. (X. Bataille 2000).

A l'origine, la CCM a été utilisée pour la séparation des substances colorées (d'où son nom). Aujourd'hui, elle est considérée comme une méthode puissante pour les analyses qualitatives et quantitatives.

Aussi, permet-elle de suivre l'évolution d'une réaction et de tester la pureté d'un solvant (V. Delmeyda 2001).

1.4.1-Principe de la CCM :

La séparation des constituants du dépôt se fait à l'aide de deux phases : une phase mobile qui est un solvant ou un mélange de solvants. Et une phase stationnaire qui est un adsorbant maintenu sur une plaque de verre ou de plastique rigide.

L'échantillon à analyser doit se trouver dans un solvant volatil (dans notre cas : le méthanol). Le dépôt se fait alors sur une extrémité de la phase stationnaire.

Les constituants de l'échantillon sont alors élués (entraînés) par la phase mobile qui monte par capillarité vers le haut de la plaque. (V. Delmeyda 2001).

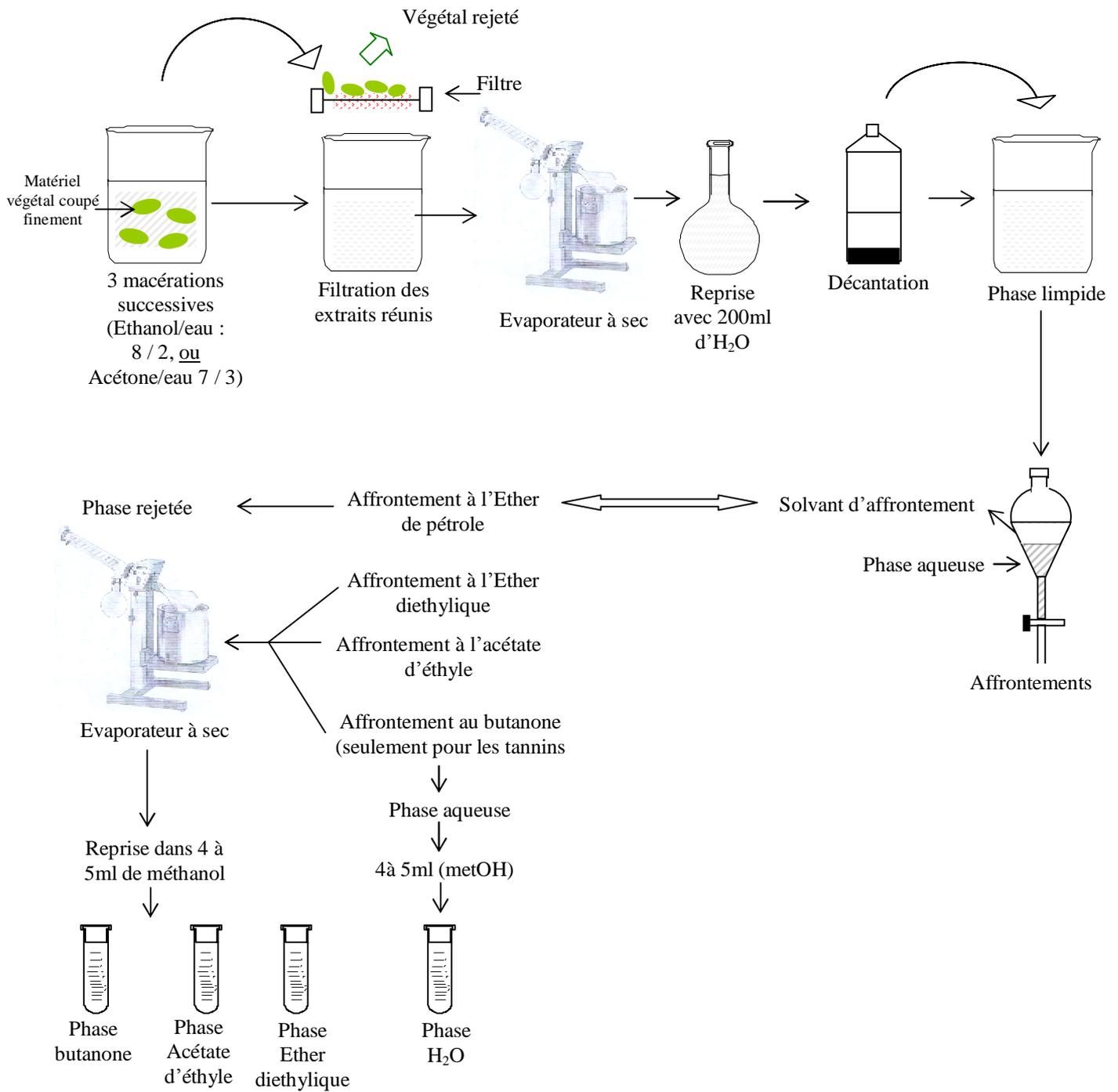


Figure 15 : Protocole d'extraction des flavonoïdes et tannins

1.4.2-Mode opératoire :

-Préparation de la phase stationnaire :

Pour la CCM des flavonoïdes, on utilise un gel de polyamide DC6. (Le polyamide forme des liaisons H avec les OH phénoliques des flavonoïdes, grâce à ses fonctions carbonyl-amide (GNU. 2006). Le gel est préparé en mélangeant 10g de poudre de polyamide dans 50ml d'éthanol. Après étalement du gel sur les plaques en verre et séchage, la phase stationnaire devient prête à l'utilisation.

Pour la CCM des tannins, on prépare un gel de silice en mélangeant la poudre de silice avec d'eau distillée (30g/60ml). Le dosage se fait ici par tâtonnement. Après étalement du gel sur les plaques en verre et séchage, ces dernières doivent être activées par chauffage dans une étuve à 100°C pendant 1 heure.

La silice est un adsorbant fort qui retient les composés polaires.

-Choix de la phase mobile (systèmes solvants appropriés) :

On essaie plusieurs systèmes solvants et on choisit ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations).

a/ Les systèmes essayés :

-Pour le support de polyamide :

Toluène / Méthyléthylcétone / Méthanol : 4 / 3 / 3.

Toluène / Ethanol / Méthanol: 4 / 3 / 3.

Toluène / Méthyléthylcétone / Ethanol : 2 / 1 / 1

Toluène / Méthyléthylcétone / Méthanol /Ether de pétrole : 6 / 1 / 1 / 1.

H2O/ Méthyléthylcétone / Méthanol /Acétylcétone : 12 / 3 / 3 / 1.

- Pour le support de silice :

Toluène / Acétone / Acide formique : 6 / 1 / 1.

Acétone / H2O : 55 / 45.

b/ Les systèmes choisis :

- Pour le support de polyamide :

Toluène / Méthyléthylcétone / Ethanol /Ether de pétrole : 2 / 1 / 1 / 1.

Ce mélange de solvants est utilisée pour la phase Ether diéthylique et la phase Acétate d'éthyle.

H2O / Ethanol / Methylethylcétone / Acide acétique : 13 / 3 / 3 / 1. Pour la phase eau.

- Pour le support de silice :

Toluène / Acétone / Acide formique : 6 / 6 / 1. Pour toutes les phases .

-Le dépôt :

Le dépôt se fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire (pipette capillaire) à usage unique (un capillaire pour chaque phase). Le capillaire doit être posé perpendiculairement et prudemment sur la plaque pour ne pas gratter le gel. On fait plusieurs dépôts du même échantillon au même endroit pour obtenir les produits séparés en grande quantité (ceci est nécessaire surtout lors de la CCM préparative). Il faut sécher après chaque dépôt avec un sèche cheveux, par exemple. (Figure 16).

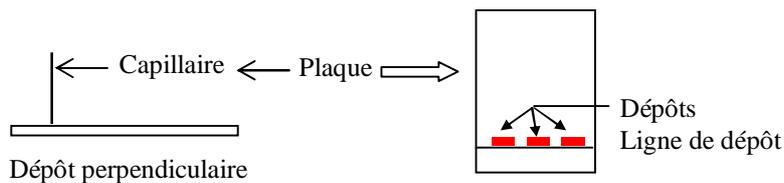


Figure 16 : Dépôt pour une CCM

-Développement des plaques :

Les plaques sont placées dans la cuve de CCM, quand cette dernière est saturée en vapeur de solvant d'éluion.

Le bord de la plaque où a été effectué le dépôt est trempé dans un fond du solvant approprié, en prenant soin d'éviter tout contact entre le dépôt de l'échantillon et le mélange de solvant.

Les différents constituants de l'échantillon déposé migrent avec des vitesses différentes. Dans le cas idéal, on obtient autant de tâches que les constituants sur le trajet de migration du solvant. (Figure 17).

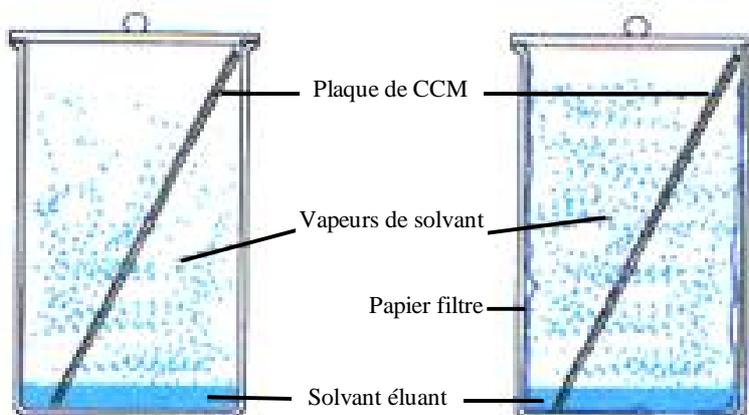


Figure 17 : Cuve de CCM

-Visualisation des tâches :

-La visualisation se fait :

-A l'œil nu.

-Avec un réactif spécifique de coloration (Ex : vanilline).

-Avec une lampe UV (254 et/ou 365nm)

-En utilisant des plaques contenant un matériau fluorescent (ex : silicate de zinc activé en manganèse) et visualisation à l'aide de l'UV : les constituants de l'échantillon désactivent la fluorescence et deviennent de ce fait facilement détectables.

Dans notre travail, la visualisation des tâches (spots) se fait sous UV à 254 et/ou 365nm dans une chambre noire.

Pour les tannins, on fait aussi une révélation des plaques analytiques avec de la vanilline/HCl et un chauffage à 80°C pendant 30min.

1.4.3-Première étape dans l'identification des flavanoïdes :

Les spots flavoniques représentant les constituants (du dépôt) séparés sont caractérisés par leur fluorescence (couleur) sous UV et leur facteur de rétention (Rf). (Figure 18)

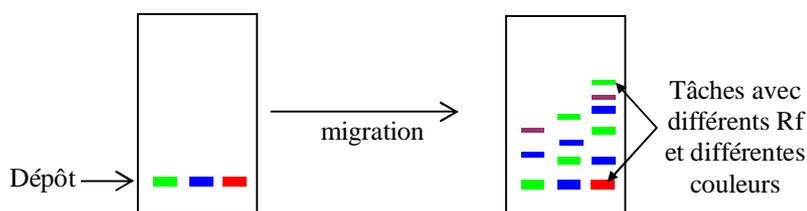


Figure 18 : CCM analytique

- Relation : structure – fluorescence :

L'examen sous lumière ultra-violette fournit des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. Il apporte des indications particulières concernant les substitutions.

Le tableau suivant résume les relations existant entre la structure d'un composé flavonique et sa fluorescence sous UV.

Spots colorés	Types de flavonoïdes
Noir	flavonols 5, 6, 7 tri - OH libres
	flavonols 5, 7, 8 tri – OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	flavones 5-OH et 4' –OH

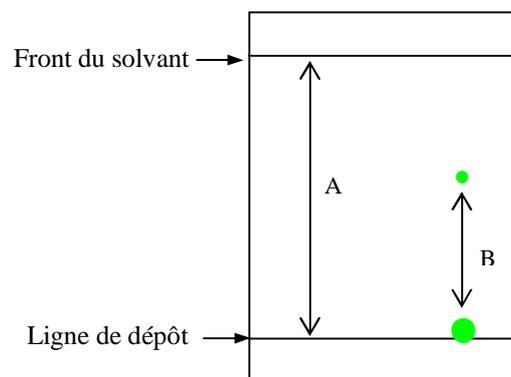
	flavones 3-OR et 5-OH, 4' -OH
	flavones ou flavonols 5 -OH avec 4' -OH absent ou substitué en 3
	flavones 6- ou 8-OH
	Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones
Bleu clair (fluorescent)	flavones sans 5 - OH libre
	flavonols sans 5 -OH libres avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune orangé	flavonols 3 -OH libre avec ou sans 5 -OH substitué
Jaune vert brillant	5 -OH libre ou 5 -OH substitué
Jaune fluorescent	flavonols avec 3 -OH libre
Jaune pâle	Dihydroflavonols

Tableau 1 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Lahouel, 2005).

-Relation : structure –Rf :

les relations existant entre le Rf et la structure des molécules apportent aussi des renseignements sur la structure des polyphénols. Le comportement chromatographique en fonction de la composition moléculaire dans un solvant alcoolique ou aqueux permet de mentionner les premières indications concernant la substitution de squelette de la molécule.

$$R_f = \frac{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et la tâche du produit}}{\text{Distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant}} = \frac{A}{B}$$



Structure flavonique	Rf (rapport frontal – facteur de rétention)
Augmentation des OH	Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	Rf augmente dans un solvant aqueux Rf diminue dans un solvant alcoolique.
Hydroxyles méthylés	Rf augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C ₅	Rf diminue dans un solvant alcoolique
Métersides de flavones avec 3 –OH libre	Rf nul dans l'eau

Tableau 2 : Relation entre le Rf et la structure. (A.Yaou 2001).

1.5- Chromatographie sur couche mince préparative :

Elle permet la séparation d'une grande quantité de polyphénols afin de réaliser des études spectrales (spectroscopie IR, UV, spectrométrie de masse...).

Elle se fait sur des plaques de CCM de 20x20cm. Le dépôt se fait le long des plaques . Pour chaque phase, on prépare 05 plaques.

La migration est réalisée avec les mêmes systèmes solvants que pour la CCM analytique (CCM précédente).

Les polyphénols séparés se présentent alors, sous UV, sous forme de bandes continues et parallèles allant d'une extrémité de la plaque à l'autre. (Figure 19).

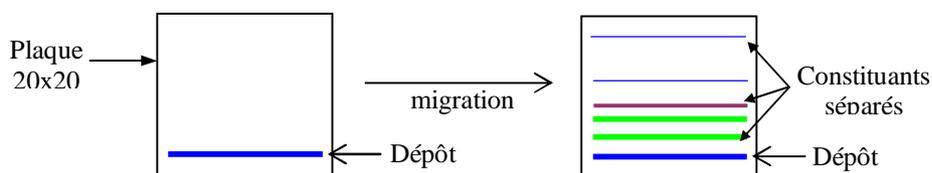


Figure 19 : CCM préparative

Quand une tâche est bien localisée sur la plaque, on gratte le gel à son niveau et on le dissout dans du méthanol afin de séparer la tâche du gel.

1.6-Filtration des solutions du gel :

La filtration des solutions méthanoliques des parties du gel grattées permet de séparer les polyphénols de ces dernières sur lesquelles elles se sont absorbées lors de la migration du système solvant.

Les solutions de gel sont mises dans des seringues reliées à des filtres. Ces derniers retiennent le gel en laissant passer le méthanol chargé des polyphénols séparés. Les solutions méthanoliques obtenues alors sont prêtes pour les séries spectrales (identification spectrale). (Figure 20)

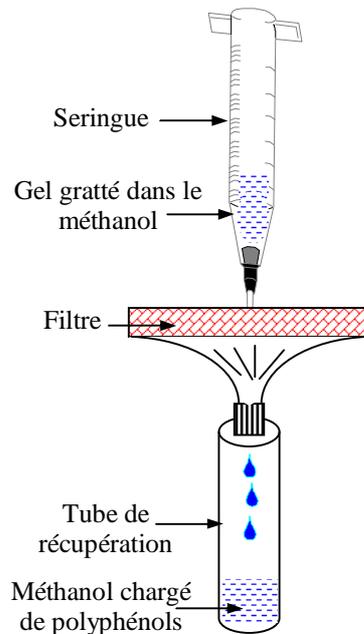


Figure 20 : Système de filtration

1.7-Spectrophotométrie UV-visible :

L'ultraviolet (UV) utilisable en analyse s'étend de 190 à 400nm, et le Visible (Vis) de 400 à 800nm environ. (V. Delweyda 2000).

1.7.1- Définition de la Spectrophotométrie :

C'est une exploitation quantitative et qualitative des interactions pouvant exister entre une matière (atomes, ions, molécules...) et les rayonnements UV-Vis qui la traversent.

Cette interaction est, plus exactement, l'absorption des rayonnements par les matières étudiées. (V. Delweyda 2000).

1.7.2- Principe :

Quand un faisceau lumineux traverse une solution colorée avec une substance à doser, la solution absorbe la lumière de couleur complémentaire à la sienne. La variation de l'intensité lumineuse produite alors nous permet de mesurer la concentration selon la loi de Beer-Lambert :

$$DO = \epsilon_{\lambda} \cdot e \cdot c, \text{ sachant que :}$$

$$DO = Abs = \log I_0/I$$

DO : Densité optique

Abs : Arborescence

I_0 : Intensité de la lumière incidente : 100%

I : Intensité de la lumière émergente : % de I_0 .

e : Epaisseur de la cuve (en cm)

c : Concentration de la solution en mole/l.

ϵ : Coefficient d'absorption moléculaire spécifique de λ .

Pour une spectrométrie, on utilise une lumière sensiblement monochromatique comme les lampes halogènes qui donnent des longueurs d'ondes dans le domaine UV-Vis.

Cette analyse est intéressante du fait qu'elle permet de travailler sur de faibles concentrations et est non destructive vis-à-vis de l'échantillon. (M. D. Gentry 2001).

1.7.3-Applications quantitatives :

Sont très importantes, se font en appliquant la loi de Beer-Lambert. Généralement, pour ces applications, on utilise des cellules dont le trajet optique est de 1cm pour faciliter les résultats et minimiser les risques d'erreurs.

Deux cas sont possibles :

-La substance a un ou plusieurs pics d'absorption caractéristiques dans l'UV-Vis. On fait alors un étalonnage direct.

-La substance à doser n'a aucun pic caractéristique. Et là, on effectue une réaction colorée permettant le dosage. (l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration de l'échantillon). (M.D. Gentry 2001).

1.7.4-Applications qualitatives :

Les spectres UV-Vis fournissent des informations sur la structure moléculaire, mais sont surtout utilisés pour une confirmation ou une identification grâce à des règles empiriques et à la comparaison avec des spectres de référence. (M. D. Gentry 2001).

Dans le domaine UV-Vis, les longueurs d'ondes correspondent à des différences d'énergies ($dE = E_2 - E_1 = hc/\lambda$) qui affectent la région des transitions électroniques = passage d'une orbitale d'énergie E_1 à une orbitale d'énergie E_2 plus élevée. Le retour de l'état excité à l'état fondamental se fait par restitution sous forme de lumière et d'E absorbée. (M. D.Gentry 2001).

Chaque groupe de molécules (de structures) a un spectre caractéristique permettant son identification. Le spectre d'absorption UV-Vis des composés flavoniques dans le méthanol présente deux maximums ou pics : le premier se situe entre 320 et 380nm et correspond au cycle B de la molécule (forme cinnamoylé).

Le deuxième se situe entre 240 et 270nm, il correspond au cycle A (forme benzoyle). (N. Heimeur. 2004).(Figure 21)

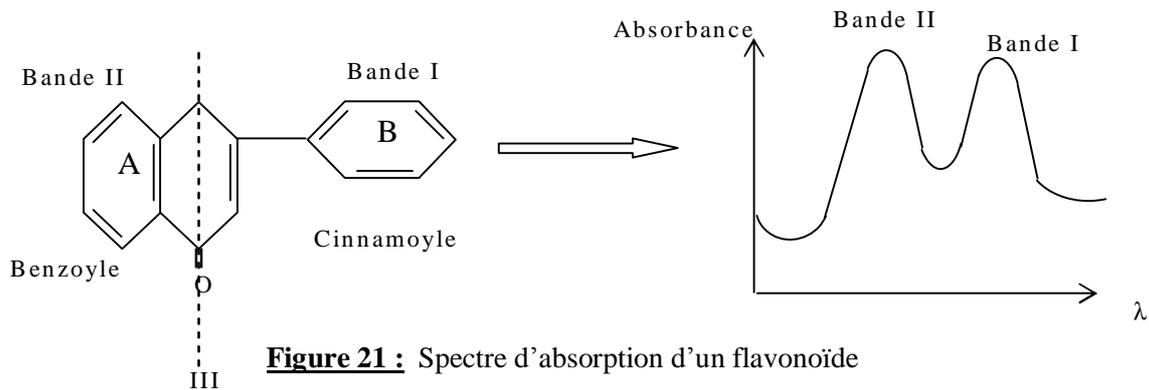


Figure 21 : Spectre d'absorption d'un flavonoïde

Les pigments flavoniques donnent des spectres susceptibles d'être modifiés en présence de réactifs ionisants ou chélatants, comme l' AlCl_3 , le NaOH ... La bonne interprétation de ces modifications combinée à celle des R_f et fluorescences permet une approche structurale parfois totale.

Le spectre d'absorption dans l'UV-Vis des tannins est, quant à lui, situé entre 250 et 300nm. Il se caractérise par un seul pic aux environs de 270-280nm. (R.A.Ananias et al. 2001). (G. Dutruc-Rosset 2002).

1.7.5-Terminologie utilisée en spectrophotométrie UV-Vis :

*Groupement chromophore : groupements insaturés covalents responsables de l'absorption.

*Groupement auxochrome : groupements saturés qui, quand il sont liés à des chromophores, modifient la longueur d'onde et augmentent l'intensité de l'absorption.

*Effet bathochromique : déplacement des bandes d'absorption vers des longueurs d'ondes plus grandes. (\neq hypsochromique).

*Effet hyperchromique : augmentation de l'intensité d'absorption. (\neq hypochromique).

Chromophores Elémentaires	l nm
> C=C (alcène)	173
c]C (alcyne)	178
C=O (cétone)	290
CH=O (aldéhyde)	279
COOH (acide)	208

CoCl (Chlorure d'acide)	220
CONH ₂ (amide)	220
COOR (Ether)	211
NO ₂ (nitro)	214
N=N (azométane)	338

Tableau 3 : Exemple de quelques principaux chromophores (Biologie et Multimédia 2006).

1.7.6-Série spectrale des flavonoïdes :

Cette série de mesures spectrophotométriques en ajoutant des réactifs ionisants ou chélatants permet principalement de préciser la présence ou l'absence des substitutions sur le squelette flavonique de base.

- Première série :

- On tire le spectre de la solution méthanolique obtenue après grattage du gel et filtration. Si la concentration est importante, on fait des dilutions avec le méthanol.
- On ajoute à cette solution se trouvant dans la cuve du spectrophotomètre une pincée de NaOAc et on mélange.
- Toujours à cette même cuve, on ajoute 2 gouttes d'une solution d'acide borique (H₃BO₃) à 5%.

- Deuxième série :

- On prend un échantillon de la même solution méthanolique initiale et on tire le spectre d'absorption.
- On ajoute à cette solution, 5 gouttes d'une solution méthanolique de AlCl₃ à 5%.
- On ajoute encore une goutte d'une solution HCl 2 fois normale.

- Troisième série :

- On tire le spectre toujours de la même solution flavonique.
- Après l'addition d'une goutte d'une solution NaOH normale, on tire le spectre immédiatement puis après 5 minutes.

Les flavonoïdes, comme la majorité des composés aromatiques sont chargés de différents groupements chromophores qui lorsqu'ils se conjuguent aux réactifs de la série spectrale causent des déplacements spectraux bathochromiques,

hyperchromiques, hypsochromiques ou hypochromiques (Biologie et multimédia 2006). (Figure 22).

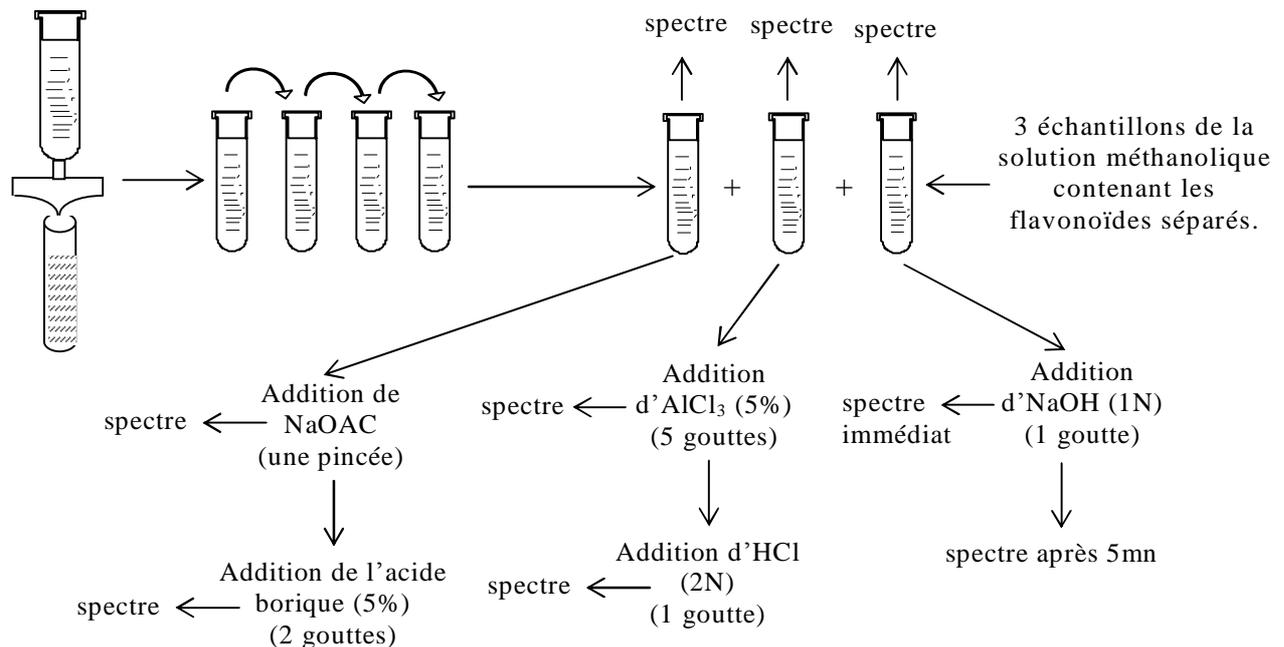


Figure 22 : Protocole de la série spectrale

1.8-Dosage des tannins :

Objectif :

Notre objectif de cette expérience est de déterminer la proportion des différents tannins présents dans les échantillons obtenus après affrontement à l'éther, l'acétate, le MEC, le butanol et l'H₂O.

Définition de la méthode :

On utilise la méthode de dosage Butanol/ HCl décrite par Bath Smith (1975). Cette méthode sert à déterminer la teneur en tannins condensés. Ces derniers en chauffant le mélange butanol/ HCl, se scindent par hydrolyse acide coupant les liaisons C₄C₈ qui lient les monomères tanniques entre eux et produisent ainsi des anthocyanes colorées facilement quantifiées.

Protocole :

On prend la même quantité des échantillons obtenus (des 05 phases) à fin de ne pas fausser les proportions des résultats.

Le réactif de dosage est préparé en mélangeant 95ml de butanol avec 5ml d'HCl.

On prend 0,5ml de chaque échantillon auquel on ajoute 4,5 ml du réactif Butanol/HCl. On obtient alors des dilutions 1/10.

Deux répétitions pour chaque phase sont nécessaires pour confirmer les résultats obtenus.

Suivant le même principe, on fait une série de dilutions jusqu'à l'obtention des dilutions 1/20 pour la phase éther qui paraît peu chargée et 1/30 pour les autres phases.

On met les solutions dans un bain-marie à ébullition pendant 2 heures à 90°C puis on refroidit avec de l'eau pour stopper les réactions d'hydrolyse.

2*Activité antibactérienne des polyphénols extraits :

Cette activité est mise en évidence par la méthode de diffusion sur gélose utilisée par (S.B. Ilic 2004). Cette méthode nous permet de déterminer la sensibilité ou la résistance des bactéries aux polyphénols, mais elle est peu efficace pour mesurer l'action inhibitrice de ces derniers.

Le principe de cette méthode est à l'origine même des tests d'antibiogrammes. En effet, lors de ces tests, les disques sont imprégnés d'antibiotiques et déposés sur la surface des milieux de cultures solidesensemencés.

Dès l'application des disques imprégnés de principes actifs (dans notre cas les polyphénols), ces derniers diffusent de manière uniforme si bien que les concentrations sont inversement proportionnelle à la distance des disques (JP. Euzeby. 2005). D'où le problème des zones d'inhibitions diffusionnelles difficiles à mesurer.

L'inhibition, quand elle est présente, se manifeste par des zones de stérilité autour des patchs imprégnés de principes actifs. Ces zones sont dites : zones d'inhibition. Leur diamètre nous permet d'évaluer le degré d'action des composés traités sur la croissance des bactéries.

2.1-Variante de cette méthode :

Deux variantes de cette méthode sont souvent utilisées :

- La méthode des puits : des trous circulaires sont découpés dans la gélose. On y verse les solutions contenant les principes actifs. L'inhibition, ici, est calculée par mesure de la distance entre la limite de la zone d'inhibition et le bord du réservoir (du puit).

L'inconvénient de cette méthode est qu'il est difficile de mettre toujours la même quantité de solution dans les puits . Hors des erreurs minimales de l'ordre du microlitre peuvent influencer énormément le diamètre de la zone d'inhibition.

Aussi, il y a le risque de débordement.

- La méthode des réservoirs : dans cette méthode, au lieu d'appliquer des patchs ou de découper des trous, on dépose des réservoirs cylindriques contenant la solution active de concentration connue sur la surface d'agar.

Cette méthode est plus difficile et délicate à mettre en œuvre que les autres, mais offre l'avantage de faciliter la mesure de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice). (M. L. Malignetter-Muller 1995).

2.2-Standardisation :

Pour faciliter cette méthode et obtenir des résultats interprétables, il faut :

- Utiliser des milieux qui permettent la croissance de nombreuses bactéries, et ne contiennent aucun inhibiteur ou antibiotique risquant d'influencer les résultats. Généralement, on utilise le milieu Müller-Hunton enrichi de 5% de sang de mouton pour les streptocoques, et de 10% de sang de cheval pour les *Helicobacter* .

Pour les anaérobies, on remplace Müller-Hunton par une gélose Wilkins Chalgren additionnée de 5% de sang de mouton.

Lors du manque de milieu, on peut faciliter ce travail en utilisant la gélose nutritive.

- Le pH doit être compris entre 6 et 7,4 (reproduisant au mieux le milieu interne du corps animal).

- L'épaisseur de la gélose conditionne la concentration de la source du polyphénol. Elle doit être de 4mm.

- La température et la durée d'incubation doivent être fixes pour tous les germes, généralement 35 à 37°C pendant 18 à 24h dans une atmosphère normale. (JP. Enzéby. 2001).

2.3-Bactéries étudiées :

On a décidé de mener notre étude sur des bactéries pouvant être pathogènes pour l'homme. Ceci pour mettre en évidence quel intérêt médical et bactériologique peuvent avoir les flavonoïdes et les tannins présents dans notre alimentation.

* *Proteus mirabilis* : Est un bacille Gram négatif, présent dans l'intestin de l'homme. Il est pathogène opportuniste, notamment chez les individus hospitalisés, cathétérisés ou présentant des anomalies des voies urinaires.

Les infections urinaires sont les plus fréquentes. Elles résultent soit d'une infection systémique soit d'une infection ascendante au cours de laquelle les bactéries colonisent étape par étape l'urètre, la vessie, l'artère et finalement les reins (J.P.Enzéby. 2006).

***Staphylococcus sp. coagulase (+) :** Les staphylocoques sont des cocci Gram positif, causant des infections bactériennes sévères dont la prévalence est particulièrement élevée en pathologie infectieuse. Il colonisent la peau et les muqueuses, causent des intoxications, des infections urinaires et dans certains cas l'endocardite infectieuse (prolifération des germes au niveau des lésions cardiaques organiques préexistantes).

Les difficultés thérapeutiques résultent de la multirésistance aux antibiotiques des souches hospitalières. (El Solh Nevine 1999) (Vulgaris 2005-2006).

***Escherichia coli :** Est un hôte normal de l'intestin de l'homme. Certaines souches sont inoffensives alors que d'autres possèdent des germes en plus les rendant capables de provoquer des diarrhées, des infections urinaires et des septicémies.

Aussi, il est nécessaire de signaler qu' *E.coli* reste considérée comme l'un des agents les plus connus causant des infections nosocomiales.

2.4-Protocole d'application :

- Récolte et préparation des souches tests :

Les bactéries proviennent du CHU de Constantine. Ces souches sont ensemencées dans des bouillons et incubées à 35°C pour optimiser leur croissance.

- Préparation des disques (patches) :

Des disques de 0,5mm de diamètre sont découpés sur du papier Wattman et autoclavés pendant 20 minutes à 120°C dans 10ml d'eau distillée.

Les disques sont trempés ensuite dans les principes actifs considérés.

- Les Principes actifs :

On désigne par les termes « principes actifs » les flavonoïdes et les tannins extraits de *R.officinalis* et *V. faba. L.* respectivement.

Pour ces tests antimicrobiens, on utilise les phases : Eau, Ether diéthylique et Acétate d'éthyle de chaque plante. Ces phases sont évaporées à sec dans le rotavapor et lavées 03 fois avec l'eau distillée.

Les produits de chaque phase sont repris dans 4ml d'eau distillée. Pour chaque nouvel extrait, on fait deux dilutions. On arrive à trois concentrations décroissantes = $C_{initiale}$, $C_{i/2}$ et $C_{i/4}$. (d0,d1,d2)

- Témoin :

pour vérifier la bonne mise au point de cette méthode, on prépare des disques témoins imprégnés de méthanol et on les applique sur 03 boîtes de pétri ensemencées par *E. coli*, *Staphylococcus sp* et *P. mirabilis* respectivement.

- Application :

Nos bactéries sont ensemencées à partir du bouillon nutritif (BN) sur des boîtes de pétri contenant la gélose nutritive (GN). L'ensemencement se fait par étalement de quelques gouttes de BN sur la gélose avec un râteau.

Les disques imprégnés de polyphénols sont alors appliqués sur la surface de la cellule et les boîtes de pétri sont incubées à 35°C pendant 24h.

3*Précipitation des macromolécules nutritives par les tannins :

3.1-Objectif :

Dans cette expérience, on teste la précipitation du BSA (Sérum Bovin Albumin), du gluten, et de l'amidon causé par les extraits de *V. faba L.* Ceci pour mettre en évidence l'action antinutritionnelle des tannins condensés, sachant que ces derniers ne sont dégradables que par un petit groupe de microorganismes absents chez l'homme. Donc l'élimination de ces polyphénols du corps entraîne avec elle les composés qui s'y lient (surtout les protéines) qui en temps normal ont une grande valeur nutritive.

3.2-Définition de la méthode :

Cette méthode a été utilisée pour les tannins par Hagerman (1987) et a été ensuite reprise par plusieurs travaux.

Avec cette méthode, on peut tester la combinaison de différents composés aux substrats se trouvant dans le milieu gélosé.

Elle est basée sur la diffusion des molécules utilisées dans un gel d'agar ou d'agarose. La combinaison des molécules testées se traduit par une précipitation dans les régions de contact. On parle des zones d'inhibition.

Initialement, la diffusion radiale était utilisée en immunologie pour détecter la présence des antigènes et anticorps dans un milieu, ou pour tester l'affinité qu'ils ont l'un pour l'autre.

Pour les tests immunologiques, la précipitation peut se faire sur milieu liquide ou solide.

Les milieux liquides permettent surtout la mise en évidence de la combinaison des deux composés étudiés, alors que les milieux solides apportent en plus la possibilité de mesurer le taux de cette dernière.

3.3-Les substrats utilisés :

- **BSA** : Bovin Sérum Albumin. Elle est considérée pour signifier l'albumine du sérum ou l'albumine du plasma.

Les albumines ont une basse teneur en tryptophane et méthionine et des teneurs élevées en cystine, acide, aspartique, acide glutamique, lysine et arginine (G.L.Fridli 1996).

- **Gluten** : est une protéine végétale répandue surtout dans le maïs. Elle est très utilisée dans le domaine alimentaire, plus spécialement en panification ou elle sert à faire monter les pâtes.

Un grand nombre de personnes est allergique au gluten.

- **Amidon** : est un polysaccharide polymère de glucose très répandu dans l'alimentation.

L'amidon est un mélange d'amylose linéaire (résidu de glucose unis par des liaisons α (1, 4)) et d'amylopectine ramifiée (résidu de glucose unis par des liaisons α (1, 4), mais avec quelques points de ramifications α (1-6)). (B. D. Hames. 2000).

L'élimination de l'amidon causée par sa liaison aux proanthocyanidines cause la perte d'une quantité énorme d'énergie.

3.4-Protocole :

On prépare des solutions aqueuses d'agar (1% : on cherche un gel mou) qu'on porte à ébullition pour permettre la solubilisation de l'agar.

Les composés dont on teste la précipitation sont ajoutés (3%) à la solution précédente : l'amidon peut s'ajouter avant le chauffage de la solution du gel ; alors que pour les protéines, il est nécessaire d'attendre un refroidissement presque complet après l'ébullition.

Les mélanges sont ensuite versés dans des boîtes de pétri stériles où on les laisse gélifier. Pour un meilleur résultat, on met ces boîtes au réfrigérateur pendant 24h à 4°C.

Des patches de 5mm sont stérilisés comme pour les tests antimicrobiens (à l'autoclave :120°C pendant 20min).

Après leur refroidissement, ils sont imprégnés des extraits tanniques : phase H₂O, phase Ether diéthylique et phase Acétate d'éthyle ,avec trois dilutions pour chaque phase : dilution initiale, dilution 1/2, dilution 1/4. (do,d1,d2)

Après application des patchs sur les gels, on ferme les boîtes de pétri avec du parafilm et on les incube à 30°C pendant 72h. (Figure 23)

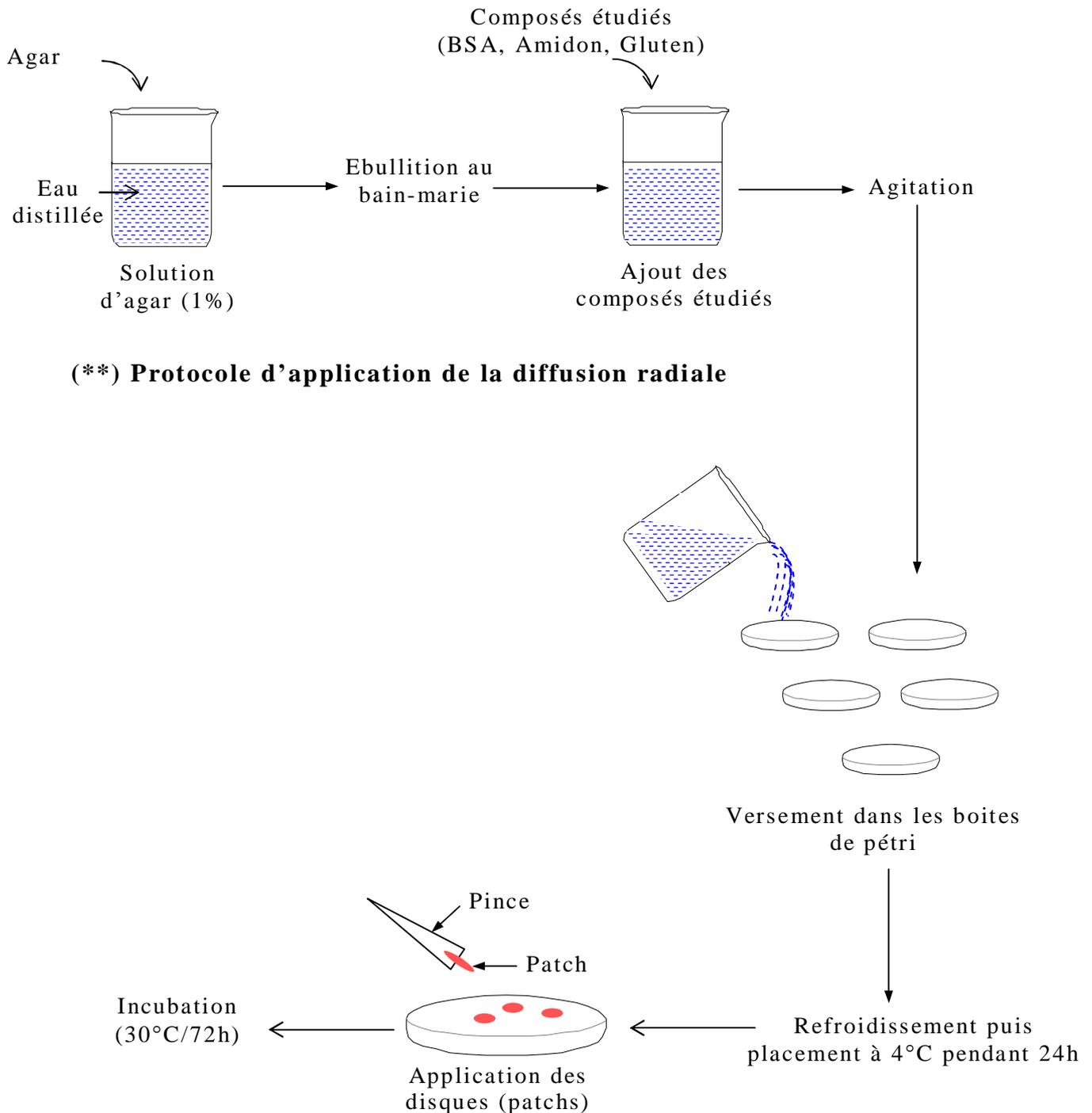


Figure 23 : Protocole d'application de la diffusion radiale

G. Remarque :

On peut réaliser dans cette expérience différemment : on prépare une solution d'agar (toujours pour un gel mou) qu'on ne mélange pas cette fois avec les substances étudiées.

Les principes actifs ainsi que ces substances sont ajoutés au gel sous forme de solutions déposées dans des trous. Ces trous sont formés par un capillaire de 0,5 à 1mm de diamètre.

Un trou central est nécessaire pour le principe actif et six trous périphériques pour les substances. Les zones de précipitation apparaissent alors sous différentes formes. Cette méthode est dite alors : diffusion radiale bidimensionnelle (diffusion du principe actif et des composés étudiés).

(Figure 24)

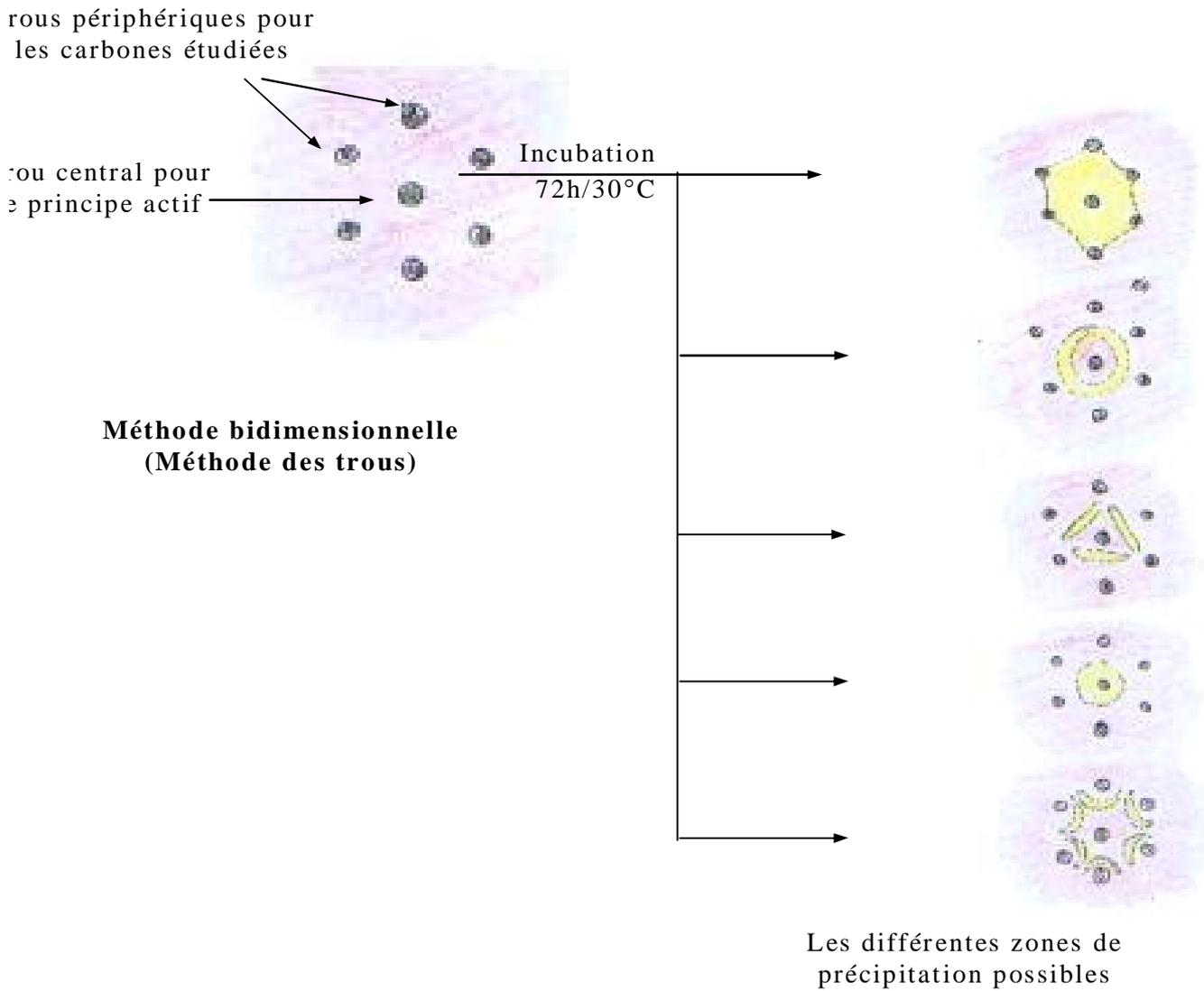
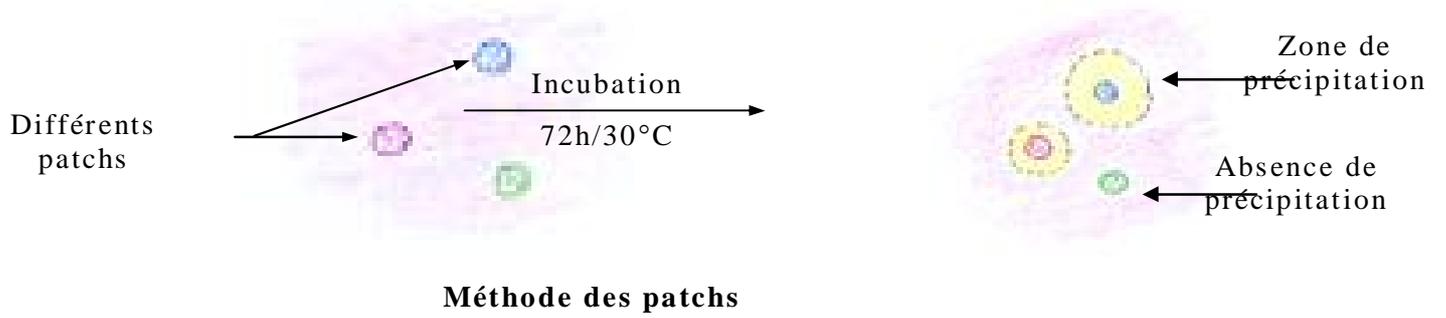


Figure 24 : Les deux méthodes de la diffusion radiale

4*Dégradation des tannins condensés par les moisissures :

3.1-Objectif :

Notre objectif est d'isoler quelques moisissures du sol capables de dégrader l'acide tannique, qui est un tannin hydrolysable similaire par ses caractéristiques aux tannins condensés et de tester ensuite leur croissance sur des milieux ne contenant que du Quebracho et du Tannin châtaigner (polymères de catéchines industriels) comme seule source de carbone.

3.2-Origine des moisissures :

Les moisissures étudiées sont isolées d'un sol de la wilaya de Jijel (plus exactement El-Ouana) planté de *Quercus suber* connu pour son écorce riche en tannins condensés (Khenouf 2004).

3.3-Prélèvement :

On mélange 1g de sol avec 50ml d'eau distillée dans un erlenmeyer, on agite pendant au moins 5min. On fait trois dilutions en prélevant à chaque fois 0,5ml de la solution précédente avec une pipette pasteur et en ajoutant 4,5ml d'eau distillée. Avec la dernière dilution, n'ayant pas une grande charge microbienne, on ensemence deux boites de pétri contenant de la gélose Sabouraud spécifique aux champignons, l'incubation se fait à 35°C pendant 72 heures.

3.4-Isolement des moisissures :

On prélève deux mycéliums ayant montré une croissance prédominante dans les boites précédentes et on les isole avec plusieurs repiquages, toujours sur milieu Sabouraud.

L'aspect macroscopique de ces deux mycéliums nous laisse supposer qu'il s'agit d'un *Aspergillus* et d'un *Penicillium*. Et l'observation microscopique nous le confirme.

En effet, on a un *A. niger* et un *Penicillium sp.*

3.5-Ensemencement des milieux spécifiques :

- Milieu spécifique avec de l'acide tannique :

Ce milieu spécifique (milieu A) a été utilisé par (GAS. Pinto 2001). Il ne contient que de l'acide tannique comme source de carbone.

Chacun des deux mycéliums isolés précédemment est ensemencé sur des boites de pétri contenant le milieu A. On incube ces boites à 32°C pendant 72 heures. (GAS. Pinto 2001).

- Milieu spécifique avec du Quebracho et du Tannin Châtaigner :

On considère que les espèces qui croient sur le milieu A sont pourvues d'une tannase et sont de ce fait susceptibles de croître sur des milieux contenant le Quebracho et le Tannin châtaigner (Milieu B et C respectivement) à la place de l'acide tannique.

Donc, on prélève les mycéliums ayant montré une croissance sur le milieu A et on les ensemence sur B et C, ceci tout en les réensemencant toujours le milieu A et le milieu Sabouraud pour une étude comparative.

Les milieux B et C proviennent d'une modification du milieu A. On les prépare avec les mêmes constituants que ce dernier sauf pour la source de carbone qu'on change de l'acide tannique, au Quebracho, puis au Tannin Châtaigner.

Les boîtes de pétri contenant les milieux A, B et Censemencés par les espèces considérées sont alors incubées, toujours à 32°C pendant 72h. (Figure 25)

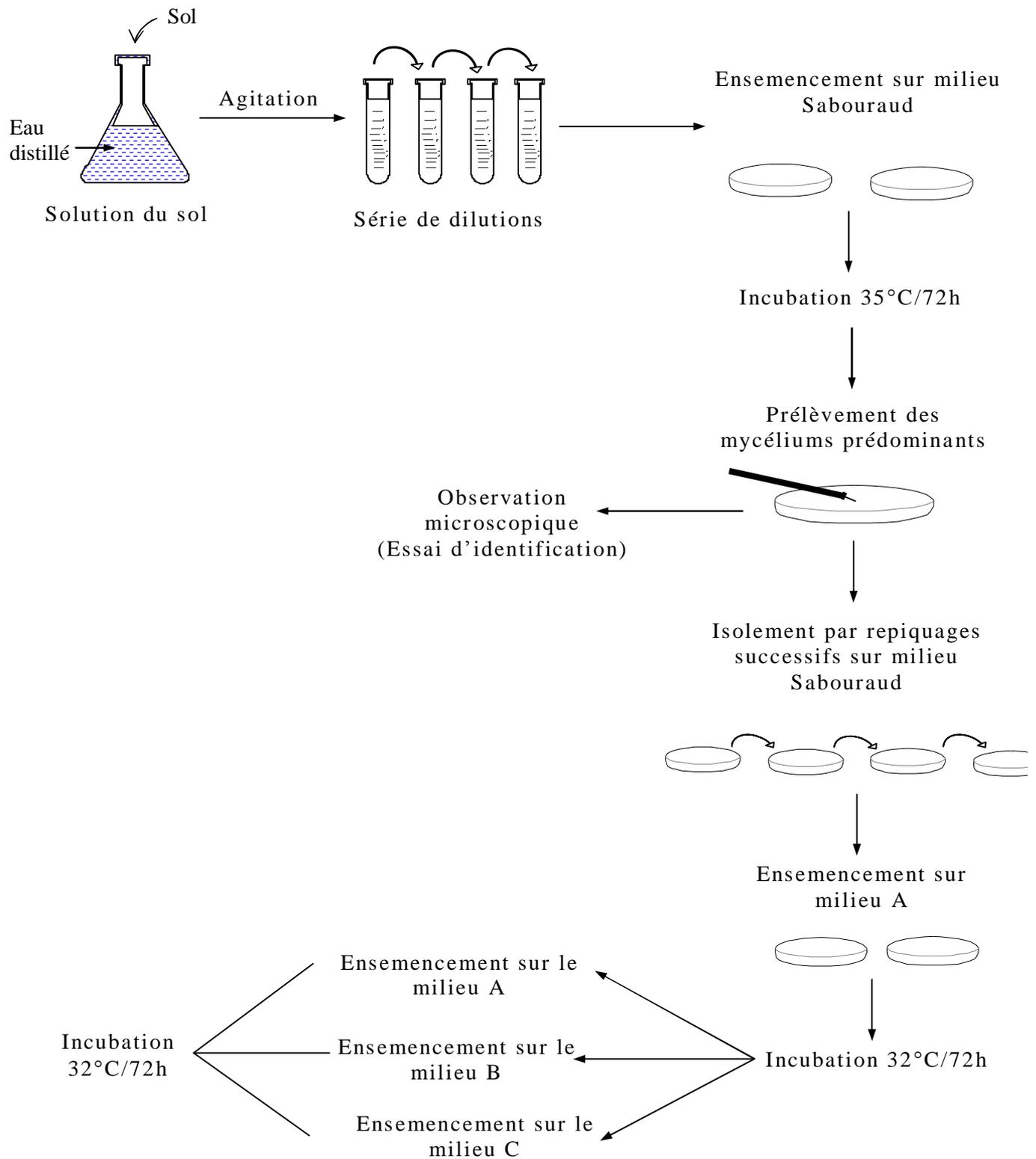


Figure 25 : Protocole d'isolement des champignons dégradant les tannins condensés

5* Mesure de l'activité antiradicalaire :

Objectif :

Dans cette partie, on teste l'action des échantillons flavoniques et tanniques sur le DPPH à fin de savoir s'ils ont un rôle antiradicalaire (scavenging activity).

Méthode :

Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable qu'on utilise pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponse à des stress externes ou internes .

On utilise comme extraits actifs les 03 phases flavoniques de *Rosmarinus officinalis*, les 05 phases tanniques de *Vicia faba L.* et les deux spots « 7 et celui du dépôt » de la phase acétate flavonique (présents en quantité suffisantes).

Ces extraits sont évaporés à sec à fin de connaître leurs poids secs respectifs puis repris dans l'éthanol de telle sorte à avoir des concentrations 1g/l pour chacun.

Protocole :

On prépare une solution éthanolique de DPPH 1 molaire . On mesure l'absorbance de 1,5 ml à $\lambda = 517$ nm (longueur d'onde d'absorption du DPPH), puis on ajoute 15 μ l. de l'extrait testé. La lecture se fait alors chaque 15secondes jusqu'à stabilité de l'absorbance.

Comme témoin, on utilise la quercétine sous forme de solution 1 molaire.

Le pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait est calculé comme suit :

$\% inh = (ABS_{DPPH} - ABS_{finale} / ABS_{DPPH}) * 100$, (Bolskakova IV. 1998) avec :

$\% inh =$ Pourcentage d'inhibition du DPPH.

ABS_{DPPH} : Absorbance du DPPH à 517 nm

ABS_{finale} : La valeur stable de l'absorbance après l'ajout de l'extrait.

6*Analyse statistique:

On réalise une Anova (analyse des variances) pour traiter les résultats obtenus dans les parties: antimicrobienne et précipitation des macromolécules.

Cette analyse nous permet de savoir s'il y a oui ou non des interactions entre les différents paramètres pris en considération (phases, dilutions, plantes et microorganismes) et de les classer en groupes homogènes. L'analyse DIA nous permet une bonne appréciation des actions produites par l'interaction de des deux paramètres différents.

Le logiciel utilisé est STAT-ITCF: version 4-copyright @ 1987-1988.

Partie 03 : Résultats et discussions :

1*Partie phytochimique :

1.1-Les échantillons obtenus après l'extraction :

Après les extractions et les partitions entre solvants, les phases éther diéthylique, acétate d'éthyle, méthyléthylcétone, butanol et H₂O sont évaporées à sec et reprises dans 5ml de méthanol.

Une partie de ces échantillons est consacrée aux épreuves chromatographiques, à l'étude spectrale et aux expériences de dosage. A chaque échantillon tannique recueilli, on ajoute 2 gouttes d'une solution méthanolique de métabisulfite de sodium (0,02%) pour éviter l'oxydation au contact de l'oxygène et de la lumière.

L'autre partie est évaporée à sec puis lavée plusieurs fois à l'eau distillée afin d'éliminer toute trace du méthanol. Elle est consacrée aux expériences antibactériennes et précipitation des protéines. Ici, l'addition du métabisulfite de sodium est inutile, vu que les échantillons sont utilisés immédiatement après les affrontements et que ce composé risque de fausser les résultats en se liant aux macromolécules lors de la diffusion radiale ou en inhibant la croissance des bactéries étudiées.

1.2-Chromatographie analytique sur couche mince :

La CCM analytique des extraits flavoniques est réalisée sur le gel de polyamide DC₆ avec le système solvant : Tol/MEC/EtOH/EP (2/1/1/1).

Ce dernier permet une bonne séparation des constituants du dépôt pour la phase éther diéthylique et acétate d'éthyle.

Surtout pour la deuxième qui donne autant de tâches que de produits constituants du dépôt (tous les spots obtenus y compris le dépôt se sont avérés être des flavonoïdes, dont certains sont plus purs que d'autres). La phase H₂O est moins bien séparée avec ce système. On refait donc la CCM pour cette phase avec des systèmes à base d'H₂O pour séparer les glycosides qu'elle contient. Le système choisi est le suivant : H₂O/EtOH/MEC/AcOH : 13/3/3/1.

- Sous UV dans une chambre noire, on remarque que la phase éther diéthylique donne 6 spots bien distincts. La phase acétate d'éthyle 7 spots et la phase H₂O 6 spots aussi, la fluorescence et les R_f de ces tâches sont résumés dans le tableau suivant :

Acétate		
Spots	Rf	fluorescence
1	0,713	Violet marron
2	0,653	Violet light
3	0,593	Violet +++
4	0,48	Violet light
5	0,44	Violet ++
6	0,307	Violet +++
7	0,027	Jaune vert light
Dépôt	0	Violet

Solvant : 2/1/1/1
Tol/MEC/EtOH/EP
UV : $\lambda = 365\text{nm}$

Tableau 04: Résultats de la CCM analytique.

Ether		
Spots	Rf	Fluorescence
1	0,828	Jaune vert
2	0,786	Violet marron
3	0,743	Violet light
4	0,464	Violet
5	0,121	Violet foncé
6	0,035	Violet jaune
Dépôt	0	Vert marron

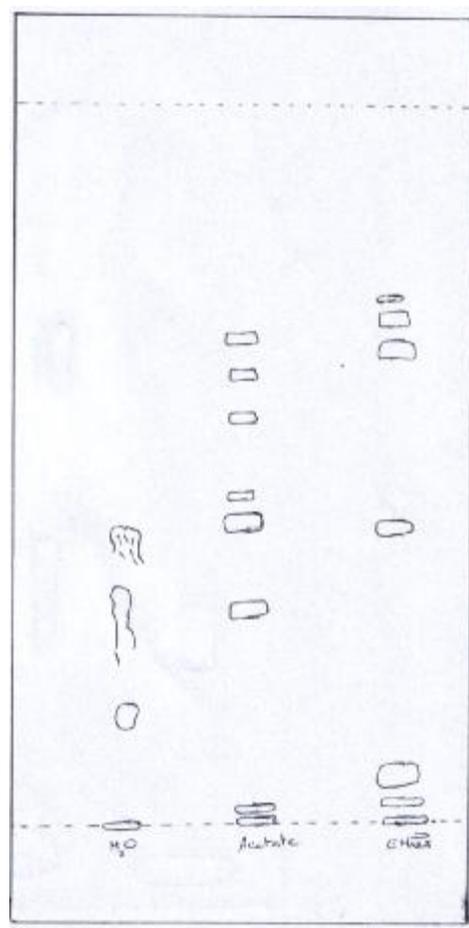
Solvant : 2/1/1/1
Tol/MEC/EtOH/EP
UV : $\lambda = 365\text{nm}$

H ₂ O		
Spots	Rf	fluorescence
1	0,893	Marron brun
2	0,771	Violet ++
3	0,586	Violet +
4	0,286	Marron
5	0,207	Bleu light
6	0,057	Jaune marron
Dépôt	0	Brun

Solvant : 13/3/3/1
H₂O/EtOH/MEC/AcOH
UV : $\lambda = 254\text{nm}$

De ces résultats, on remarque que la phase acétate d'éthyle a une constitution flavonique plus homogène (presque tous les spots sont violets) et plus riche comparée à celle des phases éther diéthylique et H₂O.

La meilleure séparation du dépôt de la phase H₂O dans le système solvant : 13/3/3/1 (H₂O/EtOH/MEC/AcOH) confirme qu'elle contient principalement des glycosides (plaque 1).



Plaque 1 : CCM analytique des flavonoïdes de *R. officinalis*

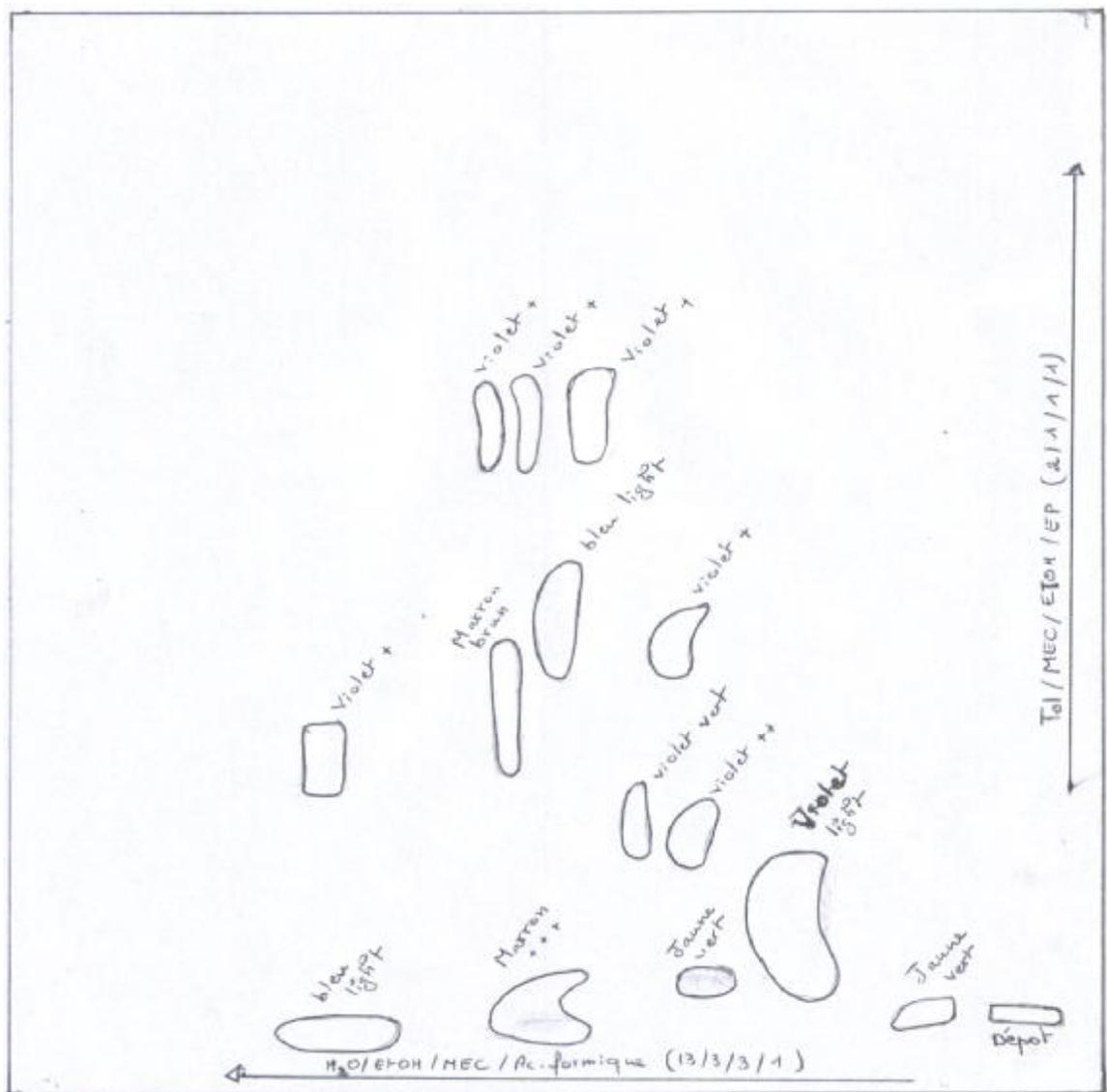
1.3-Chromatographie bidimensionnelle des flavonoïdes :

Cette CCM nous permet d'avoir une empreinte flavonique des extraits de *Romarinus officinalis*.

Sur une plaque de polyamide (20x20cm), le dépôt se fait sur le bas droit de la plaque sur une longueur de 1cm.

La séparation est réalisée en deux dimensions : la première avec le système : Tol/MEC/EtOH/EP (2/1/1/1) entraînant les aglycones et la deuxième avec le système : H₂O/EtOH/MEC/AcOH (13/3/3/1) entraînant les glycosides.

On obtient alors le cartogramme suivant :



Plaque 2 : CCM bidimensionnelle des flavonoïdes de *R. officinalis*

1.4-Chromatographie préparative sur couche mince :

Conservant toujours les mêmes systèmes solvants, on prépare pour chaque phase 5 plaques de polyamide (20x20cm). Ceci afin de récupérer de grandes quantités de flavonoïdes pour les études spectrales.

Après grattage des spots et filtration, on obtient des solutions méthanoliques (5ml chacune) dont les couleurs varient du transparent au marron passant par le jaune et le jaune vert.

L'étude spectrale de ces solutions nous permet d'apprécier la pureté et la propreté de ces échantillons.

1.5-Analyse spectrale UV-Vis :

Dans le domaine [UV-Vis], les solutions méthanoliques de la phase éther diéthylique donnent pour la majorité un seul pic situé entre 203 et 207nm et qui est parfois accompagné d'un épaulement.

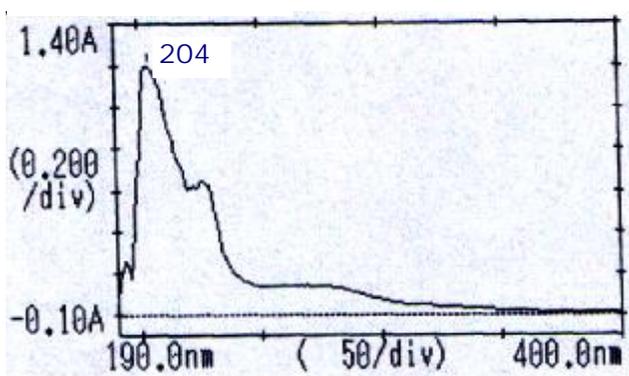
Ceci nous permet d'en déduire que cette phase ne contient pas de flavonoïdes (sauf un seul correspondant au 3^e spot) et de supposer que peut être ces pics représentent des acides phénols.

Les solutions méthanoliques de la phase acétate se sont révélées pour la plupart des solutions flavoniques donnant deux pics caractéristiques dans le domaine [250-400]nm. Les spots donnent des pics plus distincts (donc plus purs).

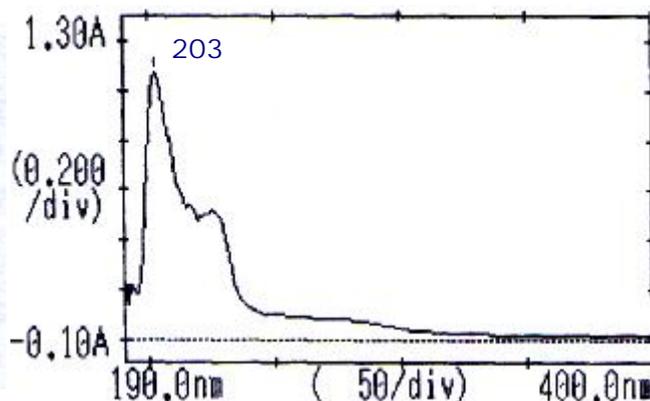
Les spots de la phase eau donnent des spectres caractéristiques des flavonoïdes mais dont les pics, non bien distincts, témoignent de l'impureté des solutions flavoniques et peut être même de la saleté de cette phase qui peut contenir encore des restes de lipides, boues, résines...

Après avoir tiré tous les spectres méthanoliques de ces trois phases, on décide de réaliser la série spectrale pour ceux qui se révèlent plus nets et en quantité suffisante. A savoir, les spots 2, 5, 6, 7, le dépôt de la phase acétate d'éthyle et les spots 1 et 5 de la phase H₂O.

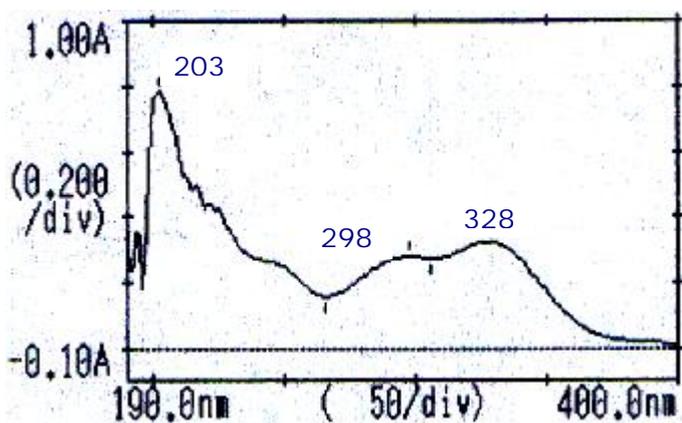
Remarque : les spectres tirés après l'ajout du AlCl₃ et l'HCl ne sont pas pris en considération, du fait que l'AlCl₃ utilisé est non anhydre donnant les mêmes spectres que les solutions initiales. Notre analyse repose donc sur les informations apportées par la première et la troisième série seulement.



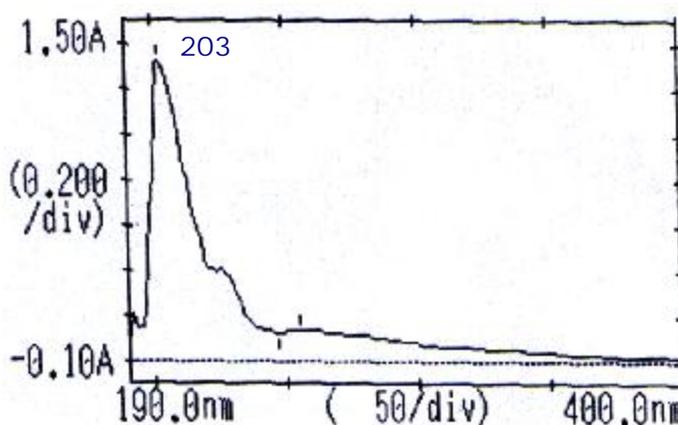
Spot 1



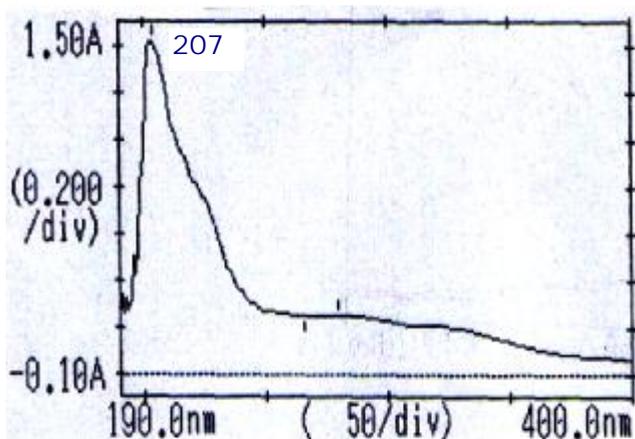
Spot 2



Spot 3



Spot 4



Spot 5

Figure 26 : Spectres méthanoliques des spots de la phase éther

1.6-Résultats de l'analyse spectrale :

1.6.1- Le dépôt de la phase acétate :

La série spectrale de ce spot nous donne les résultats suivants :

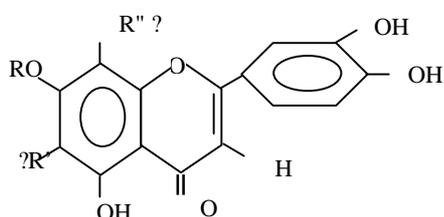
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	285	330
NaOH	275	390
NaOAc	284	329
NaOAc + H ₃ BO ₃	256 (286)	347

Le spectre méthanolique nous donne deux bandes uniques respectivement à 285nm et 330nm. Toutes deux caractéristiques d'une flavone au noyau A polysubstitué. (VOIRIN 1983).

L'addition du NaOH donne un effet bathochrome et hypochrome de la bande I sans apparition de bande entre 320 et 335, indiquant l'absence d'OH en 3' et 4' et la présence d'un OR en 7. (MARKHAM 1982).

L'addition du NaOAc ne provoque pas d'effet bathochrome de la bande II comparée au spectre méthanolique : on a un OR en 7. Puis, l'ajout du H₃BO₃ donne un déplacement bathochromique (17nm) indiquant la présence d'un ortho di-OH en 3' et 4'.

On suppose donc une schématisation de la molécule comme suit :



Le OH en 3 est confirmé par la fluorescence violette sous UV. Cette structure milite pour une **lutéoline** ; molécule très répandue chez *Rosmarinus officinalis*. (OKAMURA 1994).

1.6.2-Le spot 7 de la phase acétate :

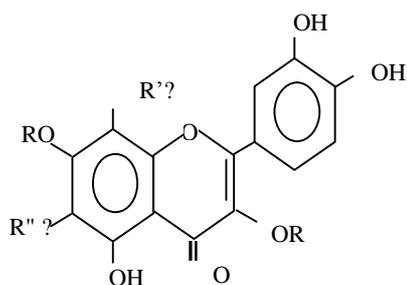
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	290	330
NaOH	269	382
NaOAc	289	328,5
NaOAc + H ₃ BO ₃	290	338

Le spectre de cette phase nous donne dans le méthanol une bande II à 290nm indiquant que la noyau A est polysubstitué. La bande I à 330nm et la fluorescence jaune vert light sous UV laisse opter pour une flavanol 3-OR. (MARKHAM 1982).

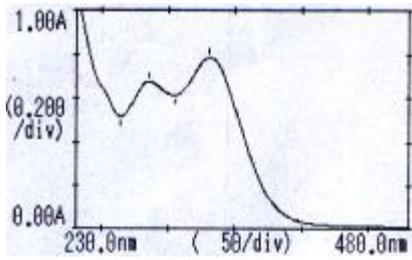
Les effets bathochrome et hyperchrome de la bande I et la stabilité du spectre en présence du NaOH sont en faveur d'un OH libre en 4'.

L'ajout du NaOAc ne donne aucun effet sur la bande II informant de la présence d'un OR en 7. Le NaOAc additionné de H₃BO₃ montre un déplacement bathochromique de la bande I comparé au spectre méthanolique témoignant de la présence d'un ortho di-OH en 3' et 4'.

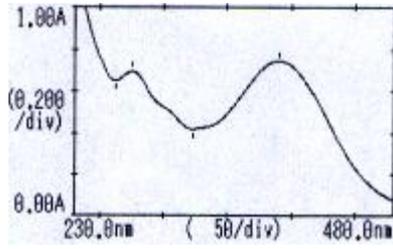
On suppose donc que cette molécule à la structure suivante :



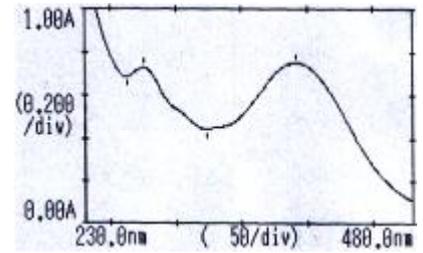
Vu que le noyau A est polysubstitué, au moins l'un de R' et R'' est présent, sinon les deux. Mais la structure de base reste celle d'une **quercétine** connue chez cette plante (DEL BANO 2004).



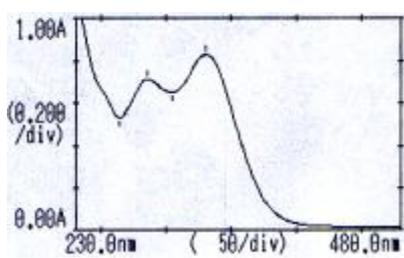
MeOH



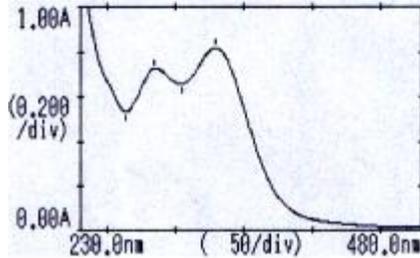
NaOH



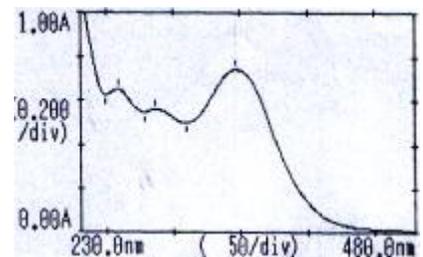
NaOH + 5 min



MeOH

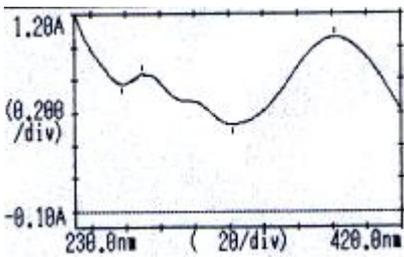


NaOAc

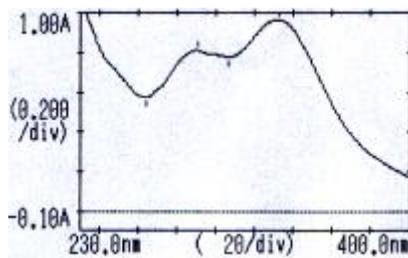


NaOAc / H₃BO₃

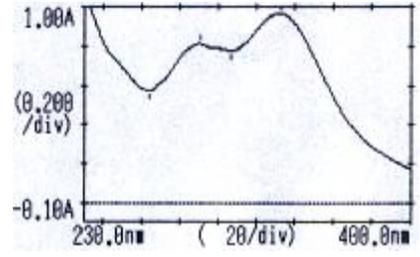
Figure 27 : Analyse spectrale du dépôt de la phase acétate



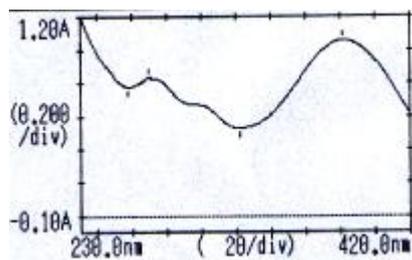
MeOH



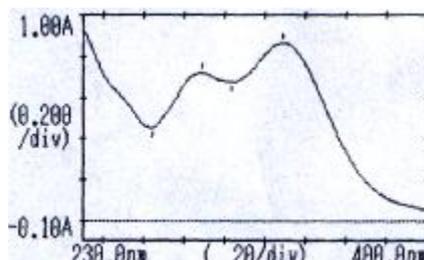
NaOH



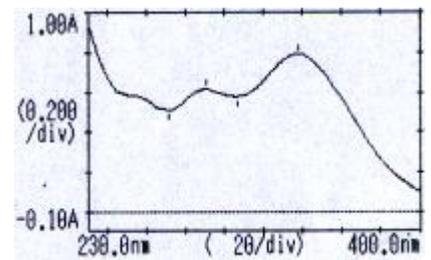
NaOH + 5 min



MeOH



NaOAc



NaOAc / H₃BO₃

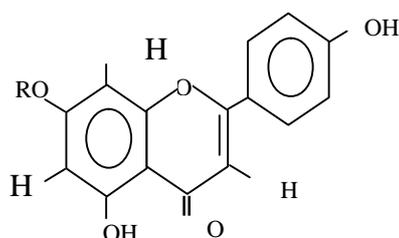
Figure 28 : Analyse spectrale du spot 7 de la phase acétate

1.6.3-Le spot 6 de la phase acétate :

Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	282	329
NaOH	279	379
NaOAc	279	327
NaOAc + H ₃ BO ₃	273	331

Dans le méthanol on a une bande I à 332nm et une bande II à 284nm indiquant une flavone monosubstitué en B (Voinin 1983). Le spectre avec le NaOH donne un effet bathochrome et hyperchrome stable témoignant d'un OH en 4' et de l'absence d'ortho di-OH. L'addition du NaOAc donne une bande I au léger déplacement hypsochromique indiquant un OR en 7. L'ajout du H₃BO₃ ne donne pas de déplacement, donc pas d'ortho di-OH.

Ces résultats sont en faveur d'une **apigénine** (DEL BANO 2004)



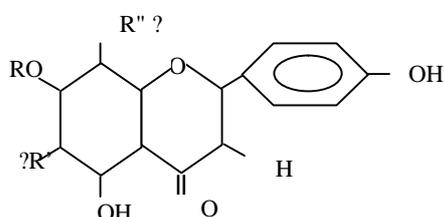
1.6.4-Le spot 5 de la phase acétate :

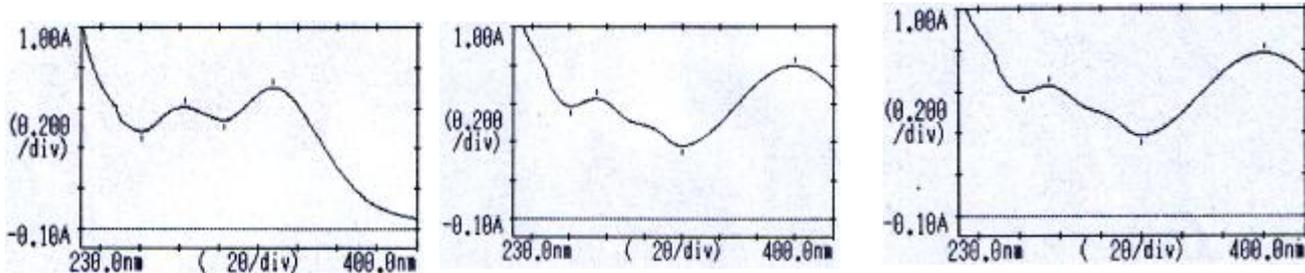
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	277	327
NaOH	non précis	376
NaOAc	277	324
NaOAc / H ₃ BO ₃	275	327

La bande I à 327nm et la bande II à 277nm sont en faveur d'une flavone au noyau A polysubstitué.

L'effet bathochromique (+54nm) combiné à l'effet hyperchromique de la bande I après l'addition du NaOH informe d'un 4'-OH.

Le NaOAc et le H₃BO₃, une fois ajoutés, ne provoquent pas d'effet bathochrome des bandes I et II. C'est-à-dire que notre molécule a un OR en 7 et ne contient pas d'ortho di-OH sur le noyau B.

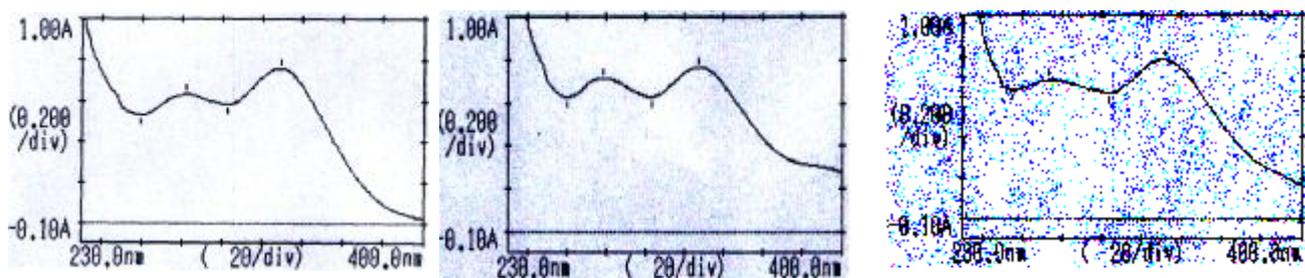




MeOH

NaOH

NaOH + 5min

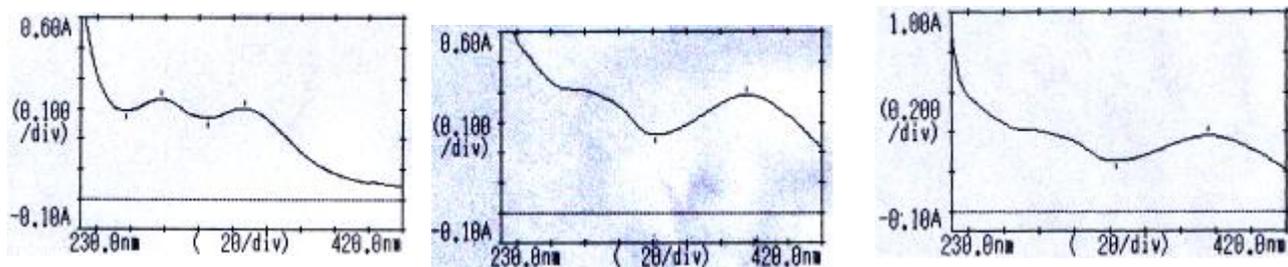


MeOH

NaOAc

NaOAc / H₃BO₃

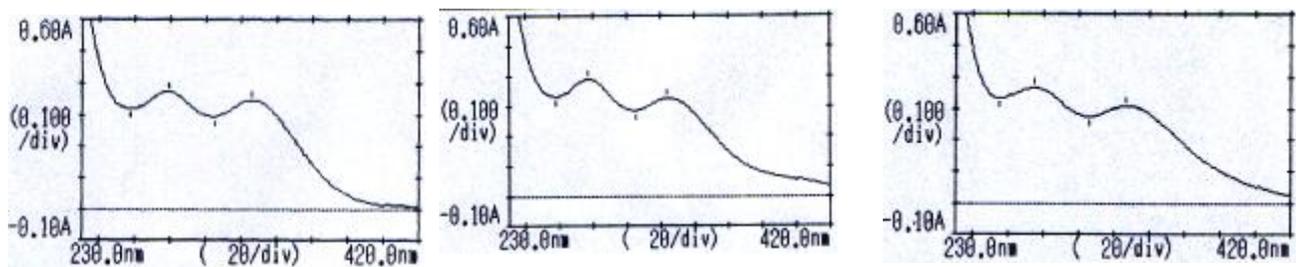
Figure 29 : Analyse spectrale du spot 6 de la phase acétate



MeOH

NaOH

NaOH + 5min



MeOH

NaOAc

NaOAc / H₃BO₃

Figure 30 : Analyse spectrale du spot 5 de la phase acétate

1.6.5-Le spot 2 de la phase acétate :

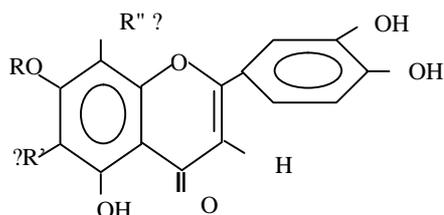
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	297	327
NaOH	271	382
NaOAc	non précis	328
NaOAc / H ₃ BO ₃	303	345

La solution méthanolique de ce composé donne une bande I à 327nm et une bande II à 297nm indiquant une flavone au noyau A polysubstitué.

Un 4'-OH est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande I (+55nm) après l'addition du NaOH.

Le NaOAc, une fois ajouté au méthanol, ne produit aucun effet sur la bande II affirmant un OR en 7, et le H₃BO₄ produit un effet bathochrome de la bande I (18nm) indiquant la présence de deux OH adjacents sur le noyau B.

On suppose donc cette structure :



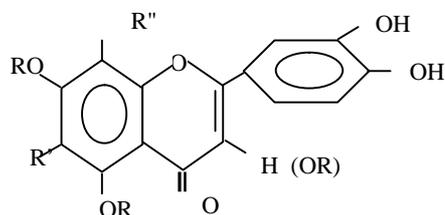
1.6.6-Le spot 5 de la phase H₂O :

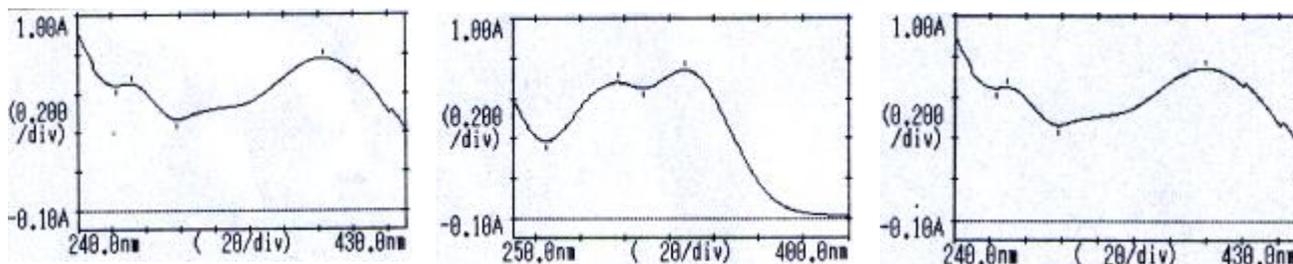
Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	298	334
NaOH	271	384
NaOAc	289	331
NaOAc / H ₃ BO ₃	291	350

Le spectre méthanolique donnant une bande II à 298nm indique un noyau A polysubstitué. La bande I à 334nm ainsi que la fluorescence bleu light de ce composé sous UV nous laisse hésiter entre une flavone sans 5-OH libre et une flavonol sans 5-OH libre avec un 3-OH substitué. (YAOU 2001).

Le NaOH ajouté à la solution méthanolique fait apparaître un déplacement bathochrome de la bande I ($\Delta\lambda = +50\text{nm}$). On a un OH en 4'.

L'addition du NaOAc ne provoque pas de changement affirmant un OR en 7. Et l'effet bathochrome de la bande I après l'ajout du H₃BO₃ indique un ortho di-OH en 3' et 4'.

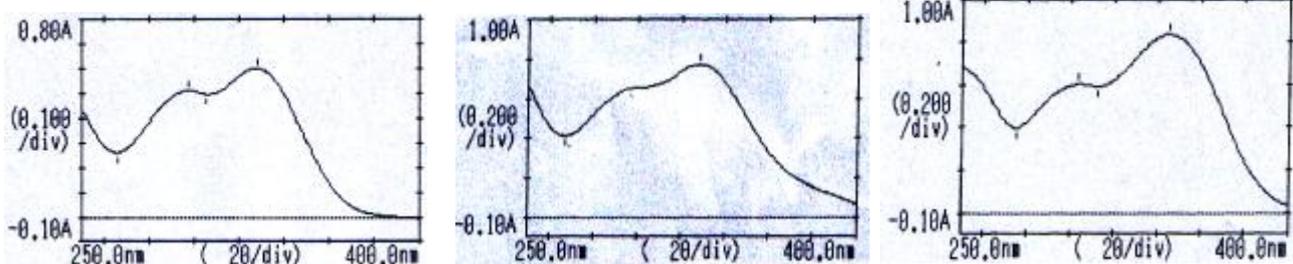




MeOH

NaOH

NaOH + 5min

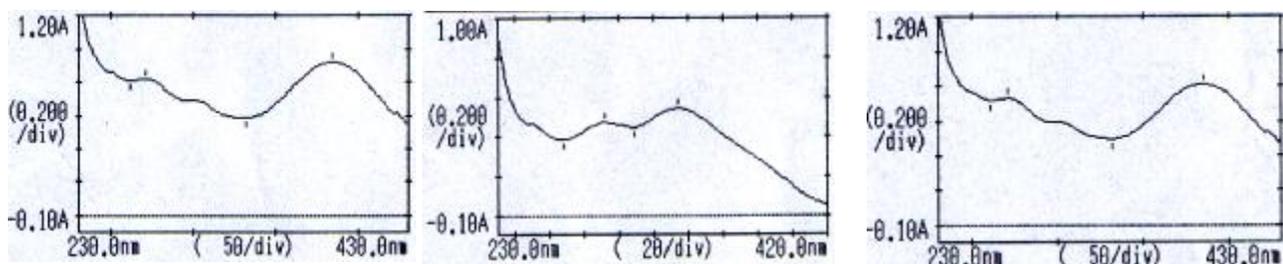


MeOH

NaOAc

NaOAc / H₃BO₃

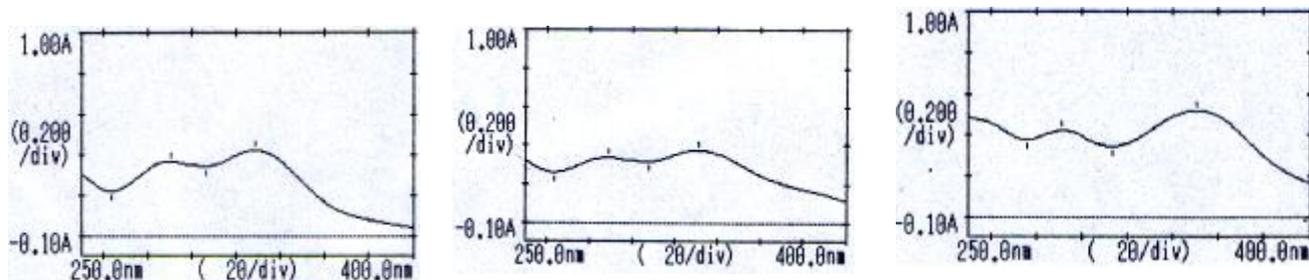
Figure 31 : Analyse spectrale du spot 2 de la phase acétate



MeOH

NaOH

NaOH + 5min



MeOH

NaOAc

NaOAc / H₃BO₃

Figure 32 : Analyse spectrale du spot 5 de la phase H₂O

Le Rf de cette molécule (0,4) dans le système : H₂O/EtOH/MEC/AcOH (13/3/3/1) nous informe que cette molécule est glycosylée. Elle contient au moins un sucre lié.

1.6.7-Le spot 1 de la phase H₂O :

Solvants utilisés	Bande II (nm)	Bande I (nm)
MeOH	274	330
NaOH	277	393
NaOAc	272	-
NaOAc / H ₃ BO ₃	272	351

La bande I à 330nm et la bande II à 274 ainsi que la fluorescence marron de ce spot sous UV, nous informent qu'il s'agit d'une flavanol. Et il est fort possible qu'on ait un sucre en 3 vu que le Rf est de 0,9 dans le système H₂O/EtOH/MEC/AcOH (13/3/3/1).

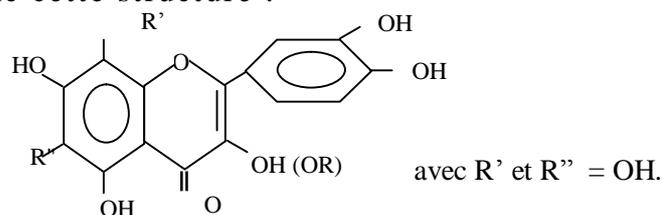
Le NaOH provoque un déplacement bathochrome très important de la bande I (+63nm) indiquant la présence d'un OH en 4'.

L'addition du NaOAc provoque une décomposition de la bande I indiquant la présence d'un ortho di-OH.

L'addition du NaOAc provoque une décomposition de la bande I indiquant la présence ortho di-OH en 6 et 7 ou en 7 et 8. (Markham 1982). Le léger déplacement hypsochrome de la bande II confirme le OH en 7.

Le H₃BO₃ avec le NaOAc donnent un effet bathochrome de la bande I informant de la présence d'un ortho di-OH en 3' et 4'.

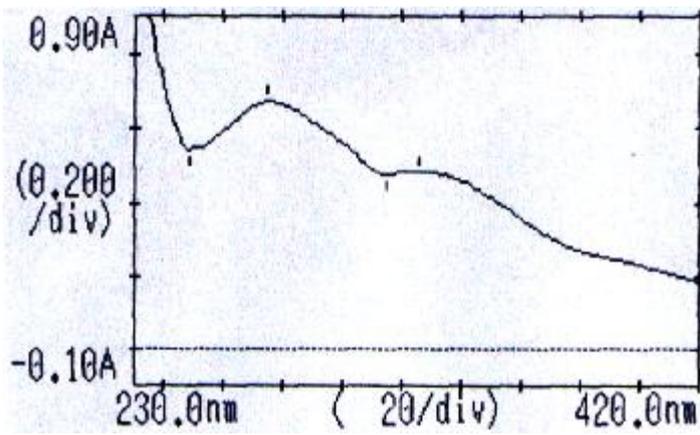
On suppose donc cette structure :



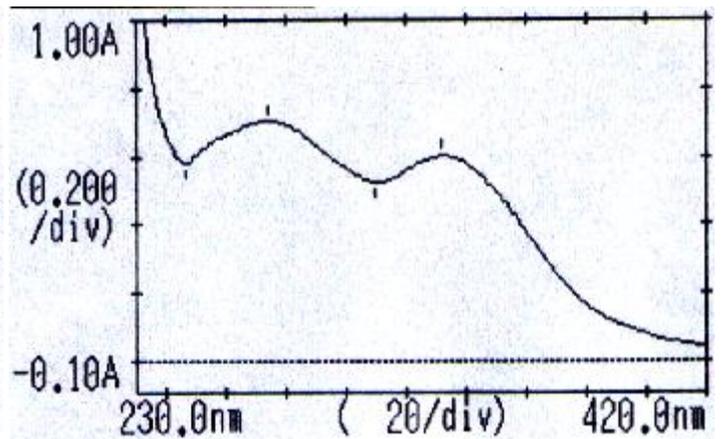
De ces résultats, on remarque que les principaux flavonoïdes produits par *R. officinalis* pendant la floraison sont des flavones et des flavonols, comme l'affirme DEL BANO (2004) et OKAMURA (1994).

Les nombreux pics uniques obtenus de la phase éther diéthylique nous laisse croire que la cueillette s'est faite avant l'optimum de floraison, à une période où on avait une grande production d'acides phénols (MORENO 2006).

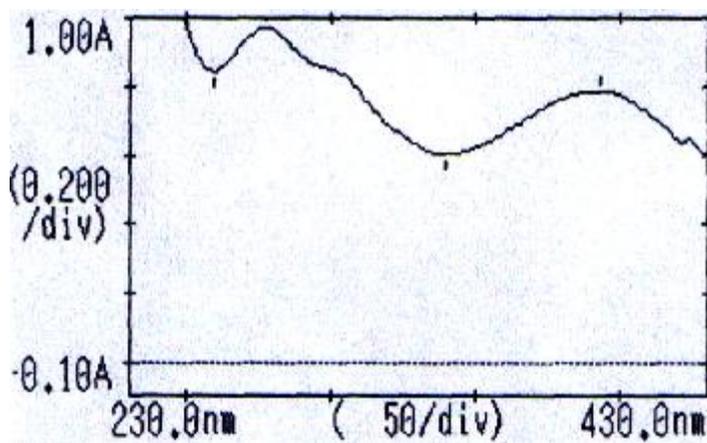
Aussi on peut confirmer de ces spectres que la phase acétate est très homogène. Elle contient principalement des flavones au noyau A polysubstitué.



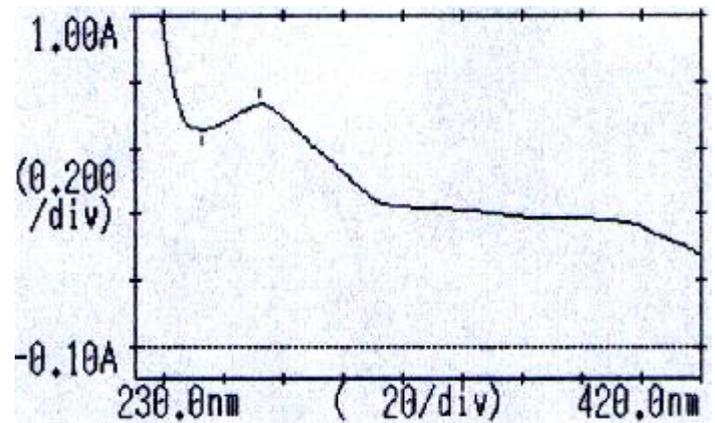
MeOH



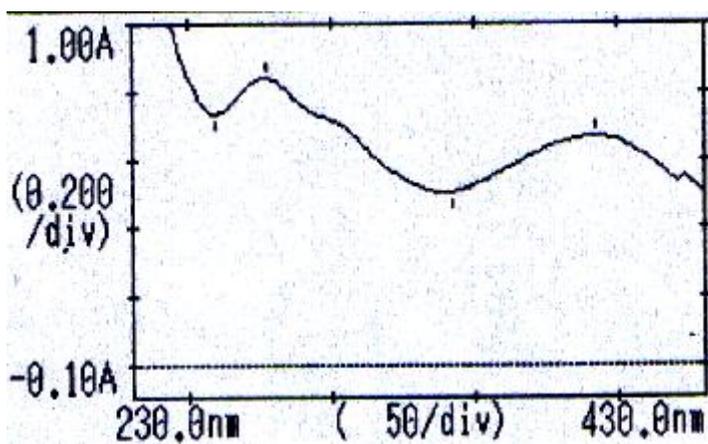
MeOH



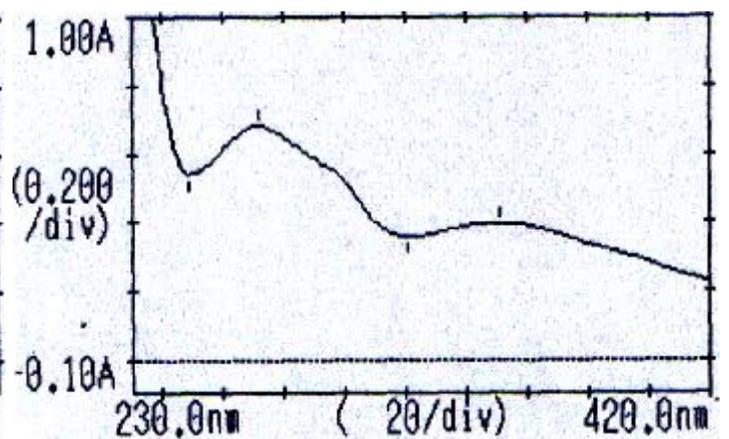
NaOH



NaOAc



NaOH + 5min



NaOAc / H₃BO₃

Figure 33 : Série spectrale du spot 1 de la phase H₂O

1.7-Résultats de la CCM analytique des tannins :

Pour cette CCM, on fait 5 dépôts correspondant aux 5 phases obtenues après les partitions entre solvants (Ether, Acétate, MEC, Butanol, H₂O). On obtient ici une mauvaise séparation des constituants du dépôt avec tous les systèmes solvants utilisés. Le système : Toluène/acétone/Acide formique (6/6/1) est choisi du fait qu'il permette l'apparition de traînées tanniques sur la plaque.

Ces dernières, après vaporisation de la vanilline/HCl apparaissent de couleurs : jaune orange, orange et rouge, caractéristiques des tannins (Plaque 3).



Plaque 3 : CCM analytique des tannins de *V. faba L.*

Ces résultats nous renseignent sur la difficulté de la séparation des tannins par CCM. Il est peut être préférable de réaliser cette étape par chromatographie sur colonne ou par HPLC.

Pour confirmer que nos extraits contiennent réellement des tannins, on fait une analyse spectrale des 5 phases dans le méthanol. On obtient alors des spectres à un seul pic se situant tous aux environs de 280nm. Ceci nous confirme qu'il s'agit effectivement des tannins (ANANIAS 2001, DUTRUC ROUSSET 2002).

La phase éther paraît moins pure que les autres phases.

Comme témoin pour cette étude spectrale, on utilise la catéchine caractérisée par son absorption à 280nm (et c'est effectivement le résultat qu'on obtient).

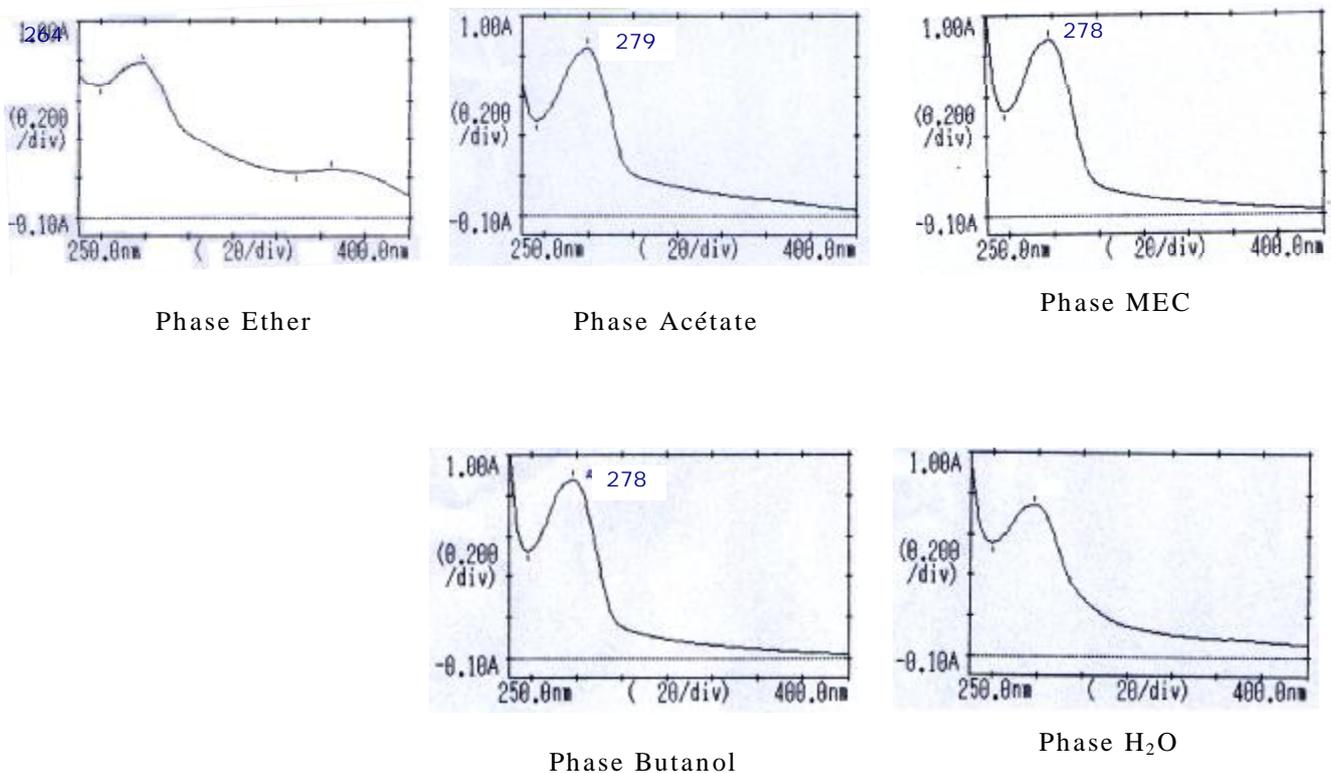


Figure 34 : Spectres méthanoliques des phases tanniques

1.8-Dosage des tannins par la méthode butanol/HCl :

Pour le dosage des tannins condensés par la méthode butanol/HCl, on a réalisé les dilutions suivantes :

Phase éther	:	1/20	Phase acétate	:	1/300	Phase MEC	:	1/3000
Phase butanol	:	1/300	Phase H ₂ O	:	1/3000			

La mesure de l'absorption à 550nm, qui est la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption des anthocyanes, donne les résultats suivants : (après avoir ramené toutes les dilutions à 1/10).

Phase éther : 0,984 Phase acétate : 14,58 Phase MEC : 145,8

Phase butanol : 23,67 Phase H₂O : 40,8

On peut représenter ces résultats sous forme de secteurs angulaires comme suit :

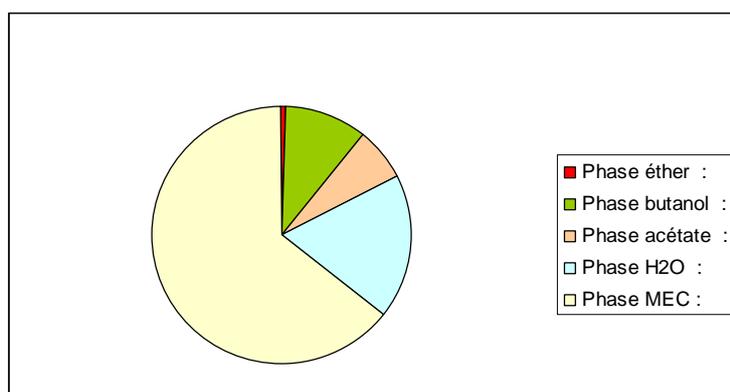


Figure 35 : Secteur angulaire des absorbances des phases tanniques

Les phases peuvent être donc classées selon leur concentration en anthocyanes :

Phase MEC > phase H₂O > phase butanol > phase acétate > phase éther.

On remarque que la phase éther représente une très basse proportion comparée aux autres phases. En d'autres termes, les anthocyanes mesurées dans cette phase sont en très faible quantité à *V. faba L. Seville 2005* contient très peu de tannins monomériques.

La phase MEC avec les valeurs suivantes : dilution : 1/20, Abs = 145,8 représente la plus grande proportion des anthocyanes mesurés. C'est-à-dire que les tannins extraits de *V. faba L. Seville 2005* sont en grande majorité des tannins trimériques et oligomériques séparés par affrontement avec le MEC.

On remarque que ces résultats sont en accord avec ceux de la CCM analytique : les faibles colorations des traînées correspondent aux faibles proportions (acétate et éther), et plus la coloration devient intense, plus l'absorption augmente.

- L'analyse spectrale :

Après mélange de toutes les solutions d'anthocyanes (toutes les phases), on évapore à sec au rotavapor. Le spectre d'absorption de la solution méthanolique obtenue se présente sous forme de 2 pics situés entre 260 et 600nm ; plus exactement à 274nm et 546nm. Ce spectre est caractéristique des anthocyanes (MARKHAM 1983) et plus spécialement des cyanidines.

La réaction avec le butanol/HCl a donc effectivement effectué une hydrolyse acide des liaisons C₄-C₈ liant les monomères tanniques entre eux, ce qui a permis la libération des anthocyanes.

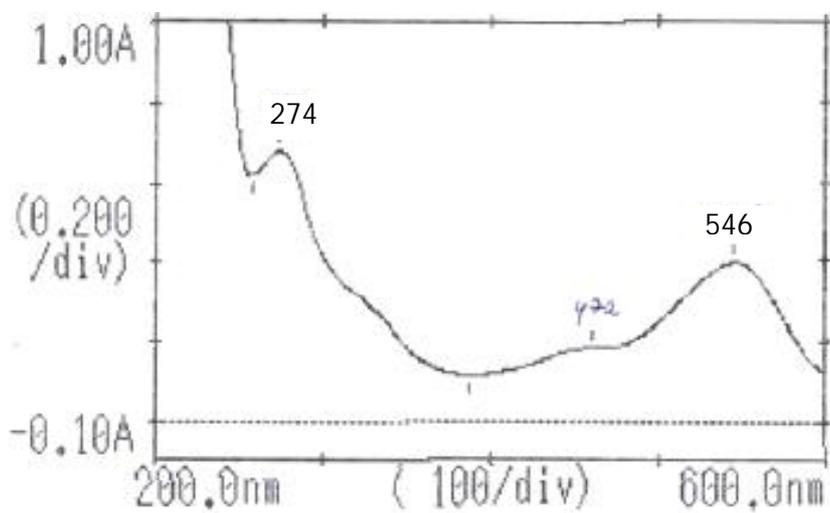


Figure 36 : Spectre méthanolique après le dosage butanol/HCl

2* Rôle antimicrobien des polyphénols :

L'activité antibactérienne des polyphénols testée par la méthode de la diffusion sur gel nous donne les résultats suivants :

Plante	<i>Rosmarinus officinalis</i>								
Phases	Ether			Acétate			H ₂ O		
Dilutions	d ₀	d ₁	d ₂	d ₀	d ₁	d ₂	d ₀	d ₁	d ₂
<i>E. Coli</i>	10	13	16	14	15	16	8	14	17
<i>Staphylococcus sp.</i>	8	12	15	11	9	0	12	8	0
<i>P. mirabilis</i>	9	7	0	13	10	0	14	12	7

Plante	<i>Vicia faba L.</i>								
Phases	Ether			Acétate			H ₂ O		
Dilutions	d ₀	d ₁	d ₂	d ₀	d ₁	d ₂	d ₀	d ₁	d ₂
<i>E. Coli</i>	9	11	11	13	11	8	7	11	14
<i>Staphylococcus sp.</i>	11	11	11	12	11	9	12	11	10
<i>P. mirabilis</i>	15	10	8	10	10	10	10	10	8

Tableau 5 : Résultats obtenus par la méthode de diffusion sur gel exprimés en diamètres des zones d'inhibition (mm).

Remarques :

* Les témoins ont prouvé le bon fonctionnement de cette méthode : le Quebracho donne des diamètres d'inhibition se situant entre 12 et 15 mm pour la majorité et le Méthanol entre 15 à 20 mm.

*Quand on a des zones diffusionnelles, on prend en compte la distance entre le milieu du patch et la colonie la plus proche (on a alors le rayon) et on multiplie par deux (pour avoir le diamètre).

Un premier aperçu du tableau nous informe que toutes les phases (éther diéthylique, acétate d'éthyle, eau) des deux plantes *R. officinalis* et *V. faba L.* ont montré un pouvoir inhibiteur contre les bactéries testées.

Même si certaines dilutions donnent un résultat négatif, les autres dilutions des mêmes phases montrent une présence d'inhibition : c'est juste la concentration qui intervient.

On peut donc admettre que nos extraits ont une action antimicrobienne évidente contre les pathogènes utilisés. Conformément aux travaux de OKIGBO (2005) et MAMATHA (2005).

L'analyse de l'Anova nous donne le tableau suivant :

	d. d. l (n-1) (degré de liberté)	F (Coefficient de Fischer)	Probabilité
Plantes	1	0,48	0,4951
Microorganismes	2	5,67	0,0081
Phases	2	0,06	0,9445
Dilutions	2	2,75	0,0789
Plantes.phases	2	0,08	0,9209
Microorganismes.phases	4	1,21	0,3279
Microorganismes.dilutions	4	4,59	0,0052
Plantes.microorganismes.phases	6	2,90	0,0236

Tableau 6 : Résultats obtenus par l'Anova

Il est facile d'en tirer, que d'après l'Anova, les facteurs plantes, phases et dilutions n'ont pas d'effets significatifs. Les paramètres de ces facteurs sont classés dans un même groupe A. Par contre, le facteur microorganisme est considéré comme étant très significatif.

2.1-Facteur "Plantes" :

Groupe	Moyenne (mm)	Nombre	Plantes
A	10,556	27	<i>V. faba L.</i>
A	10,000	27	<i>R. officinalis</i>

Tableau 7 : Regroupement des plantes

Les 27 applications de *V. faba L.* donnent une moyenne de 10,556mm ; celles de *R. officinalis* une moyenne de 10,000mm. Ces valeurs sont très proches.

è les flavonoïdes de *R. officinalis* et les tannins de *V. faba L.* ont tous les deux une action inhibitrice sur *E. Coli*, *Staphylococcus sp.* coagulase (+) et *P. mirabilis*. De plus, d'après ce tableau, on peut leur attribuer des pouvoirs d'action similaire en intensité.

2.2-Facteur "phases" :

Groupe	Moyenne (mm)	Nombre	Plantes
A	10,444	18	Ether diéthylique
A	10,278	18	Aqueuse
A	10,111	18	Acétate d'éthyle

Tableau 8 : Regroupement des phases

Les phases éther diéthylique nous donne des zones d'inhibition d'une moyenne de 10,44mm, la phase acétate d'éthyle une moyenne de 10,11mm et enfin la phase aqueuse d'une moyenne de 10,27mm.

L'écart entre ces moyennes ne dépasse pas 1mm, ce qui les classe dans le même groupe A.

è Les polyphénols de *R. officinalis* et *V. faba L.* extraits à l'éther diéthylique (acides phénols, flavones et tannins monomériques) ont une action proche de ceux extraits avec de l'acétate d'éthyle (flavonoïdes aglycones, mono et di-O-glycosides et tannins dimériques) et de ceux qui sont restés dans la phase eau.

En d'autres termes, les composés phénoliques de faibles poids moléculaires agissent pratiquement avec la même intensité que ceux ayant un poids moléculaire important. La structure et le degré de polymérisation n'ont donc pas une grande influence sur cette action, comme le signale SIVAKUMARAN (2004).

Ceci explique le fait que MORENO (2006) travaillant avec des acides phénols, BABAYI (2004) travaillant avec des flavonoïdes (aglycones et glycosides) et des tannins, et DIDRAK (1999) travaillant avec des tannins affirment tous que leurs composés respectifs ont une action antibactérienne évidente.

2.3-Facteur "dilutions" :

Groupe	Moyenne (mm)	Nombre	Dilutions
A	11,000	18	d ₀
A	10,889	18	d ₁
A	8,944	18	d ₂

Tableau 9 : Regroupement des dilutions

De ce tableau, l'Anova nous indique que les dilutions n'ont aucun effet inhibiteur ; c'est-à-dire, qu'un polyphénol agit de la même façon quelque soit sa concentration. Mais, nous, on considère que puisque la différence entre la d₂ et la d₀ est supérieure à 2mm, ce facteur est significatif.

D'après le tableau 1 (des résultats), ceci est évident . Les boites de pétri :

- *R. officinalis*, *Staphylococcus sp.*, phase H₂O.
- *R. officinalis*, *P. mirabilis*, phase éther diéthylique.
- *R. officinalis*, *Staphylococcus sp.*, phase acétate d'éthyle.
- *R. officinalis*, *P. mirabilis*, phase acétate d'éthyle.

Ces boites ont des d₂ donnant une absence d'inhibition, alors que les d₁ donnent un effet positif. Ce qui indique que la CMI se trouve entre d₂ et d₁ è la d₁ tout comme la d₀ appartiennent à l'intervalle actif de la concentration, et d₂ non.

Un autre cas ; la boite :

- *V. faba L.*, *E. coli* phase éther diéthylique.

Ici la d₂ donne le même résultat que d₁. C'est-à-dire que l'activité maximale correspond à une concentration $\leq d_1$ è la d₁ et la d₀ appartiennent à un intervalle où la concentration est inversement proportionnelle à l'activité inhibitrice, alors que d₁ n'y appartient pas.

à Il est donc plus juste de classer d_0 et d_1 dans un groupe et d_2 dans un autre (deux groupes A et B).

2.4-Facteur "Microorganismes" :

Groupe	Moyenne (mm)	Nombre	Microorganismes
A	12,167	18	<i>E. coli</i>
B	9,611	18	<i>Staphylococcus sp.</i>
B	9,056	18	<i>P. mirabilis</i>

Tableau 10 : Regroupement des microorganismes

E. coli montre ici une grande sensibilité aux composés polyphénoliques avec une moyenne de 12,16mm. *Staphylococcus sp* et *P. mirabilis* sont aussi sensibles mais à des degrés inférieurs : moyennes de 9,61mm et 9,05mm respectivement.

Ces résultats contredisent ceux obtenus par DIDRAK (1999). Ce dernier obtient une plus grande inhibition de *Staphylococcus sp.* que de *E.coli* en travaillant avec des tannins de différentes plantes (Mimosa, Valex, Salvia sp...). De même que BABAYI obtient une résistance de *E. coli* aux extraits méthanoliques d'Eucalyptus et Terminalia contenant des flavonoïdes et des tannins.

Ces résultats laissent croire que les polyphénols agissent de la même manière sur des bactéries ayant des parois différentes (*E. coli* et *P. mirabilis* sont des Gram (-) alors que *Staphylococcus sp.* est Gram (+)). Et on peut de ce fait supposer que cette action inhibitrice ne concerne pas les structures spécifiques des parois bactériennes.

2.5-Facteur: Microorganismes – dilutions :

Cette interaction à un effet significatif. On remarque qu'*E. coli* est sensible d'autant plus que la concentration diminue. Quand la concentration est importante (d_0), la sensibilité est faible ; en allant vers d_1 puis d_2 , on a une augmentation de la zone d'inhibition, donc la sensibilité s'accroît.

Ce même phénomène est observé par ULANOWSKA (2006) qui travaille avec différents flavonoïdes. Ce chercheur annonce que *E. coli* devient résistante quand la concentration est supérieure à 0,1 mM.

Le fait qu'on obtienne dans notre travail une inhibition même à d_0 nous informe que notre extrait primaire (sans dilutions) est déjà de faible concentration.

Pour *P. mirabilis* et *Staphylococcus sp* la sensibilité est directement proportionnelle à la concentration. C'est-à-dire, que plus on dilue plus la zone d'inhibition diminue.

2.6-Analyse des variables (DIA) :

Microorganismes/phases	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart
<i>E. coli</i> - Acétate d'éthyle	15,000	14,000	16,000	2,000
<i>E. coli</i> – H ₂ O	13,000	8,000	17,000	9,000

<i>E. coli</i> – Ether diéthylique	13,000	10,000	16,000	6,000
<i>P. mirabilis</i> – Acétate d'éthyle	7,667	0,000	13,000	13,000
<i>P. mirabilis</i> – H ₂ O	11,000	7,000	14,000	7,000
<i>P. mirabilis</i> – Ether diéthylique	5,333	0,000	9,000	9,000
<i>Staphylococcus sp.</i> – Acétate d'éthyle	6,667	0,000	11,000	11,000
<i>Staphylococcus sp.</i> – H ₂ O	6,667	0,000	12,000	12,000
<i>Staphylococcus sp.</i> – Ether diéthylique	11,667	8,000	15,000	7,000

Tableau 11 : La DIA pour *R. officinalis* (résultats en mm).

Microorganismes/phases	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart
<i>E. coli</i> - Acétate d'éthyle	10,667	8,000	13,000	5,000
<i>E. coli</i> – H ₂ O	10,667	7,000	14,000	7,000
<i>E. coli</i> – Ether diéthylique	10,667	9,000	12,000	3,000
<i>P. mirabilis</i> – Acétate d'éthyle	10,000	10,000	10,000	0
<i>P. mirabilis</i> – H ₂ O	9,333	8,000	10,000	2,000
<i>P. mirabilis</i> – Ether diéthylique	11,000	8,000	15,000	7,000
<i>Staphylococcus</i> – Acétate d'éthyle	10,667	9,000	12,000	3,000
<i>Staphylococcus</i> – H ₂ O	11,000	10,000	12,000	2,000
<i>Staphylococcus</i> – Ether diéthylique	11,000	11,000	11,000	0,000

Tableau 12 : La DIA pour *V. faba L.* (résultats en mm).

Il en ressort de cette analyse (DIA : action de la combinaison de deux facteurs) que :

Les grandes zones d'inhibition sont enregistrées pour la boîte de pétri:

- *R. officinalis*, *E.coli*, phase acétate d'éthyle ➔ avec une moyenne de 15mm. L'intervalle est de [14, 16]mm. Donc, *E. coli* est plus sensible aux flavonoïdes extraits par la phase Acétate d'éthyle le plus qu'aux autres polyphénols.

Par contre, les plus faibles zones sont celle de la boîte :

- *R. officinalis*, *P. mirabilis*, phase éther diéthylique ➔ avec une moyenne de 5,33mm qui est presque nulle si on tient compte du fait que le diamètre des patches = 5mm.

En d'autres termes, *P. mirabilis* n'est pas très sensible aux polyphénols extraits par la phase éther diéthylique (Acides phénols et flavones).

Toujours suivant les résultats de la DIA:

- *E. coli* est plus sensible aux flavonoïdes de *R. officinalis* restés dans la phase aqueuse et aux tannins de *V. faba L.* extraits par l'éther diéthylique.

- *Staphylococcus sp* coagulase (+) est plus sensible aux flavonoïdes de *R. officinalis* extraits par l'éther diéthylique.

Ceci confirme les conclusions de CUSHNIE (2003) qui affirme que chaque composé agit différemment sur les microorganismes. C'est-à-dire, qu'un composé peut avoir une action très importante sur un germe et une action moindre, voire même nulle sur un autre.

2.7-Conclusion : Les polyphénols ont une action inhibitrice contre *E. coli*, *Staphylococcus sp* et *P.mirabilis*. Donc, ils pourraient effectivement être bénéfiques en cas d'infections urinaires, de diarrhées ou d'autres pathologies dues à ces germes.

Ceci est le principe même du travail de MAMATHA (2005) : Ce dernier a utilisé des tannins extraits de différentes plantes médicinales pour traiter les diarrhées causées par *E. coli*, *Staphylococcus aureus* et *P. mirabilis*.

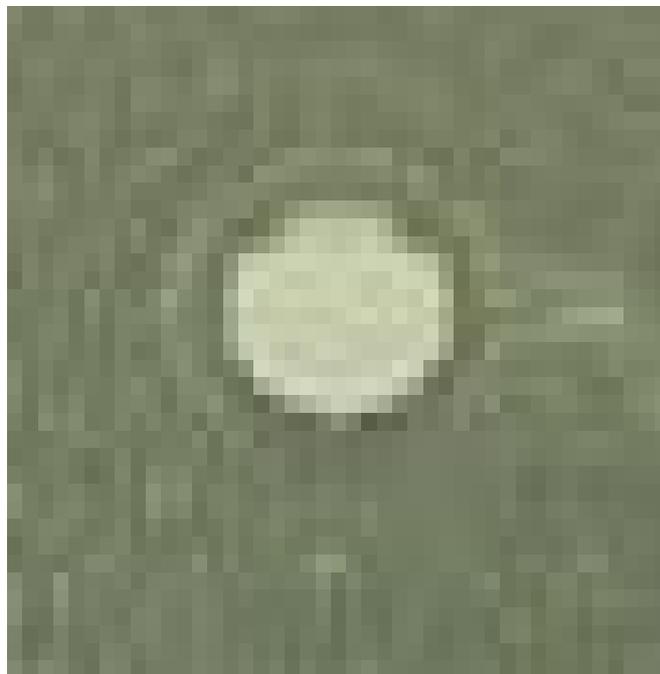


Photo 01 : Faible zone d'inhibition pour la boîte de pétri :

V. faba L. / Ether diéthylique / P. mirabilis. / d₂.



Photo 02 : Zone d'inhibition de la boîte de pétri :
V. faba L. / Ether diéthylique / *E. coli* / d₀.

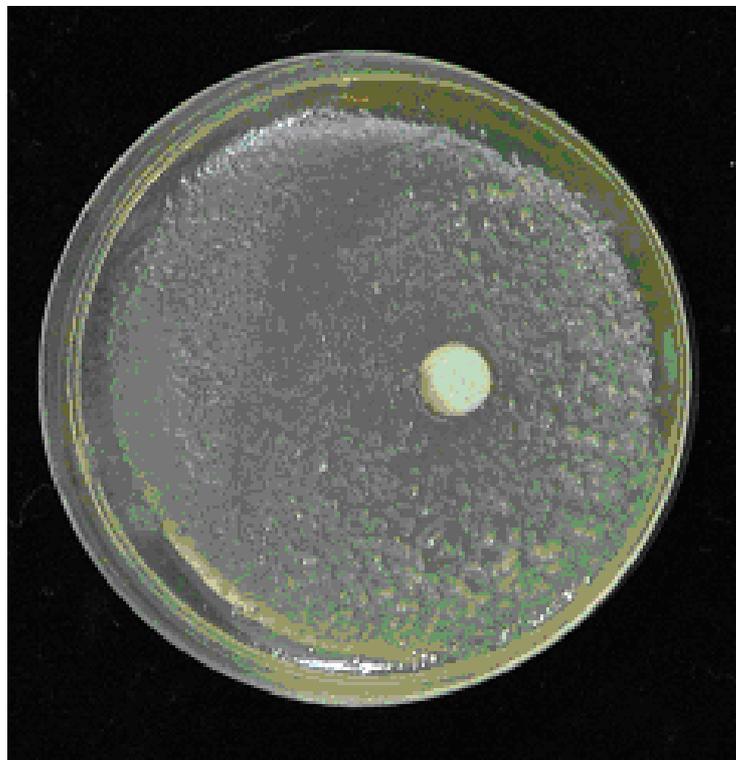


Photo 03 : Zone difusionnelle difficile à mesurer pour la boîte :
V. faba L. / H₂O / *P. mirabilis* / d₂.



Photo 04 : Agrandissement de la zone d'inhibition de la boîte :
R. officinalis. / H₂O / *Staphylococcus sp.* / d₀.



Photo 05 : Zone d'inhibition de la boîte :
V. faba L. / Ether diéthylique / *P. mirabilis.* / d₁.

3*Précipitation des macromolécules par les tannins:

Les résultats obtenus avec la méthode de la diffusion radiale sont résumés dans le tableau suivant:

	Témoin	Phase Ether diéthylique			Phase Acétate d'éthyle			Phase aqueuse		
	H ₂ O	d ₀	d ₁	d ₂	d ₀	d ₁	d ₂	d ₀	d ₁	d ₂
BSA	0	0	25	16	14	12	8	12	9	7
Gluten	0	18	15	14	14	11	7	7	9	10
Amidon	0	16	11	9	10	9	8	9	8	7

Tableau 13 : Résultats obtenus sur boîtes de pétri (diamètres des zones en mm).

D'après ce tableau, il est évident que les tannins ont une capacité de combinaison aux BSA, gluten et amidon. Dans certaines boîtes de pétri, la zone de précipitation est très importante et franche, comme c'est le cas de la boîte : "BSA, phase éther, d₁" qui exhibe une zone de 25mm (voir photo).

Quand on a des zones diffusionnelles, on refait d'autres répétitions de la même boîte. Généralement, ce problème disparaît alors.

L'Anova nous donne le tableau suivant :

	d. d. 1 (n-1) (degré de liberté)	F (Coefficient de Fischer)	Probabilité (Prob.)
Substances	2	0,93	0,4126
Phases	2	3,92	0,0366
Dilutions	2	1,66	0,2162

Tableau 14: Degré de signification des différents paramètres.

Il ressort de ce tableau, que le seul paramètre significatif est celui des phases. Les substances donnant une probabilité (prob.) de 0,41 et les dilutions celles de 0,21 sont considérées comme non-significatives. (Prob. >0,05).

3.1-Les paramètres "substances" :

Groupe	Moyenne (mm)	Nombre	Substances
A	11,667	9	Gluten
A	10,222	9	BSA
A	9,889	9	Amidon

Tableau 15 : Regroupement des substances

Le gluten donne une moyenne de 11,66mm, la BSA une moyenne de 10,22 mm et l'amidon celle de 9,88 mm. Ces résultats sont très proches et classent nos substances dans un même groupe homogène

A. Mais, il est important de signaler que ces valeurs sont aussi élevées, conformément au tableau des résultats (tableau 13) : les tannins se lient aux gluten, BSA et amidon, comme dans les travaux de LE BOUVERLLEC (2005) et comme l'annonce EUZEBY (2002), dans son article.

LE BOUVERLLEC a travaillé sur différents polysaccharides (cellulose, amidon, pectine...) et affirme que les tannins se combinent à ces derniers avec des liaisons non-covalentes.

EUZEBY dans son article sur les tannins rejoint l'idée de HAGERMAN (1987) suivant laquelle ces composés phénoliques se combinent aux protéines (végétales comme animales) avec des liaisons covalentes.

- L'effet antinutritionnel est donc mis en évidence ici. On remarque que le gluten et la BSA ont des moyennes supérieures à celle de l'amidon : on peut suggérer que les tannins se lient de manière plus importante aux protéines, conformément aux conclusions de ZIMMER(1996).

3.2-Le paramètre "phases" :

Groupe	Moyenne (mm)	Nombre	Substances
A	12,556	9	Aqueuse
AB	10,556	9	Ether diéthylique
B	8,667	9	Acétate d'éthyle

Tableau 16 : Regroupement des phases

Dans ce tableau, l'Anova classe les phases en deux groupes différents. La phase aqueuse : groupe A avec une moyenne supérieure de 12,55mm. La phase éther diéthylique : groupe AB avec une moyenne de 10,55mm. La phase acétate d'éthyle : groupe B avec une moyenne de 8,66mm.

On remarque de ceci que la différence de moyenne entre deux phases du même groupe est de presque 2cm, et elle est de presque 4cm pour les deux phases appartenant aux deux groupes différents (la phase aqueuse et la phase acétate d'éthyle). Ce qui explique que ce paramètre soit considéré par l'Anova comme étant significatif.

La phase acétate d'éthyle donnant les plus faibles résultats laisse à croire que les tannins dimériques qu'elle contient ont un faible pouvoir de combinaison aux composées étudiés.

La phase éther diéthylique contenant principalement des tannins monomériques donne un pouvoir de combinaison moyen. Mais, la phase aqueuse contenant ce qui reste comme tannins (trimériques, oligomériques et polymériques) montre un très grand pouvoir d'action.

Ceci s'explique peut être par le fait que la liaison "tannin-substance" soit fonction de la structure et du degré de polymérisation des tannins.

Mais, on arrive dans ce cas à une contradiction, vu que la phase acétate d'éthyle donne des moyennes inférieures à celles de la phase éther diéthylique. Ou peut être que l'effet de polymérisation n'est valable qu'après un certain nombre de monomères.

3.3-Le paramètre "dilutions" :

Groupe	Moyenne (mm)	Nombre	Substances
A	12,000	9	d ₀
A	10,222	9	d ₁
A	9,556	9	d ₂

Tableau 17 : Regroupement des dilutions

D'après l'Anova, ce paramètre est non-significatif. Mais pour nous les moyennes obtenues: d₀ : 12mm, d₁ : 10,22 et d₂ : 9,556 donnent un écart de 1,8mm entre d₀ et d₁ ce qui n'est pas négligeable. On considère donc que la concentration du tannin a un effet significatif sur le taux de combinaison. Plus cette concentration augmente, plus le diamètre des zones d'inhibition est important : proportionnalité directe.

Ce résultat est à la base des travaux de GEDIR (2005) et HAGERMEN (1987) qui se servent des diamètres des zones pour mesurer la concentration.

Dans le tableau des résultats , on a la boîte ": BSA/ phase éther diéthylique/ d₀" qui donne une absence de zones. Ceci, nous laisse suggérer qu'il y a une concentration maximale à partir de laquelle les tannins ne se combinent plus. C'est peut être dû à l'effet stérique signalé par ZHANG (2002) qui a travaillé sur la liaison de 10 tannins différents a un peptide. La combinaison selon ce chercheur est fonction de l'hydrophobicité et de l'encombrement stérique :quand ces derniers sont importants, les tannins deviennent incapables de se lier au peptide utilisé.

3.4-L'analyse des variables (DIA) :

Cette analyse donne les résultats suivants :

	Moyenne	Minimum	Maximum	Ecart
Amidon – phase acétate d'éthyle	8,00	7,00	9,00	2,00
Amidon – phase aqueuse	12,00	9,00	16,00	7,00
Amidon – phase éther diéthylique	9,67	8,00	12,00	4,00
BSA – phase acétate d'éthyle	9,33	7,00	12,00	5,00
BSA – phase aqueuse	10,00	6,00	16,00	10,00
BSA – phase éther diéthylique	11,33	8,00	14,00	6,00
Gluten – phase acétate d'éthyle	8,67	7,00	10,00	3,00
Gluten – phase aqueuse	15,67	14,00	18,00	4,00
Gluten – phase éther diéthylique	10,67	7,00	14,00	7,00

Tableau 18: Résultats de l'analyse DIA.(en mm)

L'amidon et le gluten se lient plus aux tannins de la phase aqueuse. **à** La combinaison à l'amidon et au gluten peut être dépendante du degré de polymérisation des tannins. Et elle n'est significative pour l'amidon que quand le nombre de monomères dépasse 2. (9,67 et 8,00 sont des valeurs faibles).

La combinaison est peut être aussi dépendante de la diversité des structures tanniques (la phase aqueuse est un mélange de différentes structures), ou de quelques structures spécifiques ne se trouvant que dans la phase H₂O.

La BSA, quant à elle, se lie pratiquement de la même façon aux tannins des différentes phases. Par contre, on remarque, que la combinaison aux tannins de la phase éther diéthylique est un peu plus élevée.

On peut donc suggérer que la liaison tannin-BSA est inversement proportionnelle au degré de polymérisation.

3.5-Conclusion :

D'après les résultats de cette expérience, on arrive à la conclusion que la combinaison des tannins aux polymères organiques existe, et qu'elle est peut être dépendante de la structure, du degré de polymérisation des tannins, de la nature et structure de la substance organique, comme le confirme LE BOUVERLLEC (2005). Les tannins causent donc une perte de la valeur énergétique de certaines substances (surtout protéiques) se trouvant dans l'alimentation, et sont considérés de ce fait comme étant antinutritionnels. EL ADAWY (2000) a mis cet effet en évidence en utilisant les mêmes substrats (BSA, Gluten, Amidon) mais en suivant une autre méthode d'application.

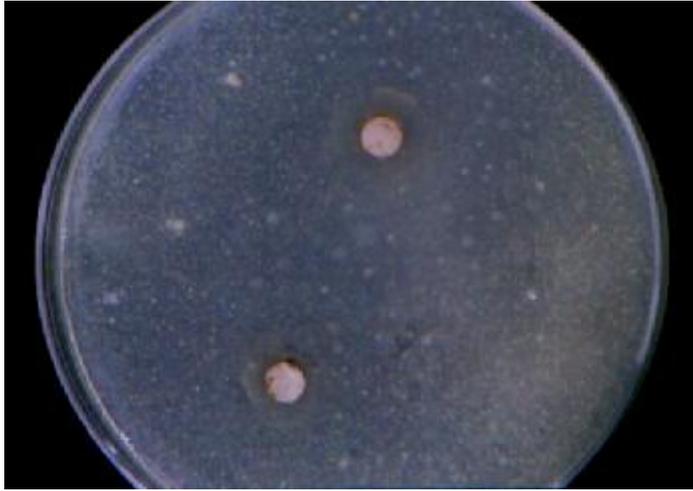


Photo 06 : Zone de précipitation de la boîte : H₂O / Gluten / d₂



Photo 07 : Agrandissement de la zone : H₂O / BSA / d₂

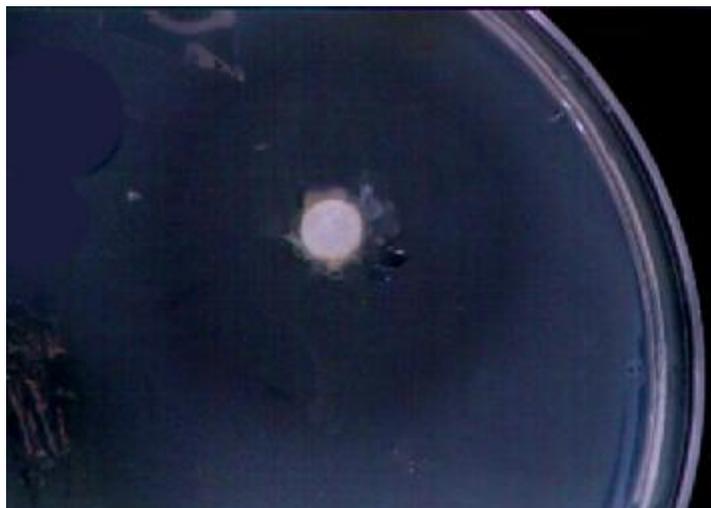


Photo 08 : Agrandissement de la zone ; BSA / phase éther diéthylique / d1

4*Dégradation des tannins par les moisissures :

4.1-Ensemencement des boites :

L'ensemencement des boites de pétri contenant le milieu Sabouraud à partir de la solution du sol donne après 3 jours d'incubations plusieurs types de mycéliums : verts, noirs, blancs... , de différentes structures : cotonneuses, granuleuses, poudreuses... ..

On remarque qu'un mycélium blanc, granuleux de forte conidiogénèse noire est très répandu sur les boites. Sa grande vitesse de croissance lui permet de s'étaler sur de grandes surfaces du milieu.

Un autre mycélium vert gris, au revers blanc, de structure dense et duveteuse est aussi très présent sur les boites. Sa croissance paraît plus lente mais très répandue (3 à 4 mycéliums de 1,5cm de diamètre dans une même boite après 3 jours d'incubation).

On décide de mener notre étude sur ces deux mycéliums qu'on nomme respectivement : mycélium 1 et mycélium 2.

4.2-Isolement des mycéliums :

Quelques repiquages successifs nous permettent d'isoler les mycéliums 1 et 2.

Sur le milieu Sabouraud, le mycélium 1 apparaît sous forme de thalles blancs dressés avec une forte conidiogénèse noire et une structure aérée. Après 3 jours d'incubation, il atteint 5cm de diamètre, puis 7cm après 5 jours recouvrant ainsi la quasi-totalité de la boite.

Le mycélium vert gris, quant à lui présente une croissance toujours plus lente : 2cm après 3 jours d'incubation et 4cm après 5 jours. Aux premiers temps, le thalle est de couleur vert clair, puis se transforme en vert gris conservant sa structure duveteuse et dense.

4.3-Observation microscopique :

Les mycéliums isolés sont soumis à une observation au microscope sous grossissement 10 puis 40 ; ceci pour essayer de déterminer le genre et si possible l'espèce des deux mycéliums.

Afin d'avoir une bonne appréciation des structures on utilise une solution de lactophénol.

Le mycélium 1 :

Sous microscope, ce dernier affiche un thalle cloisonné avec des hyphes peu colorées et transparentes. Les spores sont unicellulaires disposées en chapelets divergents sur des stérigmates globuleux ; le tout porté par des conidiophores non ramifiés. La forme des stérigmates en tête d'épingle et la disposition des spores nous permettent d'identifier l'espèce : *Aspergillus niger*.

Le mycélium 2 :

Il apparaît sous le microscope cloisonné, peu coloré et transparent. Les conidiophores ne sont pas ramifiés et portent à leurs extrémités des stérigmates en faisceaux et des spores en chapelets.

On peut identifier par cette observation le genre *Penicillium*. Les fructifications restent difficiles à observer ; on n'arrive pas à détecter des structures bien séparées caractéristiques de l'espèce.

Nos deux mycéliums 1 et 2 correspondent donc à *A.niger* et *Penicillium sp*.

4.4-Croissance sur le milieu A :

Sur ce milieu, *A. niger* se manifeste sous forme de thalle vert duveteux au revers gris. Les conidiophores, verts ici, sont présents dès les premiers jours d'incubation (photo 9). Après 10 jours d'incubation, le mycélium recouvre la totalité de la boîte et se transforme en une structure plissées radialement.

Penicillium Sp , conserve la même couleur et la même texture du thalle que sur le milieu Sabouraud. Sa croissance est plus lente ; après 6 jours d'incubation le thalle n'atteint que 3cm (photo 11).

Ces résultats affirment que ces deux espèces *A. niger* et *Penicillium sp* sont toutes deux capables d'utiliser l'acide tannique comme seule source de carbone. Confirmant leur capacité à produire la tannin-acyl-hydrolase, conformément aux travaux de SABU (2004).

La plus grande vitesse de croissance d'*A. niger* le place comme meilleur producteur de cette enzyme comparée à *Penicillium sp* ne contredisant pas de ce fait les conclusions de ALBERTSE (2002) et PINTO (2001) affirmant que les aspergilles sont plus rentables lors des utilisations industrielles pour la production de la tannase sur des milieux ne contenant que de l'acide tannique.

4.5-Croissance sur les milieux B et C :

Sur ces milieux, les deux espèces montrent une croissance.

A. niger donne sur le milieu B un thalle blanc, dressé, porteur de conidiophores noires. Le mycélium croît ici plus en hauteur que sur la surface du milieu et plus en surface qu'en hauteur sur le milieu C. Contrairement à son aspect sur le milieu A, cette espèce affiche une structure filamenteuse très aérée similaire à celle présente sur le milieu Sabouraud (photo 12). Sauf qu'ici, les thalles sont plus en hauteur et la conidogénèse est moins importante. La croissance est visiblement très lente.

Penicillium sp conserve le même aspect sur les milieux B et C que sur les milieux A et Sabouraud : le thalle est vert clair au début puis devient vert gris au revers blanc et la texture est toujours duveteuse. La croissance, quant à elle, devient encore plus lente : après 6 jours d'incubation, le diamètre des mycéliums n'atteint que 2,5cm (photo 10).

On en déduit que les tannases produites par *A. niger* et *Penicillium sp*. sont toutes deux capables d'hydrolyser les tannins condensés en plus des tannins hydrolysables (SABU 2004 et MAKAPATRA 2005). Ceci explique en partie leur présence dans le sol entourant les arbres de *Quercus suber* aux écorces riches en tannins condensés (KHENNOUF 2004).

4.6-Comparaison de la croissance :

Les vitesses de croissance des deux espèces sur les milieux utilisés (Sabouraud, A, B et C) peuvent être classées comme suit :

Milieu sabouraud > milieu A > milieu B \cong milieu C.

A. niger et *Penicillium sp*. croient plus rapidement sur milieu Sabouraud du fait qu'il contient des sources de carbones plus facilement dégradables. Il représente, en effet, un milieu idéal pour la croissance des moisissures.

La croissance sur le milieu A est inférieure à celle sur le milieu Sabouraud indiquant que nos moisissures utilisent moins facilement l'acide tannique. En réalité la tannase est une enzyme inductible, synthétisée seulement quand il n'y a que des tannins dans le milieu (ALBERTSE 2002).

Sur les milieux B et C, la croissance est très faible comparée aux autres milieux. Ceci nous informe que les tannases dégradent plus difficilement les tannins condensés. C'est peut être dû à leur grands degrés de polymérisation.

4.7-Conclusion :

A. niger et *Penicillium sp.* isolés sont capables de dégrader les tannins condensés et les tannins hydrolysables. Ces deux espèces produisent une tannin-acyl-hydrolase et peuvent de ce fait être utilisées pour la production industrielle de cette enzyme. Dans ce but, il est préférable d'utiliser l'acide tannique, plutôt qu'un tannin condensé, comme source de carbone du fait qu'il permette de plus grandes vitesses de croissances , et donc une meilleure production enzymatique. D'autres études indiquent que l'addition du glucose à l'acide tannique augmente encore la productivité. (ALBERTSE 2002).



Photo 9 : *A. niger* sur milieu A après 3 jours d'incubation

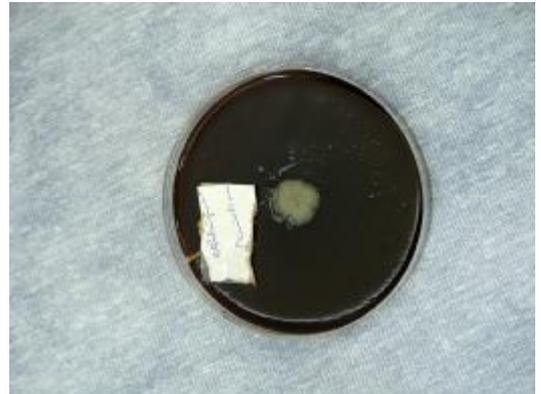


Photo 10 : *Penicillium sp* sur milieu C après 6 jours d'incubation



Photo 11 : *Penicillium sp* sur milieu A après 6 jours d'incubation



Photo 12 : *A. niger* sur milieu B après 6 jours d'incubation

5*Activité antiradicalaire des polyphénols :

Le spectrophotomètre nous indique que l'absorbance initiale du DPPH à 517nm est de 1.28

Nos extraits une fois ajoutés à la solution de ce dernier, causent une diminution de l'absorbance et la stabilisent à des valeurs minimales correspondant aux pourcentages suivants :

Les extraits flavoniques :

Phase éther : 66,40%

Phase acétate : 47,65 %

Phase aqueuse : 82,81%

Le spot 7 de la phase acétate : 70,31%

Le spot du dépôt de la phase acétate : 82,03%

Les extraits tanniques :

Phase éther : 70,31%

Phase acétate : 82,03%

Phase MEC : 78,90%

Phase butanol : 57,81%

Phase aqueuse : 60,93%

La quercétine nous donne une absorbance minimale de 0,28 , donc un pourcentage % inh. = 78,12%

On remarque que nos extraits ont tous diminué l'absorbance du DPPH à 517nm témoignant ainsi de leur action de balayage. En effet, la diminution de l'absorbance correspond à la diminution de la concentration (Loi de BEER-LAMBERT) : La quantité du DPPH libre présent dans la solution 1 molaire diminue donc après l'ajout des extraits. Ces derniers sont capables de piéger les radicaux libres.

Les extraits : H₂O des flavonoides, acétate et méthyléthylcétone des tannins et le spot 7 de l'acétate flavonique donnent les pourcentages d'activité plus élevés que celui de la quercétine, avec des valeurs se situant entre 78,90 et 82,81%. Les autres extraits donnent des résultats inférieurs. L'extrait acétate des flavonoides quant à lui, donne le pourcentage le plus faible (47,65 %).

Ces résultats nous informent que les tannins de *Vicia faba L.* comme les flavonoides de *Rosmarinus officinalis* sont dotés d'une activité antiradicalaire

comme l'affirme FLORENTIN (2004) et TOHGE (2005). Cette dernière variant d'un groupe de composés à un autre (différence entre les phases des différentes plantes) et d'une molécule à une autre (différence entre les spots 7 et celui du dépôt).

On explique de ce fait l'utilisation des composés polyphénoliques dans la fabrication des médicaments antiradicalaires (flavay, daflon...). Certains de ces composés sont aussi doués d'une activité antioxydante leur permettant d'être utilisés contre les différentes maladies (cardiovasculaires, peroxydation lipidique, cancer...) (NOMOTO 2004, LAHOUEL 2004, BONCHY 2001).

Dans notre travail, on n'est pas arrivés au point de mettre en évidence le pouvoir antioxydant de nos extraits, on ne parle que du pouvoir antiradicalaire.

Conclusion générale:

Dans notre travail, les études phytochimiques menées sur les deux plantes *Rosmarinus officinalis* et *Vicia faba L.* nous ont montré que ces deux plantes contenaient principalement des flavonoïdes de types flavone et flavonol pour la première plante et des tannins de type procyanidines pour la deuxième. *R.officinalis* nous a effectivement confirmé la présence de la lutéoline, l'apigénine et la quercétine qui lui sont connues.

Les applications réalisées sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp* et *Proteus mirabilis* nous ont démontré que les flavonoïdes du romarin ainsi que les tannins de la fève sont doués d'une activité inhibitrice sur ces pathogènes.

Les tannins de la fève ont aussi montré leur grand pouvoir de combinaison aux macromolécules nutritives, expliquant de ce fait leur action antinutritionnelle.

Aspergillus niger et *Penicillium sp* ont aussi prouvé leur capacité à lutter contre cette action en se développant sur des milieux ne contenant que des tannins condensés comme seule source de carbone, indiquant ainsi leur aptitude à produire la tannase.

En dernier lieu, on a démontré dans ce travail le rôle antiradicalaire de nos polyphénols contre le DPPH qui est un radical stable représentant les radicaux libre qui peuvent exister dans les cellules animales.

Références bibliographiques:

- Albertse** EH.2002. Cloning, expression and characterization of tannase from *Aspergillus* species. (Magister).
- Ananias** RA, Haluk JP, Mongel E, Zonlatian A. 2001. Dictionnaire du hêtre *Fagus Sylvatica* lors d'un séchage conventionnel basse température. Cahiers scientifiques du bois. 15 – 30.
- Babayi** H. Kolo I, Okogum JI.2004.The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogen microorganisms. Biochemisten: 16(2):102-105..
- Bahorun** T.1997. Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle.
- Basile** A, Giordano S, Lopez Saez JA, Cobianchi BC. 1999. Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. Phytochem : 2 (8) : 1419-82.
- Bataille** X. 2000. LIVRE interactif de chimie.
- Batawita** K, Kokon K, Akpagona K, Koumaglo K, Bouchet P. 2002. activité antifongique d'une espèce en voie de disparition de la flore togalaise : *Conyza aegyptiaca* (L) Ait. Var. *lineariloba* (DC) O. Hoffm (Asteraceae).
- Vanrullen** IB. 2005. Sécurité et Bénéfices des photo-estrogènes apportés par l'alimentation. Recommandation.
- Blytt** HJ, Guscar JK, Buttler LG. 1988. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannin may not be due to binding and inhibiting digestive enzyme. J. Chem. Ecol. 14 (5):1455-1465.
- Bolskakova** IV. 1998. Antioxidants properties of number of plant extracts. Biofisika 43 (2):186-188.
- Bruce** AN, Gold LS. 1999. La recherche mensuelle n°324 : 46-61.
- Chaplin** AJ. 1985. Tannic acid in histology and historical perspective. Stain-Technol.. 60 (4) : 219-31.
- Chatterjee A. 2004. Inhibition of *Helicobacter pylori* ; in-vitro by various berry extracts with enhanced susceptibility of clarithromycin. Mol. Cell. Biochem., 265(1-2) : 19 – 26.
- Cheruvanku** H. 2004. Method for treating hypercholesterolemia, hyperlipidemia and atherosclerosis. Unitat Stat Pat:6 (4): 733-799
- Cushnie** TP, Hamillthoh VES, Lamb AJ. 2003. Assesment of the antimicrobial activity of selected flavonoïds and consideration of discrepancies between previous reports. Microbiol Res :158(4):281-9
- De Mejia** EG. 2005. Tannins, Trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in therapy (*Phaseolus oculifolius*) and common (*Phaseolus vulgaris*). Plant Food Hum Nutr: 60(3):137-45
- Del Bano** MJ, Lorento J, Castillo J. 2004. Flavonoïd distribution during the development of leaves, flower, stems and roots of *Rosmarinus officinalis*. Postulation of a biosynthetic pathway. J Agric Food: 32(16):4987-92
- Delmeyda** W. Remise à jour 2000. méthodes de chimie analytiques et instrumentales (cours).
- Delmeyda** W. 2001. Méthodes analytiques en chimie instrumentale (site).chromatographie sur couche mince.
- Dictionary and Encyclopedia**. 2005. Produced by Lexico Publishing Group. Science direct. Com (cite).
- Didrak** M. 1999. antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, Salvia sp, and Phlomis sp). Journal of biology. 23: 241-248.
- Dixon** RA, Yuxie DE, Sharma SB. 2005.Proanthocyanidins : a final frontier in flavoïd research ? New Phytol: 165(1): 9-28
- **Drayne** T. 1999. Condensed vegetable tannins : biodiversity in structure and biological activities. Biochemical Systematics and ecology. : 27.(4): 445-459.
- Efstathiou** C. 1999. Monographies : plantes andiradicalaires.
- El Adawy TA, Rahma EH, El-badawy AA, Sobihah TY. 2000. Effet of soaking process on nutritional quality and protein solubility of some legume seeds. Nahrung: 44(5): 339-43
- Euzéby** JP. 2002. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.
- Euzéby** JP. 2002. Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire. Lonopinella, Lonopinella kaolarum (Lonopinella kaolarum : tannin – protéin complex degrading Enterobacteria(T. PCDE)).

- Euzéby JP.** Remise à jour 2005. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire (site). Evaluation in-vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques.
- Euzéby JP.** Remise à jour. 2006. Dictionnaire bactériologie vétérinaire (site).
- Masquelier J.** 2006. Flavay, for a healthy mind body: (site). More from 50 years of Research Reveals the Health benefits of Flavay.
- Florentin E (Relu).** 2004. fruits et légumes, polyphénols et santé.
- Fortin F.** 2001-2003. F²M International (site) L'indépendance pour la beauté et la santé.
- Friedli GL.** 1996. Bovin Serum Albumin (BSA) and soluble wheat protein (SWP). *Food Hydro* :10(2) : 255-261
- G.N.U.** Free documentation licence. 2006. Projet de Wikipédia. (site)
- Gedir JV, Sporns P, Hudson RJ.** 2005. Extraction of condensed tannins from cervid feed and feces and quantification using a radial diffusion assay. *J.Chem.Ecol*:31(12): 2761-73
- Gentrie D.** 2001. TP de chimie (site).
- Gilani GS, Cockell KA, Sepher E.** 2005. Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acids availability in foods. *J. AOAC. Int.*: 88 (3) : 967-87.
- Goel G, Puniya AK, Agnilar CN, Singh K.** 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturw.*:92(11): 497-503
- Gosse F, Guyot S, Roussi S, Labstein A, Fisher B, Seiler N, Raul F.** 2005. Chemopreventive properties of apple procyanidins of human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of edon carcinogenesis. *Carcinogenesis*: 26 (7) : 1291 – 5.
- Grisebach H.** 1982. Anthocyanidins as food colors.641-679
- Guanon D, Nitriema JB, Sourabié S, Traoré LK, I, Guisson IP, Kondogbo B.** 2003. Etude in vitro de l'activité antifongique d'extraits des inflorescences mâles de *Borassus aethiopicum* (Mart.) *Arecaceae*.
- Hagerman AE** 1987. Radial diffusion method for determining tannin in plant extract. *Journal of chemical. Ecology* 13: 437-449.
- .Hagerman A.E , L. G. Buttler.** 1981. The specificity of proanthocyanidins-protein interactions. *J. Biol. Chem.*: 256 (44):494-497.
- Hagerman AE.** 1989. Chemistry of tannin – protein complexation in chemistry and significance of tannins (R. W. Hemingway and J. J. Karchesy. Eds), Plenum Press: 323-333.
- Harborne JB.** 1989. Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod-Rep.*: 25(7): 85-109.
- Haslam E.** 1993. Skikimic acid, metabolism et metabolites. *Jhon wiley and sons* (ed.) 4: 331-343.
- Heimeur H.** 2004. Les polyphénols de *Pyrus mammosensis* (*Rosaceae*).
- Heller W, Forkmann G.** 1993. The flavonoïds advances in research since 1986.
- Ilic SB, Konstantinovic SS, Todorovic ZB.** 2004. Antimicrobial activity of bioactive component from flower of *Linum catharticum* Kit. *Physics, chemistry and technology* : 3(1), page : 73-77.
- James BD , Hooper NM, Houghton JD.** 2000. l'essentiel en biochimie (Livre).
- Jhonson I.** 1999. antioxydants et anticancéreux. *Biofutur* .:186: 14-15.
- Journal of Urology.** 2002. 168, (3) : 2070.
- Kandra L, Gyeman G, Zajacz A, Batta G.** 2004. inhibitory effects of tannin of human salivary α -amylase. *Biochem. Biophys. Res commun.* 319 (4): 1265-71.
- Khennouf S.** 2004. Gastroprotectives of polyphenolic compounds from *Quercus Suber* in rats and mice. *J.Agric.Food.Chem*:51(5):1469-73
- Kim YJ, Park HJ, Leem MJ, Chung JH, Kim HK.** 2005. anticancer effects of oligomeric proanthocyanidines on human colorectal cancer cell line. SNU-C4. *Agric.Food.Chem*: 91(21): 7805-9
- Kocisko DA.** 2004. Evaluation of new cell culture inhibitors of protease resistant prion protein against serapie infection in mice. *J. Gen. Verol.* 85 (8): 2479 – 83.

- Lahouel M**, Boulkour S, Segueni N, Fillastre JP. 2004. Effet protecteur des flavonoïdes contre la toxicité de la vinblastine, du cyclophosphamide et du paracétamol par inhibition de la peroxydation lipidique et augmentation du glutathion hépatique. *Heama*. :7 (3) : 313-320
- Lahouel M**. 2005. Interactions flavonoïdes - mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux. (thèse de doctorat). Université Constantine.
- Latte LP**, Kolodziej H.2000. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch* 55(5-6): 467-72
- Le Bourvellec C**, Bouchet B, Renard CM. 2005. New-covalent interactions between procyanidins and apple cell wall material. Part III : Study on model polysaccharides. *Biochem. Biophys. Acta*. 1725 (1) : 10-8.
- Le Bouverlec C**. 2005. Non-covalent interaction between procyanidins and apple cell wall material. Part III : study on model. *Biochem Biophys Acta* 1725(1): 10-8
- Lefont R**. Remise à jour 2006. Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. Site : Biologie et multimédia.
- Leitao DP**, Polizello AC, Ito IY, Spadaro AC. 2005. Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J Med Food*: 8(1):36-40
- Lopez-Lazaro M** 2000. Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poisons. *Naturforsch*: 735 (11-12): 898-902
- Makapatra K**. 2005. purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori nakazawa*. *Process biochemistry*. : 40(40) : 3251-3254.
- Mamatha B**. 2005. Screening of medicinal plants used in Rural Indian Folk medicine for treatment of diarrhea.
- Marfak A**. 2003. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène conmaronne.
- Marfak A**. 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation de depsides.
- Markham KR**. 1982. Techniques of flavonoïdes identification. Academic Press (ed.) : 6-10.
- Martini A**, Katerere DR, Eloff JN. 2004. Seven flavonoïdes with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J Ethnopharmacol*:93 (2-3): 207-12
- Mazauric JP**, Salmon JM. 2005. Interactions between yeast less and tannins and related compounds on demathophytes, mould fungi and yeasts.
- Mc Dougall GJ**, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. 2005. different polyphenolic compound of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *J. Agric.Food.Chem.* : 53 (7): 2760 – 6.
- Melignetter-Muller ML**. 1995. Méthode de précipitation des aptitudes de croissance des populations de microorganismes. (thèse de doctorat). Université Claude Bernard. Lyon-1.
- Merghem R** .1996. Les facteurs antinutritionnels (FAN) phénoliques de *Pisum Sativum L.* et de *Vicia faba L.* (Leguminosae) : Aspects structuraux génétiques et phénotiques.Thèse Doctorat. Univ. Claude Bernard Lyon.Univ. Constantine.
- Merghem R**, Jay N, Burn N, Voirin B, 2004. Quantitative analysis and HPLC isolation and identification of procyanidins from *Vicia faba L.* *Phytochem.Anal.* : 15:95-99.
- Mitjavila S**. 1980. Problèmes nutritionnels liés à la présence de tannins dans les aliments.
- Modak B**. 2001. Actividad antibacteriana de flavonoïdes aislados des exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol Soc Quin*: 47(1): 366-421
- Mole S**, Waterman PG. 1987. A critical analysis of techniques of measuring tannin in ecological studies. II. Techniques of biochemically defining tannin. *Oecologia*.: 72: 148-156.
- Moreno S**, Scheyer T, Romano CS, Nojnov R. 2006. Antioxydant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Rad Res*: 40(2): 223-31

- Nakaniski** K, Goto T, Itô S, Nabri S, Nozo S. 1975. Natural products chemistry. Academic Press (ed.) : 2: 218.
- Naturforsch** S. 2000. Phenolic constituents from lichen Parmotrema stuppeum. Naturforsh : 55(11-12) : 1108-22
- Nevine** ES. 1999. Portail institute Pasteur. Rapport d'activité de l'unité staphylocoques pour l'année 1999.
- Newsletter** N°8. (site) 2005. Elément actifs du mois, par l'équipe Parabolic biologicals.
- Notomo** H, Ligo M, Hamada H, Kojjima S, Isuda H. 2004. Chemoprevention of colorectal cancer by group seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in protifération and increase in apoptosis. Nutr. Cancer. ; 49 (1): 81 – 8.
- Nutranews** : Science, nutrition, prévention et santé. Déc. 2005. (site).Chimio prévention naturelle du cancer. A. Bouchy.
- Nutranews** : Science, nutrition, prévention et santé. Décembre 2005. (Site). Directeur de la publication : L. Freeman.
- Okamura** N, Haraguchi H, Hashimoto S, Yagi A. 1994. Flavonoïds in Rosmarinus officinalis leaves. Phytochem:37(5):463-6
- Okigbo** RN, Mbajinka CS, Njoku CO. 2005. antimicrobial potentials of (UDA) xylopia aethopica and Occinum gratissimum L. some pathogenous of man.
- ONUAA** : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. 1995.
- Orturno** A, Baidez A, Gomey P, Arenas MC. 2005. *Citrus perasidi* and *Citrus sinensis* flavonoïds : Their influence in the defense mechanism against *Penicillium digitatum*.
- Pinto** GAS, Leite SGF, Terz SC, Couri S. 2001. Selection of tannase producing *Aspergillus niger* strains. Brazilian Journal of Microbiology. 32. (1):75-79.
- Punyasiri** PA, Abeysinghe SB, Kumar V. 2005. Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infections. J Chem Agri:31(6):1315-24
- Ray** SD, Wong V, Rinkovsky A, Bagoji M, Raje RR, Bagh D : .2000. Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride induced nephrotoxicity dimethylinitrosamine (DMN) – induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol. ; 107 (1-2): 105 – 28.
- Renaud** V, Dudouet C. 1996. Le potager.
- Résémy** C. 1998. Les légumes et fruits sources de micronutriments protecteurs.
- Résémy** C. 2001. Des questions complexes. Equation-Nutrition N°12. (APRIFEL). Inra.
- Richter** . 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie : 322-323
- Robert** J. Remise à jour 2005. Dictionnaire des cancers de A à Z.
- Rodzko** V. 1999-2000. Abécédaire de phytothérapie.
- Rosset** GD(directeur général de l'OIV). 2002. Tannins œnologiques.
- Roulier** G. 2002. La méthode naturelle anti-âge.
- S.F.A.**: Société Française des Antioxydants. 2005. Conte vendu de la conférence polyphénols 2005 (23 et 24 novembre 2005). Institut des corps gras. ITERG.
- Sabu** A, Kiram S, Parday A. 2004. Purification and characterization of tannin-acyl-hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. Bioresour Technol:96(11): 1223-8
- Sadzuka** Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinae N, Hirota S. 1997. Protective effect of flavonoïds on doxorubicin induced radiotoxicity. Toxicoll Lett: 92(1) :1-7
- Scalbert** A. 2001. Polyphénols du thé : Sources alimentaires, consommation et biodisponibilité.
- Seigler** SD. 1998. Plant secondary metabolism (livre).

- Siess MH**, Le Bon AM. Canivence-Lavier.2000.Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoïds.
- Sivakumaran S**, Molan AL, Meagher LP, Kolb B. 2004. Variation in antimicrobial action of pranthocyanidins from *Dorycrum rectum* against rumen bacteria. Phys Chem: 5(3):106-111
- Tanimura S**, Kadomoto R, Tanaka T, Zhang VJ, Kouno I, Kohno M. 2005. Suppression of humor cell invasiveness by hydrolysable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase -2/-9 activity. Biochem. Biophys. Res. Commun ; 330 (4) : 1306 – 13.
- UNUP**:The United nations university press (UNUP) 1986. Food and Press nutrition bulletin.
- Tohge T**, Ohme M, Takagi M, Yamazaki M, Saito K, 2005. enhanced radical scavenging activity of genetically modified Arabidopsis seeds. Biotechnol. Lett. ; 27 (5): 297-303.
- Ulanowska K** .2006. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DNA, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. Arch. Microbial. 184 (5): 271-8.
- Voirin B**.1983.Spectral differentiation of 5hydroxy-3-methoxyflavones with mono-4', di 3',4' or 3',4',5' substituted B rings. Phytochem.22.p:2107-2115
- Wawizyniak JJ**. 1999-2000. L'essentiel de la chimie organique. (cours).
- Wikipédia**. 2001. L'encyclopédie libre.
- Yamanaka N**, Samu O, Nagao S. 1996. Grean tea catechins such as (-) epicatechin and (-) epigallocatechin accelerate Cu⁺² induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase.
- Yaou A**. 2001. Contribution à l'étude des composés favoniques d'une labiée : le Teucrium polium (thèse de magister). Université Constantine.
- Zhang XY**, Tanaka T, Betsumiya Y, Kusano R. 2002. Association of tannins and related polyphénols with the peptide gramicidins. Chem..Pharm.Bull ; 50 (2) : 258-62.
- Zhang WY** et al. 2005. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism Int. Immunopharmacol. : 5 (7-8): 1247 – 57.
- Zimmer Z**, Cordesse R. 1996. Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. Prod Anim : 9(3) : 167-179