

**République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

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

## Mémoire

**En vue de l'obtention du MAGISTER en**

**MICROBIOLOGIE APPLIQUEE**

**Option : BIOTECHNOLOGIES MICROBIENNES**

## Thème

*Extraction de la silymarine et étude de son  
activité antimicrobienne*

**Présenté par Melle KECHKAR Madina**

Soutenu devant la commission du jury composée de :

- |                    |                                 |            |
|--------------------|---------------------------------|------------|
| - Mr Boulahrouf A. | Prof, Université de Constantine | Président  |
| - Mme Mechakra A.  | MC, Université de Constantine   | Rapporteur |
| - Mme Kabouche Z.  | Prof, Université de Constantine | Examineur  |
| - Mr Kitouni M.    | MC, Université de Constantine   | Examineur  |

*Année Universitaire 2007-2008*

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes parents qu'ils trouvent ici toute ma gratitude  
pour leur soutien tout le long de mes études.*

*À mon frère et à mes sœurs*

*À ma grand-mère*

*À mes beau-frère*

*À mes neveux*

*À mon fiancé et toute sa famille*

*À mes amies et à toute ma famille*

## Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord **Mme MECHAKRA Aïcha**, Maître de conférences à la faculté de Sciences de la Nature et de la Vie, Université MENTOURI de Constantine, d'avoir accepté de m'encadrer, je la remercie également pour sa disponibilité et son aide tout au long de cette modeste recherche, qu'elle trouve ici toute ma gratitude.

Je remercie **Mme KABOUCHÉ Z.**, Professeur à la faculté des Sciences Exactes à l'Université Mentouri- Constantine d'avoir accepté de juger ce modeste travail et d'être parmi le jury.

Je remercie **Mr BOULLAHROUF A.**, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Constantine d'avoir accepté d'être le président du jury.

Je remercie **Mr KITOUNI M.**, Maître de conférences à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université de Constantine, d'avoir accepté d'être parmi les membres du jury de ce mémoire.

J'exprime mes vifs remerciements à **Mr BENLABED** - laboratoire de bactériologie de CHU de Constantine pour son aide.

Mes remerciements bien sur à toutes mes amies de la promotion pour leur sympathie et leur soutien moral tout le long de ces années de recherche.

Je remercie également toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Un grand merci à tous

# Sommaire

Abréviations

Liste des tableaux et figures

Introduction..... 1

## **Chapitre 1: Silybum marianum.**

1- Description botanique des compositae ..... 4

2- Caractères généraux du Chardon-Marie.....5

    2-1-Historique..... 5

    2-2-Systematique ..... 5

    2-3-Noms vernaculaires ..... 6

    2-4-Origine ..... 6

    2-5-Description morphologique .....7

    2-6-Reproduction .....8

3- Constituants chimiques de *Silybum marianum*..... 9

4- Pharmacologie et utilisations du Chardon- Marie ..... 9

## **Chapitre 2: les flavonoïdes**

1- Définition ..... 12

    2- Structure et classification ..... 13

        2-1- Structure..... 13

        2-2-Classification ..... 14

            2-2-1-Génines.....14

            2-2-2-Sucres et modes de liaison .....16

3-Distribution et localisation .....17

4- Biosynthèse et régulation ..... 18

    4-1-Biosynthèse .....18

    4-2-Régulation .....19

5- Synthèse chimique des flavonoïdes.....	20
6- Fonctions des flavonoïdes.....	20
7- Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes .....	21
7-1-Solubilité .....	21
7-2-Couleurs et propriétés spectrales .....	22
8- Propriétés biologiques .....	22
9- Méthodes d'études des flavonoïdes .....	24
9-1-Extraction .....	24
9-2-Séparation et purification .....	24
9-2-1-La séparation par précipitation directe ou par rupture de phase .....	25
9-2-2-La chromatographie sur papier .....	25
9-2-3-La chromatographie sur couche mince (CCM) .....	25
9-2-4- Chromatographies liquide haute performance (HPLC).....	26
9-3-Identification des flavonoïdes .....	27
9-3-1-Tests de coloration .....	27
9-3-2-Tests physiques .....	28

### **Chapitre 3 : les agents antimicrobiens**

1- Définitions .....	30
2- Les conditions affectant l'efficacité des agents antimicrobiens .....	30
3- Les différents types d'agents antimicrobiens .....	31
3-1- Agents physiques .....	31
3-1-1- la chaleur.....	32
3-1-2- les températures basses.....	32
3-1-3- la filtration.....	32
3-1-4- les radiations.....	32
3-2- Agents chimiques .....	33
3-2-1-Principaux types d'agents chimiques .....	33
3-2-2-Mode d'action .....	35
3-2-3-Les agents chimiothérapeutiques .....	36
3-3-Les substances naturelles	
3-3-1-Les flavonoïdes .....	36
3-3-2-Les tanins .....	37

4- Détermination de l'activité antimicrobienne .....	38
4-1- Coefficient phénol .....	38
4-2- Méthode de porte germe .....	39
4-3- Concentration minimale inhibitrice .....	39
4-4- Diffusion sur gélose .....	40
5- La résistance aux antibactériens .....	40
5-1- Mécanismes de résistance .....	41
5-2- L'origine et la transmission de la résistance .....	41
6- Principaux microorganismes en cause dans différents syndromes cliniques	
6-1- <i>E.coli</i> .....	42
6-2- <i>Enterobacter cloacae</i> .....	42
6-3- <i>Serratia marcescens</i> .....	42
6-4- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
6-5- <i>Staphylococcus albus</i> .....	43
6-6- <i>Candida albicans</i> .....	44
6-7- <i>Aspergillus sp</i> .....	44
6-8- <i>Penicillium sp</i> .....	44

## **Chapitre IV : Matériels et Méthodes**

1- Phytochimie de <i>Silybum marianum</i>	
1-1-Extraction des flavonoïdes :	
1-1-1-Matériel végétal .....	46
1-1-2-Méthode d'extraction .....	46
1-2- Préparation des extraits .....	47
1-3- Réactions de caractérisation des flavonoïdes.....	48
1-3-1- Réaction à la cyanidine .....	48
1-3-2- Test de chlorure ferrique .....	48
1-4- Séparation des flavonoïdes .....	48
1-5- Relation : structure- fluorescence .....	50

2- Étude de l'activité antimicrobienne	
2-1- Microorganismes testés .....	51
2-2-Préparations des extraits.....	51
2-3-Préparation des disques (patches) .....	51
2-4- préparation de l'inoculum.....	52
2-5- Diffusion en milieu solide.....	52
2-5-1- Ensemencement .....	52
2-5-2- Dépôt de disque et incubation.....	53
2-5-3- Lecture .....	53
2-6- Méthode de dilution en milieu liquide .....	53
2-6-1- Ensemencement et incubation.....	54
2-6-2-Lecture .....	54
2-7- Antibiogramme .....	54

## **Chapitre V : Résultats et discussions**

1- Partie phytochimie	
1-1-Extraction .....	56
1-2-Groupes chimiques caractérisés .....	57
1-2-1- Réaction à la cyanidine .....	57
1-2-2- Test de chlorure ferrique .....	57
1-3-Séparation des flavonoïdes .....	57
2- Partie microbiologie	
2-1- Diffusion en milieu solide .....	59
2-2- Antibiogramme .....	60
2-3- Dilution en milieu liquide .....	65
Conclusion et perspectives .....	67
Résumé.....	69
Annexe .....	72
Bibliographie.....	75

## Abréviations

**BN** : bouillon nutritif

**CCM** : chromatographie sur couche mince

**CMI** : concentration minimale inhibitrice

**Cr<sup>+3</sup>** : chrome

**DAB 9** : Deutsches Arzneibuch, 9

**A** : absorbance

**EtOH** : alcool éthylique (éthanol)

**HPLC**: high performance liquid chromatography

**MH** : Mueller- Hinton

**Rf**: rapport frontal

**RMN** : résonance magnétique nucléaire

*sp* : espèce

**V /V** : volume par volume

**YPG** : yeast peptone glucose



# *Liste des tableaux et figures*

## *I- TABLEAUX :*

- Tableau n°01 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.
- Tableau n°02 : Les rendements de l'extraction.
- Tableau n°03 : Résultat de la CCM dans le système chloroforme/ acétone / acide formique.
- Tableau n°04 : Diamètres de zone d'inhibition pour la phase acétate.
- Tableau n°05 : Diamètres de zone d'inhibition pour la phase butanol.
- Tableau n°06 : Résultats de l'antibiogramme (diamètre d'inhibition en mm).
- Tableau n°07 : Valeurs critiques des zones d'inhibition pour les Staphylocoques
- Tableau n°08 : Résultats de la méthode de dilution en milieu liquide pour la phase acétate.
- Tableau n°09 : Résultats de la méthode de dilution en milieu liquide pour la phase butanol.

## II- FIGURES :

Figure n°01 : *Silybum marianum*.

Figure n°02 : Structure des principaux composants actifs de *Silybum marianum* et leurs stéréoisomères.

Figure n°03 : Squelette de base des flavonoïdes.

Figure n°04 : Schéma de biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes.

Figure n°05 : Protocole d'extraction des flavonoïdes.

Figure n°06 : Résultats de la chromatographie sur couche mince.

Figure n°07 : *Candida albicans*.

Figure n°08 : *Staphylococcus aureus*

Figure n°09 : *Staphylococcus albus*.

Figure n°10 : (a) (b) antibiogrammes de *Staphylococcus aureus*.

Figure n°11 : (a) (b) antibiogrammes de *Staphylococcus albus*.

## Introduction

Un grand nombre de plantes (aromatiques, médicinales, des plantes-épices et autres) possèdent des propriétés biologiques très intéressantes qui trouvent des applications dans divers domaines, à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et agriculture. Cependant, l'évaluation des propriétés phytopharmaceutiques ; antioxydante et antimicrobienne demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine et les traditions médicinales folkloriques. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs (Teixeira da Silva, 2004). En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les composés phénoliques , les saponines et les huiles essentielles.

On a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leur actions bénéfiques, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmaceutiques prouvés sur l'animal ont été attribués à des composés tels que les alcaloïdes, les terpènes les stéroïdes et les composés polyphénoliques (Baharum, 1997).

Beaucoup de métabolites secondaires sont également importants pour notre alimentation (goût, couleur) alors que d'autres parmi les alcaloïdes, anthocyanines, flavonoïdes, quinine, lignanes, stéroïdes et terpénoïdes ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, des colorants, des arômes, des parfums et des insecticides (Pichersky et Gang, 2000).

Le continent africain est doté d'une biodiversité parmi les plus riches dans le monde, avec un nombre très élevé de plantes utilisées comme herbes, comme aliments naturels et pour des buts thérapeutiques. Plus de 5 000 substances naturelles différentes ont été identifiées et beaucoup d'entre elles se sont avérées utiles dans la médecine traditionnelle pour la prophylaxie et le traitement des maladies. Malgré la nature hétérogène du continent africain il y a eu peu d'efforts consacrés au développement des agents chimiothérapeutiques et prophylactiques de ces plantes (Farombi, 2003).

C'est pourquoi, nous nous sommes intéressé à étudier *Silybum marianum*, une plante médicinale bisannuelle courante dans les lieux secs et ensoleillés, très fréquente dans le pourtour méditerranéen.

Notre recherche vise à étudier en particulier l'activité antimicrobienne des extraits de cette plante, à savoir les flavonoïdes.

Pour cela, nous avons réalisé un travail en cinq chapitres. Le premier présente un abrégé de l'histoire de *Silybum marianum* ; le deuxième synthétise la classification, la biosynthèse et les activités biologique des flavonoïdes ainsi que leur méthodes d'études ; le troisième définit les différent agents antimicrobiens et leurs modes d'actions ; le quatrième résume les méthodes et techniques utilisées dans la réalisation de ce travail et enfin le sixième présente et discute les résultats obtenus dans cette étude.

## *Chapitre I*

*La plante :  
Silybum marianum  
(Chardon-marie)*

## 1- Description botanique des Compositae

La famille des Compositae est l'une des plus distribuées dans le règne végétal, elle comporte plus de 13 tribus, 1000 genres et 23 000 espèces (Guignard, 1994 ; Gaussen et Leroy, 1982). En Algérie, il en existe 109 genres et 408 espèces (Quezel et Santa, 1963) et en France, 111 genres et 638 espèces (Gaussen H, Leroy HF, 1982). Cette vaste famille est économiquement importante, elle fournit des plantes alimentaires : laitues (*Lactuca*), endives, chicorée (*Cichorium*), artichauts (*Cynara*) et salsifis (*Tragopogon*). Le tournesol (*Helianthus annuus*) est cultivé pour son huile riche en acides gras (Peris et coll., 1996).

Plusieurs espèces appartenant à la famille des Compositae sont utilisées en pharmacie : le semen-contra (*Artemisia cina* Berg), l'arnica (*Arnica montana* L.), la camomille (*Matricaria chamomilla* L. et *Anthemis nobilis* L.) (Guignard, 1994). Une des propriétés typiques de cette famille est sa richesse en composés naturels divers ; on y trouve les terpénoïdes, des flavonoïdes et des alcaloïdes (Harborne et Swain, 1969). *Silybum marianum* fait partie de cette famille.

Les Compositae, sont surtout représentés dans les régions tempérées et froides du globe (Paris et Moyse, 1971) ; ce sont principalement des herbes vivaces ou non, mais aussi des arbustes ou sous-arbrisseaux, parfois des herbes, rarement des plantes aquatiques ou des plantes grimpantes ou encore des épiphytes. Les feuilles sont le plus souvent alternes, mais aussi opposées ou radiales, simples exstipulées (Paulian, 1967).

## 2- Caractères généraux du Chardon Marie

### 2-1-Historique

Le nom Chardon-Marie, donné à cette plante tant en Anglais qu'en Français ou en Latin, lui vient d'une légende au sujet de la Vierge Marie qui, voyageant d'Egypte en Palestine, aurait donné le sein à l'enfant Jésus près d'un bosquet de chardon, quelques gouttes de son lait tombèrent sur les feuilles, d'où les nervures blanches caractéristiques de cette plante (Morazzoni et coll., 1993 ; Morazzoni et Bombardelli, 1995 ; Lupper, 1998). Par ailleurs, le terme *Silybum* désigne en Grec et en Latin un chardon comestible (Foster, 1995).

### 2-2-Systematique

La systématique du Chardon-Marie se résume comme suit (Deysson, 1979 ; Anonyme, 1984 ; Guignard, 1998 ; Spichiger et coll., 2000).

Embranchement	Phanérogames
Sous- embranchement	Angiospermes
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Astraceae (compositae)
Sous- famille	Tubuliflores
Genre	<i>Silybum</i>
Espèce	<i>Silybum marianum</i> (L.). Gaerthn

### 2-3- Noms vernaculaires

Les différentes appellations de la plante en français, arabe, berbère, anglais et allemands sont les suivants :

**Noms vernaculaires en français :** Chardon-Marie, chardon argenté, chardon notre-dame, chardon marbré, épine blanche, lait de notre dame, silybe de marie (Messegué, 1975 ; Peris et coll., 1996).

**Noms vernaculaires en arabe :** *chouk el djemel, bou-zeroual* ou *sûk ez-zerwal, hacoub* et *lichilic* (Bel Khada ,1997 ; Beloued, 1998 ; Beniston et Beniston, 1984).

**Noms vernaculaires en tergui ou berbère :** *Tawra, douj-n'ilour man*, (Beniston et Beniston, 1984 ; Bel Khada, 1997).

**Noms vernaculaires en anglais:** *milk thistle, holy thistle, lady's thistle, marian thistle, st mary thistle, silybum*. (Peris et coll., 1996)

**Noms vernaculaires allemands :** *mariendistel* (Peris et coll., 1996)

### 2-4- Origine

*Silybum marianum* est une plante endémique de la région méditerranéenne (Hauf, 1982 ; Guittonneau et Huon, 1983 ; Volak et Stodola, 1984). Elle est cosmopolite et s'étend de la mer à 700-1100 m d'altitude, sur les terrains incultes secs et rocailleux de toutes l'Europe occidentale et méridionale, ainsi qu'en Afrique du nord, on la trouve dans les champs, les décombres et les bords des routes (Beniston et Beniston, 1984 ; Guittonneau et Huon 1983). *Silybum marianum* est également cultivée dans les jardins ornementaux (Roche, 1991).

En Algérie, *Silybum marianum* est particulièrement répandue dans les hauts plateaux , la steppe, le sud de l'atlas saharien , les pâturages sablonneux et les lieux un peu humides ( Quenzel et Santa,1963).

*Silybum marianum* est aujourd'hui répandue en Amérique du Nord, si bien qu'on le trouve tant au Canada qu'au Mexique, la Nouvelle Zélande, l'Australie, l'Afrique du sud, le Chili et l'Argentine (Sindel, 1991 ; Gabay et coll., 1994).



## 2-5-Description morphologique

Mêlés à toutes les autres plantes qui foisonnent les longs des champs et des routes dont beaucoup sont aussi imposants qu'eux, les Chardons-Marie se reconnaissent à leurs belles têtes violacées qu'entourent les collerettes un peu défraîchies de leurs longues bractées épineuses (Beniston et Beniston, 1984 ; Luper, 1998 ; Pepping, 1999), (Fig. n°1). *Silybum marianum* est décrite comme une plante annuelle ou bisannuelle.



**Figure n°1** : *Silybum marianum*. (Martinez, 1997)

Elle est caractérisée par une racine pivotante, forte, longue, épaisse et fibreuse (Sindel, 1991). La tige est généralement ramifiée, atteignant environ 20 à 150 cm de haut, portant peu de feuilles sur la partie supérieure (Hauf, 1982 ; Guittonneau et Huon, 1983 ; Caremes, 1990).

*Silybum marianum* est caractérisé par ses grandes feuilles vert pâle brillantes, tachées de blanc, lobées et ondulées, bordées de dents épineuses à pointes jaunes acérées. Les feuilles de la base sont pétiolées, découpées en lobes à bord dentés épineux, en rosettes, très grandes, d'environ 1m.

Les feuilles supérieures sont plus petites et plus étroites, réduites et embarrassantes, à bords moins découpés mais très épineux. Elles présentent toutes de nombreuses nervures blanches donnant l'impression que la feuille est maculée de lait (Carames, 1990).

Les fleurs sont toutes tubuleuses réunies en capitules terminaux, solitaires, dépassant souvent 6 cm de diamètre, dont la plus part sont pourvus d'une épine atteignant jusqu'à 5 cm et se réfléchissant vers l'arrière. La corolle est dentée de couleur pourprée, 5 étamines formant un tube autour du style (Guignard, 1998).

La floraison est caractérisée par une inflorescence parsemée de capitule, par une pollinisation autogame et par une répartition hermaphrodite (Guittonneau et Huon ,1983).

La période de floraison s'étale du mois d'octobre jusqu'au printemps, elle dure environ deux mois (Dodd, 1989).

Les fruits sont des akènes luisants, de 6 à 7 mm, plats, lisses, et brillants et la couleur s'étend du noir au brun chiné ou marbré de jaune, surmontés d'une aigrette blanche (Sindel, 1991).

## **2-6-Reproduction**

*Silybum marianum* se reproduit par la graine. Les bourgeons non ouverts et entièrement formés de fleurs produisent des graines attachées à la plante (Groves et Kaye, 1989).

### 3- Constituants chimiques de *Silybum marianum*

Le fruit du Chardon-Marie contient entre 1 à 3 % de silymarine, un mélange de différents flavonolignanes issus de la taxifoline et de l'alcool coniférylique (Saller, 1995). Il s'agit notamment de la silybine (silybine A, silybine B), la silychristine, la silydianine et l'isosilybine (isosilybine A, isosilybine B) (Anonyme, 1995), ce sont les principaux composés responsables de l'action thérapeutique de la plante (figure 2). Mis à part ces flavonolignanes principaux, le fruit contient également d'autres flavonolignanes en plus faible quantité (déhydrosilibinine, 3-desoxysilichristine, silymonine, siliandrine, silybinome, silyhermine et neosilyhermine) (Halbach et Gorler, 1971), des flavonoïdes (quercétine, taxifoline, kampferol, apigénine) mais aussi 25-30% de protéines, ainsi que 20-30% de lipides (avec prédominance d'acide linoléique 60%, d'acide oléique 30% et acide palmitique 9%) et des stérols 0.63% (cholestérol, campesterol, stigmastérol et sitostérol.) (Meyer et Buchtela, 1999). La silymarine a été isolée pour la première fois en 1968, elle a comme formule moléculaire  $C_{25}H_{22}O_{10}$  et son poids moléculaire est de 482,45 (Saller, 1995).

### 4- Pharmacologie et utilisation de *Silybum marianum*

L'extrait de Chardon-Marie est utilisé en médecine traditionnelle depuis 2000 ans. Le fruit de *Silybum marianum* n'est pas cité dans la pharmacopée européenne actuellement en vigueur, par contre il se trouve dans le DAB 9 (pharmacopée Allemande) (Hartek, 1987).

- Les graines de *Silybum marianum* sont probablement parmi les meilleurs régénérateurs du foie.

- Les mécanismes d'action du chardon-Marie ne sont pas encore élucidés. On lui reconnaît un effet antioxydant, anti-inflammatoire et anti-prolifératif, anticancéreux, l'action hépatoprotectrice, quoique cliniquement démontrée, n'est pas encore expliquée (Jiang et coll., 2000; Gupta et coll., 2000 ; Bhatia et Agarwal, 2001).

- Une étude sur des patients recevant un médicament pour la maladie d'Alzheimer, la tacrine, démontre que le chardon-Marie diminue les effets secondaires gastro-intestinaux et cholinergiques du médicament (Allain et Schuck, 1999).

- Une étude effectuée sur des travailleurs exposés à des solvants industriels hépatotoxique (toluène), a démontré le potentiel détoxiquant du Chardon-Marie. Après 30 jours de traitement au Chardon-Marie, tous les paramètres de fonction hépatique (enzymes sanguins) et les plaquettes s'étaient améliorés significativement (Szila et coll., 1988).

- Plusieurs rapports mentionnent l'efficacité de *Silybum marianum* dans le traitement des empoisonnements à l'amanite (Carducci, 1996).

- Sa teneur élevée en acides gras insaturés lui permet d'entrer dans les régimes anti-cholestérol et pour la prévention des maladies cardio-vasculaires (Venkataraman, 2000).

## *Deuxième chapitre*

### *Les flavonoïdes*

## 1- Définition

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires végétaux. Ils constituent un des plus vastes groupes de polyphénols naturels et présentent un large champ d'activité biologique aussi bien chez les animaux que chez les végétaux (Richter, 1993 ; Stevens et coll. ,1998). Ce sont des substances colorées (Guignard, 1979) et sont responsables de la coloration de nombreux fruits, légumes, fleurs,... (Adrian et coll., 1995).

Biochimiquement, les flavonoïdes appartiennent à la famille des benzopyrones, la sous – classe des gamma-benzopyrones.

Il y a quelque années, les flavonoïdes étaient considérés comme des substances nocives puisqu'ils se sont révélés mutagènes pour les bactéries et génotoxiques pour les cultures de foie de rat (Nugon-baudon, 1994) ; mais aujourd'hui, on a découvert qu'ils présentent un grand intérêt pour beaucoup de domaines : industrie agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, etc (Diallo, 2003).

Aujourd'hui, on ne dénombre pas moins de 4000 composés et ils sont présents partout dans la plante : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus ; les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales de fleurs (Adrian et coll. ,1995).

## 2- Structure et classification

### 2-1-Structure

Les flavonoïdes sont des composés de la série  $C_6-C_3-C_6$  ayant deux noyaux aromatiques A et B, unis par un pont à trois carbone (Fig. 3). L'élément commun de ces composés, dont plusieurs milliers ont été décrits, est d'être rattaché à un noyau de base : le 2-phenyl-chromane (Bruneton, 1987).

La numérotation des atomes commence par l'hétéroatome d'oxygène avec passage au noyau A ; les deux atomes communs au cycle A et à l'hétérocycle ne sont pas numérotés, car toutes les valences sont occupées dans la structure des cycles et aucun atome ou radical supplémentaire ne pourra s'y ajouter. Dans le noyau B, la numérotation est indépendante et commence par le carbone lié au pont ou à l'hétérocycle (Rakipov, 1987). Il faut signaler que la numérotation est différente chez les chalcones et les auronés. La substitution des noyaux aromatiques se fait selon un schéma caractéristique, imposé par la biosynthèse ; les substituants peuvent être : OH, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>-O-(très rare) ou -O-Oside.

Le noyau A est habituellement substitué en 5 et en 7 ; un troisième oxygène, libre chez les chalcones en 6' est engagé dans le pont éther du pyranne ou du furanne central (2-benzylcoumaranes). Plus rarement, il est monosubstitué ou, au contraire, polysubstitué ; occasionnellement il peut être prénylé ou alkylé par un ose (Bruneton, 1987).

Le noyau B, dans la majorité des cas, est substitué par une fonction hydroxyle (en para) ou par deux (en méta et para). Une troisième substitution n'est pas rare (une en para et deux en méta), mais l'absence de substitution est exceptionnelle (Bruneton, 1987).

## 2-2-Classification

Selon la structure et le degré d'oxydation de l'hétérocycle, les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs classes. Nous allons d'abord classer les génines et ensuite nous évoquerons les sucres et leurs modes de liaison.

### 2-2-1-Génines

Ils sont divisés en 3 classes : les 2-phénylchromanes (flavannes), les 2-phénylchromones et les flaviliums.

**a) Les 2-phénylchromanes** ou flavannes sont subdivisés en 2 groupes : les flavanols et les Flavan-3,4 diols (leucoanthocyanidines). Les premiers sont les flavonoïdes les plus réduits et sont incolores ; on distingue les flavan-4-ols et flavan-3-ols ; ces derniers sont les plus répandus et sont plus connus sous le nom de catéchines. Les seconds (Les flavan-3,4 diols ou leucoanthocyanidines) sont Incolores, ils constituent avec les catéchols, le groupe des tanins condensés, vrais, non hydrolysables, de poids moléculaire élevé. Ils peuvent se transformer, dans certaines conditions (action de la lumière, chauffage dans un acide minéral dilué), aisément en anthocyanidine aux couleurs variées (Rakipov, 1987).

**b) les 2-phénylchromones** sont subdivisés en 4 groupes : les flavones les flavonols les flavanones et les flavanonols. Les flavones sont de couleur jaune, les dérivés hydroxylés et/ou méthoxylés sont fréquents. Les flavonols ou 3-hydroxyflavones sont toujours glycosylés Par différence avec les anthocyanidines, le groupement glucidique est le plus souvent relié en position 7 (Alais et Linden, 1997). Les flavanones ou dihydroflavones sont incolores elles ont une double liaison de moins que les flavones et ne comportent pas de groupement hydroxyle en position 3. Elles présentent de fortes similitudes avec les flavonols (Alais et Linden, 1997) et co-existent fréquemment avec les flavones correspondante (Florkin et Masson, 1962). Les flavanonols ou dihydroflavonols sont incolores, ils ont un OH en position 3 de plus que les flavanones.



c) les **flavyliums (2-phenyl benzopyrylium)** sont subdivisés en 4 groupes : les anthocyanidines, les chalcones les dihydrochalcones et les aurones. Les anthocyanidines sont des molécules ionisables (Alais et Linden, 1997), rouge en milieu acide, violet en milieu neutre et bleu en milieu alcalin. Elles sont présentes dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides ou anthocyanes (Bruneton, 1987 ; Ikan, 1969). Les Chalcones (benzylidène acétophénone) ont toujours un hydroxyle (-OH) en position 2', à l'exception de l'échinatine (Nakanishi et coll., 1975). Ce sont des isomères des flavanones et ont le cycle pyronique ouvert. Elles sont les premières formées lors de la biosynthèse des flavonoïdes. Les Dihydrochalcones sont des composés qui ont une double liaison de moins que les chalcones vrais. Relativement rares, elles sont rencontrées sous forme de glucosides. Les aurones (Benzal coumaranones) proches des chalcones, ce sont des composés qui virent à l'orangé vif dans les vapeurs d'ammoniaque. On les rencontre seulement chez les plantes appartenant à trois familles : Composées, Légumineuses, Scrofulariacées, où elles existent sous forme d'hétérosides (Rakipov, 1987).

D'autres auteurs ajoutent au groupe des flavonoïdes :

- **Les isoflavonoïdes**

Ce sont des flavonoïdes dont le cycle B est lié en position 3. C'est une classe de composés très variés ; on peut distinguer : les isoflavones, les isoflavanones, les isoflavanes, etc. Leurs dérivés possèdent beaucoup de propriétés (Bruneton, 1987).

- **Les biflavonoïdes**

Ce sont des formes dimères de flavonoïdes. Cependant, les tanins vrais ou condensés, sont exclus de ce groupe. Les flavonoïdes impliqués sont, généralement, les flavones et les flavanones substitués en 5, 7,4' (ou occasionnellement 5, 7,3',4') ; la liaison interflavonoïdes est carbone-carbone ou rarement éther, les monomères de flavonoïdes sont de même ou différent types et la position de la liaison varie largement (Markham, 1982).

### 2-2-2- Sucres et modes de liaison

La formation d'hétérosides correspond à un mécanisme de détoxification de la cellule vis-à-vis de composés plus ou moins toxiques mais dont la plante a besoin pour édifier ses structures ou pour lutter contre les prédateurs et les parasites. Elle correspond également à la nécessité de solubiliser les génines pour les rendre physiologiquement actifs (cas des pigments comme les anthocyanines qui ne développent leur coloration qu'en milieu aqueux) (Guignard, 2000).

Les flavonoïdes apparaissent généralement sous forme glycosylée avec un ou plusieurs hydroxyles liés à un ou plusieurs sucres. Ceci a pour conséquence de rendre les flavonoïdes moins réactifs et plus solubles dans l'eau ; cette dernière propriété permet leur stockage dans les vacuoles cellulaires. On a des O-Hétérosides et des C-hétérosides. Les o-hétérosides sont de loin les plus fréquents. Tous les hydroxyles peuvent être glycolysés, mais avec une préférence pour celui en position 7 des flavones, isoflavones et flavanones ; celui en position 3 et 7 des flavonols, flavanonols (dihydroflavonols) ; et celui en position 3 et 5 des anthocyanidines. Les C-hétérosides ou C-glycosilflavonoïdes ne sont pas rares ; la liaison s'établit entre le carbone anomérique et l'ose et, le plus souvent, une flavone.

Le glucose est le sucre le plus fréquemment rencontré, cependant le galactose, le rhamnose, le xylose et l'arabinose ne sont pas rares. D'autres sucres sont occasionnellement rencontrés : allose, mannose, fructose, apiose et des acides glucuronique et galacturonique. On rencontre aussi des disaccharides associés à des flavonoïdes, la diversité structurale des hétérosides est plus grande chez les flavonols (Diallo, 2003).

### 3- Distribution et localisation

Les flavonoïdes sont largement distribués dans le règne végétal où ils existent sous la forme soluble d'hétérosides. Quasiment absents chez les algues, ils apparaissent chez les Bryophytes.

Chez les Fougères et les Gymnospermes, ils sont présents mais leur variété structurales est faible ; ils sont, par contre, très largement représentés chez les Angiospermes où leur diversité structurale est maximale.

Les flavonoïdes sont particulièrement abondants dans certaines familles : Polygonacées, Rutacées, Légumineuses, Ombellifères et Composées. Présents dans tous les organes aériens, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles, boutons floraux) (Rakipov, 1987).

Vraisemblablement synthétisés au niveau des plastides cytoplasmiques, les flavonoïdes s'accumulent dans le suc vacuolaire. Présents dans le mésophylle et l'épiderme des feuilles, dans la cuticule épidermique des fruits, ils peuvent aussi exister dans d'autres organes (Bruneton, 1987).

Les anthocyanines naturelles sont aussi bien retrouvées dans les plantes de la zone tempérée que celle de la zone tropicale ; elles sont caractéristiques des plantes supérieures. Elles sont seulement recensées dans les quatre familles suivantes : Bignoniacées, Gesnériacées, Sterculiacées et Théacées (Karé, 2001). Les flavonoïdes sont différemment distribués au sein des populations (Shiv et coll., 1999) et des taxons (Min-Ha et coll., 2000). On retrouve les flavonoïdes chez les animaux, notamment dans les ailes des papillons ; mais ces flavonoïdes proviennent des aliments ingérés par l'animal (Luckner, 1972).

## 4- Biosynthèse et régulation

### 4-1-Biosynthèse

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 : naringine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthétase 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 C<sub>3</sub>.

Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthétase ou la dihydroflavonol-4-réductase, 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 pelargonodol, sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase se transforme en anthocyanoside : pelargonidol-3-glucoside. 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). (Fig. n°4)

## 4-2-Régulation

La biosynthèse des flavonoïdes est induite par plusieurs facteurs :

### 4-2-1-la lumière

Les radiations UV augmentent la synthèse des composés phénoliques (Navin et Madhoolika, 1998). C'est le système du phytochrome qui est impliqué dans le domaine des grandes longueurs d'ondes ; ce sont cependant des irradiations dans les longueurs d'ondes du bleu et de l'ultra violet qui induisent spécifiquement la synthèse des glycosides de flavones et de flavonols, en augmentant l'activité et la synthèse – *de novo*- des enzymes responsables.

### 4-2-2-les facteurs de stress

Comme les températures extrêmes et les concentrations de sel, le manque de substances nutritives, le manque d'eau et l'infection par des pestes, ont aussi une action inductrice sur la biosynthèse des flavonoïdes. En effet, lors de la lutte contre les virus, les viroïdes, les bactéries et les champignons ainsi que lors de résistances non spécifiques ou lors de réactions d'incompatibilité, la plante forme des substances de défense : les phytoalexines, pendant la phase d'hypersensibilité ; si ces dernières dérivent des composés phénoliques de base, la vitesse de synthèse des enzymes du métabolisme général des phénympropanoïdes augmentent considérablement. Les cellules répondent à ces effets (lumière, stress) en augmentant la vitesse de transcription de tout gène, dont les produits jouent un rôle déterminant dans l'augmentation d'une résistance aux UV ou d'une défense contre l'infection (Diallo, 2003).

## 5- Synthèse chimique des flavonoïdes

Théoriquement, il y a au moins quatre voies de synthèse du squelette C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> des flavonoïdes à partir de matériel simple, mais seulement deux présentent une importance pour la synthèse au laboratoire : condensation d'une unité C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub> (2-hydroxyacétophénone) avec une unité C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>(aldéhyde aromatique) selon la voie A ; acylation d'un phénol (unité C<sub>6</sub>) avec un dérivé de l'acide cinnamique ou son équivalent (unité C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) selon la voie B, qui correspond aussi à la voie biosynthétique.

En outre, beaucoup de flavonoïdes peuvent être préparés en modifiant cette structure en C<sub>15</sub> par oxydation, par isomérisation, par O- et C-alkylation, par glycosylation ou par hydrolyse partielle (Geissman ,1962 ; Harborne et coll., 1975).

## 6- Fonctions des flavonoïdes

On leur connaît un rôle physiologique très important aussi bien dans le règne végétal qu'animal. En raison de leur structure phénolique, les flavonoïdes sont capables de se fixer sur certaines enzymes et protéines, et de modifier ainsi les équilibres enzymatiques ; ils joueraient un rôle dans les chaînes d'oxydo-réduction et modifieraient certaines réactions concernant la croissance, la respiration et la morphogenèse (Karé ,2001).

Les flavonoïdes ont un pouvoir anti-oxydant, ils auraient également une action protectrice des autres pigments vis-à-vis de la lumière ultra violette (Guignard, 1979) : c'est un écran vis-à-vis des radiations nocives ; ce rôle d'écran contre les UV les prédestinent à une protection de l'ADN des cellules profondes. Cette protection fut nécessaire à la conquête des terres émergées.

Les flavonoïdes sont responsables de la coloration des fleurs, en UV ils attirent et guident les pollinisateurs favorisant ainsi la reproduction de l'espèce (Guignard, 2000).

.....

Certains flavonoïdes auraient des propriétés fongicides et protégeraient contre l'intrusion des champignons et des insectes. D'autres au niveau de la feuille, auraient un rôle attractif ou répulsif sur les insectes herbivores, entraînant ou non la consommation du feuillage. Ils interviennent également dans la résistance aux infections virale (Diallo, 2003).

Certains flavonoïdes jouent un rôle important dans la formation des nodules chez les espèces qui sont en symbiose avec rhizobium (Harborne, 1973 ; Shin-Ming et Penny, 1999 ; Manyani et coll., 2001) ; d'autres du groupe des isoflavonoides fonctionnent comme les phytoalexines. Ces dernières, principalement chez les légumineuses, sont synthétisées comme moyen de défense contre le stress : micro-organismes infectieux, froid, rayon UV (Navin et Madhoolika ,1998).

Des auteurs ont montré que la teneur en anthocyanes exerce un impact sur les propriétés optiques foliaires ; la production d'anthocyanes augmente l'absorbance des longueurs d'ondes vert jaune, proportionnellement à la teneur en pigment (Neil et Gould, 1999).

## **7- Propriétés physico-chimiques des flavonoïdes**

### **7-1-Solubilité**

La solubilité des flavonoïdes dépend, en grande partie, de la nature et du nombre de substituants : plus le nombre d'hydroxyles libres est élevé, plus ils sont solubles dans les solvants polaires et vis- versa (Harborne et coll., 1975). Si en règle générale, les hétérosides sont solubles dans les alcools et l'eau, un certain nombre d'entre eux ont une solubilité peu marquée (rutoside, hespéridoside). Les génines (ou aglycones) sont solubles dans les solutions aqueuses d'hydroxydes alcalins (Bruneton, 1987).

## 7-2-Couleurs et propriétés spectrales

Les flavonoïdes présentent une vaste gamme de couleurs. Cependant, certains sont incolores ; c'est le cas de flavonols, les flavan-3,4-diols, des flavanones, des flavanonols, des dihydrochalcones : ce sont les plus réduits (Rakipov, 1987). Souvent, les chalcones, les aurones, les flavones et les flavonols sont caractérisés par une coloration jaune. Quant aux anthocyanidines, elles se distinguent par une gamme de couleurs vives et variées allant du rose au violet –noir. Lorsque le nombre de substitution augmente dans les anthocyanidines, la coloration bleue devient plus intense (delphinidine), la méthylation des groupes hydroxyles conduit au contraire au rouge (malvidine).

Pour les tons rouge, bleu et violet des anthocyanes (glycosides), d'autres facteurs interviennent ; le plus important est la formation de chélates avec les ions métalliques ( $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ) (Ritcher, 1993). La combinaison entre plusieurs types de flavonoïdes peut entraîner des changements importants de couleurs. Cette diversité de couleur fait que les flavonoïdes présentent des propriétés spectrales en UV et visibilité qui permettent de les distinguer.

## 8- Propriétés biologiques

Les flavonoïdes constituent un groupe de substances très importantes qui présentent un grand intérêt dans beaucoup de domaines. Leurs propriétés anti-oxydante, inhibitrice, antivirale, anti-bactérienne, toxique, tinctoriale, ... les prédestinent à des utilisations dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires, cosmétique, etc. (Roulier, 2002)

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse ; leurs actions se situent au niveau des petites veines ou des capillaires : on a une diminution de la perméabilité et augmentation de la résistance des capillaires (action de la vitamine P). Ce sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires (Diallo, 2003).



Certains flavonoïdes possèdent des activités particulières : diurétique, antiazotémique, antispasmodique, anti-ulcère gastrique, anti-inflammatoire (Li et coll., 1999).

Les anthocyanes induisent une augmentation de la régénération physiologique du pourpre rétinien ; par électrorétinographie, on a montré qu'ils accélèrent l'adaptation de la rétine à la vision nocturne (Paris et Hurabielle, 1981).

Les flavonoïdes comme la quercétine du vin et du thé, inhibe l'agrégation plaquettaire *in vitro* (Blache, 2001). Les flavonols et les catéchols confèrent au thé des propriétés vitaminiques P. Certains flavonoïdes sont des puissants inhibiteurs de l'oxydation des particules lipoprotéiques de l'alfa-tocophérol de lipoprotéines ; ce qui permet de réduire les risques coronariens (Guibault, 2001).

Une étude épidémiologique indique une relation inverse entre le niveau de consommation de flavonoïdes et le taux de cancer (Kneki et coll., 1997).

Les flavonoïdes sont des molécules atoxiques, elles sont donc bien tolérées chez l'homme mais leur action est lente (Paris et Hurabielle, 1981) et elles ne sont absorbées par la muqueuse intestinale qu'en faible proportion (Adrian et coll., 1995).

Dans l'industrie alimentaire, les flavonoïdes sont utilisés comme colorants et édulcorants, certains anthocyanes sont des colorants végétaux autorisés à usage pharmaceutique et alimentaire (E163). Ils sont utilisés dans les produits de charcuterie, dans les produits laitiers, glaces et crèmes glacées, conserves de fruit et légumes (Moll, 1998).

Les isoflavones possèdent une activité œstrogénique, insecticide et fongicide ; certaines d'entre elles sont des poisons potentiels pour les poissons (Ikan, 1969)

En phytogéographie, les flavonoïdes sont utilisés pour séparer partiellement des populations en groupes géographiques (Shiv et coll., 2000), et pour délimiter des taxons (Min-Ha et coll., 2000).

En agricultures, des expériences ont montré que certains représentants de la famille des flavonoïdes notamment le flavonol et la flavone sont efficaces pour la lutte contre des champignons pathogènes des grains de céréales (Kalt, 2000).

## **9- Méthodes d'études des flavonoïdes**

### **9-1-Extraction**

Le mode précis d'extraction dépend naturellement, de la nature et de l'eau contenue dans le matériel végétal ; et du type de substance que l'on veut isoler. La procédure chimique classique pour obtenir des composés organiques à partir de matériel végétal séché, est l'extraction continue de l'échantillon sous forme de poudre dans le Soxhlet avec une gamme variée de solvants (Harborne, 1973). Cette méthode permet de séparer les flavonoïdes selon leur structure et leur degré de polymérisation ; en les affrontant avec plusieurs solvants allant du moins polaire au plus polaire.

### **9-2-Séparation et purification**

Les extraits issus de l'extraction, sont toujours de composition chimique très complexe et nécessite donc une séparation et une purification. Plusieurs techniques sont utilisées, soit individuellement, soit combinées.

### **9-2-1-La séparation par précipitation directe ou par rupture de phase**

Certaines substances deviennent insolubles et précipitent lorsque les conditions du milieu changent. Ainsi, certains flavonoïdes extraits à chaud précipitent lorsqu'on refroidit la solution. Quant on ajoute un solvant dans lequel le soluté est supposé insoluble, on obtient une précipitation car il y a une diminution du pouvoir solvant (Bassene, 2001).

### **9-2-2-La chromatographie sur papier**

Cette technique a été appliquée pour la première fois par Bate-Smith en 1948 pour la séparation des flavonoïdes. En 1950, Bath-Smith et Westall ont mesuré les valeurs de  $R_f$  (rapport frontal) de 36 flavones dans deux systèmes de solvants. Beaucoup de raisons appuient l'utilisation de la chromatographie sur papier dans la recherche de composés flavonoïdiques : La couleur naturelle de la plupart de ces composés dans la lumière visible permet la distinction entre anthocyanes et les pigments profondément colorés, la lumière ultraviolette révèle la plupart des autres flavonoïdes (Ikan, 1969).

### **9-2-3-La chromatographie sur couche mince (CCM)**

La chromatographie sur couche mince est avant tout un outil pour analyse rapide, et elle est extrêmement efficace à cet effet (Moore et Dalrymple, 1976). Elle est principalement utilisée pour déterminer le nombre de composés dans un échantillon, pour détecter un ou des composés donnés dans un extrait brut et, dans un tri préliminaire, pour trouver les conditions avant de faire une chromatographie sur colonne.

La CCM est une chromatographie d'adsorption ou de partition, la phase mobile se déplace par capillarité le long de la phase stationnaire. Chaque constituant possédant un coefficient d'adsorption propre et une affinité déterminée pour le solvant, progresse avec une vitesse qui lui est caractéristique.

.....

La localisation des constituants, distribués sous forme de tache entre le point de départ et le niveau atteint par le front du solvant, peut se faire soit par un examen en lumière ultraviolette, soit par pulvérisation d'un réactif chimique approprié. Après élution de ces zones avec un éluant approprié, on peut déterminer, avec une assez bonne approximation, la proportion de chacun des composés dans le mélange après analyse de chaque éluant.

La chromatographie sur couche mince présente beaucoup d'avantages : l'équipement en appareil est peu important, le développement nécessite beaucoup moins de temps, l'effet séparateur est supérieur à celui de la chromatographie sur papier, les quantités de substances nécessaire à l'analyse sont environ dix fois moins importants qu'en chromatographie sur papier, même des quantités extrêmement faibles se prêtent à des séparations bien nettes, possibilité d'utiliser des révélateurs agressifs, faible fluorescence propre aux adsorbants inorganiques, ce qui favorise l'identification des substances par observation en UV, etc. La méthode de travail appliquée dans l'analyse par CCM peut être transposée à des séparations à l'échelle préparative au moyen de couches plus épaisses et, dans la plupart des cas aussi, à des séparations par chromatographie sur colonne.

#### **9-2-4- Chromatographie liquide haute performance (HPLC)**

C'est une chromatographie sur colonne ; la phase solide (ou stationnaire) est contenue dans une colonne en verre ou en acier. Pour une colonne de diamètre donné, la hauteur de phase efficace pour une bonne séparation est fonction de la taille de l'échantillon. Après l'injection de l'échantillon à séparer au niveau du sommet du gel, l'élution peut se faire soit de manière isocratique (un seul solvant, une succession de solvant purs ou mélange de solvants) soit par un gradient de polarité. Chaque composé élué peut être caractérisé par le volume de solvant nécessaire pour le sortir de la colonne : c'est le volume d'élution, par le temps de rétention.

### 9-3- Détection des flavonoïdes

L'identification des flavonoïdes est réalisée à l'aide de tests de coloration et des tests physiques (UV, IR, RMN,...).

#### 9-3-1-Tests de coloration

##### a) Test au chlorure ferrique de l'éthanol ( $\text{FeCl}_3/\text{EtOH}$ )

Par addition de sels ferriques, les solutions diluées de phénols se colorent généralement en bleu, violet ou rouge. Cette réaction n'est pas observée lorsque la fonction hydroxyle est bloquée, sous forme d'éther par exemple (Peser et Piotier, 1954).

##### b) Test au Mg/HCl

Selon le composé flavonoïdiques en présence, on obtient une coloration. C'est ainsi par exemple, les flavanones sont colorés en rose, rouge, violet ou bleu ; les isoflavones en jaune ; les flavonols en rouge à rose ; les flavones en jaune à rouge. Les isoflavanones, les auronnes, les chalcones quant à eux ne donnent rien (Geissman, 1962).

#### 9-3-2-Tests physiques

##### a) Spectrophotométrie ultraviolette (UV)

La bande d'absorption UV stricte s'étend de 185 nm à 400 nm, alors que celle du visible va de 400 nm à 800 nm. Cependant, habituellement, on étend la bande UV de 185 nm à 800 nm (Nakinishi et coll., 1975).

.....

La spectrophotométrie ultra violette présente une importance particulière dans la détermination des structures flavonoïdiques. Le spectre UV et visible de la plupart des flavonoïdes consiste à deux maxima d'absorption majeurs : l'un appartient dans la région 240-285 nm (bande II) dû à l'absorption du noyau benzoyle A et l'autre dans la région 300 - 400 nm (bande I) dû à l'absorption du noyau cinnamoyl B.

La position et l'intensité relative de ce maxima d'absorption donnent une information déterminante sur la nature du flavonoïde et son degré d'oxydation. Non seulement les différentes classes de flavonoïdes présentent des spectres caractéristiques, mais ceux-ci peuvent être modifiés par ionisation (acétate, éthylates), par réaction avec des acides de Lewis (trichlorures d'aluminium) ou par la formation de complexes (borates) ; les déplacement des bandes sont étroitement dépendants de la nature des substituants et de la position des substituants (Breneton, 1987).

### **b) Spectre infra-rouge (IR)**

La bande d'absorption IR s'étend de  $4000\text{ cm}^{-1}$  à  $500\text{ cm}^{-1}$  (Nakanishi et coll., 1975). Les mesures IR permettent d'identifier certaines fonctions fondamentales comme les noyaux aromatiques, les carbonyles, les hydroxyles,....

## *Troisième Chapitre*

### *Les agents antimicrobiens*

## 1- Introduction

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les microorganismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires (CE, 2001).

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et selon leur spécificité d'action. Cette dernière peut globalement être répartie en deux types : action bactéricide (ou germicide) pour les agents ayant une action létale sur les bactéries, action bactériostatique pour les agents qui inhibent les bactéries sans les tuer. (Euzéby, 2005).

## 2- Les conditions affectant l'efficacité des agents antimicrobiens

La destruction des microorganismes et l'inhibition du développement microbien ne sont pas choses simples car l'efficacité d'un agent antimicrobien est affectée par au moins six facteurs :

➤ La taille de la population

Du fait qu'une fraction égale d'une population microbienne est tuée pendant chaque intervalle, il faut plus longtemps pour détruire une population plus petite.

➤ La composition de la population

L'efficacité d'un agent varie fortement avec le type d'organisme traité car les microorganismes varient fortement en sensibilité.

➤ La concentration ou l'intensité d'un agent antimicrobien

Souvent mais pas toujours, plus un agent chimique est concentré ou plus un agent physique est intense, plus les microorganismes sont détruits rapidement.



Généralement, l'effet de la concentration ou de l'intensité sur l'efficacité n'est pas linéaire. Parfois, un agent est plus efficace à faible concentration, par exemple, l'éthanol à 70% est plus efficace que l'éthanol à 95%, car son activité s'accroît en présence d'eau.

➤ La durée d'exposition

Plus longtemps une population est exposée à un agent antimicrobien, plus nombreux sont les organismes tués. Pour réussir une stérilisation, il faut utiliser une durée d'exposition suffisante pour réduire la probabilité de survie à  $10^{-6}$  ou moins.

➤ La température

Un accroissement de la température à la quelle une substance chimique agit, augmente souvent son activité. On peut utiliser fréquemment une plus faible concentration de désinfectant ou d'un agent stérilisant à une température plus élevée.

➤ L'environnement local

La population à détruire ou à inhiber n'est pas isolée mais elle est soumise à des facteurs de l'environnement qui peuvent offrir une protection ou favoriser la destruction. par exemple, comme la chaleur tue plus facilement à PH acides, la nourriture et les boissons acides telles que les fruits et les tomates, sont plus facilement pasteurisé que les denrées alimentaires plus neutres comme le lait (Prescott et coll., 2003).

### **3- Les différents types d'agents antimicrobiens**

#### **3-1- Agents physiques**

En raison de leur faible spécificité, la plupart des agents physiques antimicrobiens sont efficaces sur l'ensemble des microorganismes, en affectant les acides nucléique ou les protéines. Les quatre agents les plus fréquemment employés sont la chaleur, les basses températures, la filtration et les radiations.

##### **3-1-1-La chaleur**

C'est encore un des moyens les plus courant de destruction des microorganismes. Il faut distinguer deux grands types d'application : la chaleur humide et la chaleur sèche.

**a) Chaleur humide**

La chaleur humide tue les virus, les bactéries et les mycètes, La stérilisation à la vapeur est réalisée dans un autoclave.

**b) Chaleur sèche**

La mort des microorganismes résulte apparemment de l'oxydation des constituants cellulaires et la dénaturation des protéines. La stérilisation par la chaleur sèche est réalisée dans des fours électriques (four PASTEUR).

**3-1-2- Les températures basses**

La congélation à -20°C ou plus bas arrête la croissance des microorganismes Certains microorganismes seront tués par la rupture des membranes due à la formation de cristaux de glace. La réfrigération ralentit fortement la croissance et la multiplication microbienne mais elle ne l'arrête pas complètement. La réfrigération est donc une bonne technique de conservation mais pour une courte durée seulement.

**3-1-3- La filtration**

La filtration est une excellente méthode pour réduire la population microbienne .Plutôt que détruire directement les microorganismes contaminants, le filtre les retient simplement. Il y a deux types de filtres : les filtres épais et les membranes filtrantes. La méthode de filtration sert à stériliser des produits pharmaceutiques, des milieux de culture, des huiles, des antibiotiques et d'autres solutions sensibles à la chaleur.

**3-1-4- Les radiations**

La stérilisation ou la réduction d'une population microbienne d'un milieu donné, peuvent aussi être efficacement menées par l'emploi de différents types de radiations électromagnétiques : micro-ondes, rayons ultraviolets, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha, rayons X. Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application.

**a) Les radiations ultraviolettes (UV)**

Proches de 260 nm, sont très létales mais ne pénètrent pas le verre, les films de poussières l'eau et d'autres substances.

Le principal effet des UV est dû à leur action sur les acides nucléiques et ceci peut être létal pour la cellule.

### **b) Les radiations ionisantes**

Ce sont d'excellents agents de stérilisation et pénètrent en profondeur dans les objets, les radiations gamma stérilisent à froid des antibiotiques, des hormones, des seringues,...elles pasteurisent également la viande et d'autres aliments. L'irradiation élimine la crainte d'organismes pathogènes comme *E.coli* et *Staphylococcus aureus* (Prescott et coll., 2003).

## **3-2- Agents chimiques**

Les agents chimiques antimicrobiens sont très nombreux. Leur choix dépend de l'usage auquel ils sont destinés, de leur activité, de leur toxicité, de leur stabilité, de leur pouvoir corrosif ou colorant, de leur odeur, etc. Il existe des réactions de résistance aux substances antimicrobiennes (métaux, antibiotiques, etc.) qui aboutissent à l'apparition de biotypes nouveaux.

### **3-2-1-Principaux types d'agents chimiques**

#### **a) Agents oxydants oxygénés**

Le peroxyde d'oxygène  $H_2O_2$  (ou eau oxygénée) est un antiseptique efficace à 3% en solution aqueuse. Son utilisation est limitée en raison de sa décomposition rapide et du fait que des microorganismes catalase<sup>+</sup> sont résistants. Le permanganate de potassium et le peroxyde de zinc sont également des oxydants désinfectants.

#### **b) Chlore et dérivés**

Le chlore gazeux et ses dérivés constituent les antiseptiques les plus communs qui sont employés pour le traitement des eaux de boisson, de piscines, etc. L'action est complexe : l'oxygène naissant et le Chlore tuent les microorganismes, y compris les virus. Les formes sporulées sont plus résistantes (elles exigent des concentrations cent fois plus élevées).

**c) Autres halogènes : iode et dérivés**

L'iode est peu soluble dans l'eau, mais facilement soluble dans l'alcool ou des solutions aqueuses d'iodure de potassium ou de sodium. Les solutions iodo-iodurées (iode et iodure) ou teintures d'iode sont utilisées pour désinfecter les plaies superficielles. Le brome et ses dérivés peuvent sous certaines conditions être employés pour la désinfection de l'eau.

**d) Métaux lourds et sels**

Certains métaux peuvent être microbicides même à faible concentration en raison des interactions qu'ils peuvent avoir avec les protéines cellulaires. Les sels de métaux lourds les plus utilisés sont les sels d'argent et de mercure, de cuivre, de zinc.

**e) Alcools**

L'éthanol présente un bon effet antiseptique pour des dilutions de 50 % à 70%. Il est inactif sur les formes sporulées. Il dénature les protéines. Le méthanol est moins actif et plus nocif. Les alcools supérieurs (propylique, isopropylique, butylique, amylique) ont un pouvoir bactéricide qui augmente avec leur masse molaire, mais leur solubilité dans l'eau diminue parallèlement, ce qui limite leur usage.

**f) Phénols, crésols, autres composés phénoliques et aromatiques**

Le phénol et ses dérivés (hexachlorophène, crésol, etc.) sont utilisés comme agents microbicides. Cependant ces produits sont relativement peu actifs en particulier sur les formes sporulées. D'autres produits à cycles aromatique ont un bon pouvoir antimicrobien : chlorhèxidine (antiseptique basique), salicylanilide, carbanilides. Toute fois leur utilisation est limitée vu leur effet cancérigène.

**g) Colorants**

Leur pouvoir antiseptique est variable. Les principaux sont : bleu de méthylène, vert brillant, vert malachite, violet de méthyle, violet de gentiane, acridine. Certains agissent en altérant la membrane, d'autres se complexent avec les acides nucléiques. Plusieurs ont une action sélective sur les bactéries : le cristal violet, le vert de malachite, le vert brillant inhibent les bactérie Gram+ ; l'éthyle violet inhibe les Bacilles et sélectionne les entérocoques.

#### **h) Savons et détergents**

Les savons ont un pouvoir antiseptique qui varie en fonction des espèces. Leur action est liée à l'effet tensioactifs : abaissement de la tension superficielle et augmentation du pouvoir mouillant de l'eau. On peut citer les ricinoléate de sodium ; les germes sont éliminés par rinçage.

#### **i) Acides, anhydres, aldéhydes**

Les acides ont une action antimicrobienne indirecte par effet de pH. Des produits soufrés comme l'anhydride sulfureux, les sulfites, bisulfites et métrasulfites, peuvent être des agents très efficaces. Les vapeurs de formaldéhyde sont de bons agents antimicrobiens, leur pouvoir bactéricide augmente avec la température et l'humidité.

#### **j) Essences volatiles et huiles essentielles**

Les essences naturelles ont un pouvoir bactéricide lié à la présence de composés phénoliques. On peut citer les essences de girofle (désinfectant en chirurgie dentaire), de thym (Antiseptique intestinal et respiratoire, etc. Ces essences peuvent être remplacés par leur composé actif : thymol, eucalyptol, etc.

#### **k) Autres agents**

Les solvants de lipides sont actifs sur certaines bactéries et virus enveloppés (éther). Des gaz sont employés pour la désinfection de produits instables à la chaleur et la désinfection de locaux ou objets. La  $\beta$ -propionolactone, émet des vapeurs très actives. (Guiraud, 1998).

### **3-2-2- Mode d'action**

Les antimicrobiens chimiques agissent selon divers mécanismes :

a) altération (oxydation, hydrolyse, coagulation) des protéines ou dénaturation (Perte d'activité) des enzymes. Les alcools coagulent les protéines. Les agents oxydants, les métaux lourds oxydent ou se combinent avec les groupements SH des enzymes.

b) altération (hydrolyse, oxydation) des acides nucléiques, activité mutagène. Des colorants (violet de Gentiane) inactivent les acides nucléiques.

c) altération de l'enveloppe cellulaire (paroi, membrane). Il s'agit de l'hydrolyse de la paroi qui conduit à une destruction cellulaire sous l'effet de la pression osmotique (lysozyme) ou de la perturbation de la perméabilité cellulaire (agents liposolubles : phénol, savon, ...)

d) action sur d'autres grandes fonctions métaboliques comme la respiration (inhibée par le cyanure, l'azide, etc.), les activités de synthèse, etc. (Guiraud, 1998).

### 3-2-3- Les agents chimiothérapeutiques

Un agent chimiothérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses. Il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Il existe actuellement deux grandes catégories d'agents chimiothérapeutiques antibactériens. Ils ont des modes d'action comparables. Ils se distinguent principalement par leur origine : Les sulfamides, sont des produits de synthèse. Les antibiotiques beaucoup sont d'origine naturelle (les plus anciens) d'autres de synthèse ou d'hémisynthèse. Ils comprennent cinq groupes selon qu'ils affectent : la synthèse de la paroi, les échanges cellulaires, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines, certaines réactions du métabolisme intermédiaire (Guillaume, 2000).

### 3-3- Les substances naturelles

#### 3-3-1- Les flavonoïdes

##### a) Activité antibactérienne

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* (Ulanawska, 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*... (Didrak, 1999 ; Modak, 2001 ; Mamatha, 2005 ; Okigbo ; 2005).

.....

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. 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 *Staphylococcus aureus* (Sivakumaran et coll., 2004).

#### **b) Activité antifongique**

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 Ortuno (2005), qui démontre une activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones de *Citrus parasidi* de *Citrus sinensis* sur *Penicillium digitatum*.

En effet, la naringinine, l'hespéridine, la nobiletine, la simensentine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Citrus* servent à protéger ces derniers contre les attaques de *P. digitatum* (Ortuno, 2005). Aussi, les flavonoïdes des *Conyza aegyptica L.* ont une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporium canis*, *M. gypsum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida sp* (Batawita, 2002). D'autres flavonoïdes extraits de la poudre des inflorescences mâles de *Borassus dethiopum* ont une activité contre des dermatophytes comme *T. rubrum* grâce à des fractions flavoniques (Gnanou, 2003).

### **3-3-2-Les tanins**

#### **a) Activité antibactérienne**

Les tanins ont une action antibactérienne puissante leur permettant d'inhiber la croissance des bactéries ruminales (dont certains sont sporogènes) comme *Clostridium aminophilum*, *Butyvirbio fibrisolvens*, *Clostridium proteoclasterium* (Leitao, 2005 ; Chatterjee et coll., 2004), ainsi que les bactéries responsables de différentes infections chez l'homme : *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*. L'inhibition bactérienne par les tanins est dépendante de la structure et du degré de polymérisation de ces derniers, mais ceci n'est pas toujours le cas (Sivakumaran, 2004).

### b) Activité antifongique

Les tanins 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 tanins hydrolysables des différentes plantes qui agissent contre une large gamme de champignons filamenteux (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporium cassis*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*,...) et des levures opportunistes (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*,...) (Latte, 2000).

## 4- Détermination de l'activité antimicrobienne

Tester un agent antimicrobien débute souvent par une évaluation destinée à vérifier si les agents sont efficaces et à quelle concentration. On utilise des microorganismes pathogènes « modèles » comme témoin d'efficacité d'un traitement : *Micobacterium tuberculosis*, *Clostridium botulinum*, parfois *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* *E.coli*, parfois même des virus, Parmi les tests le plus courants, on distingue : le coefficient phénol, méthode de porte germe et la concentration minimale inhibitrice.

### 4-1- Coefficient phénol

Il s'agit de comparer l'activité d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test. Le coefficient phénol est égal au rapport entre la dilution du désinfectant et celle du phénol, dans des conditions opératoires donnée.

La validité de ce test est, cependant de portée limitée car elle n'est applicable que sur les composés ayant le même mécanisme d'action que le phénol. De plus les conditions de son application : test sur une culture bactérienne pure à une température et pendant un temps déterminé, limite sa signification (Bousseboua ,2002).



#### 4-2- Méthode de porte germe

La porte germe est constituée d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une culture de germe test. En général, séché vingt-quatre heures à 37°C, il est mis en contact avec le désinfectant pendant des durées croissantes. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du papier préalablement séché dans un bouillon nutritif et par essai de culture (Guiraud, 1998).

#### 4-3- Concentration minimale inhibitrice

L'évaluation de la concentration minimale inhibitrice (CMI) consiste à déterminer la plus faible concentration d'un agent antimicrobien, nécessaire pour inhiber la croissance d'un microorganisme. La CMI est déterminée par l'utilisation d'une gamme de dilution de l'agent antimicrobien, additionné à une série de tubes d'un milieu de culture liquide, de composition convenable. Après inoculation des espèces microbiennes étudiées et incubation dans les mêmes conditions la CMI est indiquée par le tube de la dilution à partir de laquelle aucune croissance microbienne n'est constatée. C'est-à-dire qu'aucune turbidité ou trouble ne sont observés dans le milieu.

La CMI est utilisée pour l'étude d'agents antimicrobiens divers. Elle présente cependant, certains inconvénients, car elle donne une réponse variable selon différents facteurs :

La nature du microorganisme testé ainsi que la quantité et la qualité de son inoculum, la composition du milieu et ses conditions physico-chimiques de culture. Cette méthode ne permet pas non plus de caractériser la nature lytique ou statique de l'action de l'agent antimicrobien, puisque ce dernier est maintenu en permanence au contact du microorganisme testé. Mais la standardisation rigoureuse des conditions techniques d'application de la CMI permet de comparer l'efficacité d'agents antimicrobiens différents sur une même souche microbienne ou l'action d'un même agent sur des souches différentes.

#### 4-4- Diffusion sur gélose

La méthode de diffusion dans la gélose (agar) est particulièrement adaptée à l'étude de l'action des antibiotiques sur la croissance des bactéries. Elle permet de déterminer leurs antibiogrammes, qui rendent compte de la sensibilité spécifique des différentes espèces bactérienne vis à vis d'antibiotiques donnés. Mais elle peut être adaptée au test d'autres agents antimicrobien. Elle consiste à utiliser des boites de pétri contenant un milieu gélosé convenable, déjà solidifié et inoculé de la souche microbienne testée. Des disques en papier filtre, préalablement imprégnés de quantités connues d'antibiotiques, sont alors placés en surface de la gélose.

Durant la période d'incubation, l'antibiotique diffuse dans la gélose à partir des disques, selon un gradient de concentration jusqu'à une limite de distance où sa concentration est la plus faible. Après incubation, on constate que dans la boite de pétri un développement bactérien normal dans la gélose, sauf autour des disques d'antibiotiques qui ont une action inhibitrice. Autour de ces disques on observe une zone d'inhibition exempte de développement microbien, avec un diamètre proportionnel à la concentration et à l'efficacité de l'antibiotique. Ce type de test est couramment utilisé dans la détermination de la sensibilité des bactéries pathogènes aux antibiotiques.

Les antibiogrammes ainsi définis sont d'un apport décisif dans la prescription des traitements aux antibiotiques dont l'utilisation est alors optimisée par l'emploi du composé auquel la bactérie infectante est la plus sensible. Il est à noter que certains antibiotiques, diffusent mal dans la gélose, il est préférable de déterminer la CMI en milieu liquide (Bousseboua, 2002).

### 5- La résistance aux antibactériens

La propagation d'organismes pathogènes résistants aux antibactériens est une des menaces les plus sérieuses pour un traitement efficace d'une maladie.

**5-1-Mécanismes de résistance**

Les bactéries deviennent résistantes aux antimicrobiens de différentes manières. Il faudrait préalablement noter qu'un type particulier de mécanismes de résistance n'est pas réservé à une seule catégorie de substance. Deux bactéries peuvent utiliser des mécanismes différents pour résister à un même agent chimiothérapeutiques. En outre, des mutants résistants apparaissent spontanément et sont ensuite sélectionnés. Les germes pathogènes deviennent souvent résistants simplement en empêchant la pénétration de l'antibiotique, une diminution de la perméabilité peut aboutir à une résistance.

Une seconde stratégie de résistance est de rejeter hors de la cellule la substance qui vient d'y entrer. Certains agents pathogènes ont, dans leur membrane plasmidique des transloquases, appelées souvent pompes effluentes, elles expulsent les drogues.

De nombreuses bactéries résistent à l'attaque en inactivant les antimicrobien par des modifications chimiques. Les antimicrobiens sont également inactivé par l'addition de groupe chimiques, des organismes résistants peuvent phosphoryler ou acytyler les antimicrobiens.

Comme chaque agent chimiothérapeutiques agit sur une cible spécifique, une résistance apparaît lorsque l'enzyme ou l'organite cible est modifié de façon à ne plus être sensible à cet agent. Une altération des enzymes sensibles peut diminuer les effets des antimétabolites. Les bactéries peuvent soit utiliser une voie alternative pour éviter la séquence inhibée par l'agent, soit augmenter la production du métabolite cible.

**5-2 L'origine et la transmission de la résistance**

Les gènes de résistances aux antimicrobiens sont présents à la fois sur le chromosome bactérien et sur des plasmides. Même si elles ne surviennent pas très souvent, certaines mutations spontanées dans le chromosome bactérien rendent les bactéries résistantes aux antimicrobien. Une bactérie pathogène est fréquemment résistante aux antibiotiques parce qu'elle contient un plasmide porteur d'un ou plusieurs gènes de résistance, on les appelle les plasmides R (de résistance). Les gènes plasmidiques de résistance encodent souvent des enzymes de destruction ou de modification des antibiotiques.

Un plasmide R, présent dans une cellule bactérienne, peut être assez rapidement transmis à d'autres cellules par des mécanismes normaux d'échange génétique comme la conjugaison, la transduction et la transformation. Du fait qu'un seul plasmide peut porter des gènes de résistance à plusieurs substances, une population pathogène peut devenir simultanément résistante à plusieurs antibiotiques (Prescott et coll., 2003).

## 6- Principaux microorganismes en cause dans différents syndromes cliniques

### 6-1- *Escherichia coli*

C'est un germe très courant anaérobie facultatif. Son habitat est le colon humain où il est le plus abondant, alors que sa survie est extrêmement difficile dans l'environnement.

*Escherichia coli* provoque principalement des infections du tractus digestif ; la plus connue étant la diarrhée du voyageur. Il est aussi à l'origine d'infections pulmonaires chez les personnes gravement malades. *Escherichia coli* est également le germe préférentiel des infections urinaires. Il est nécessaire de signaler que *E.coli* est considéré comme l'un des agents les plus connus causant des infections nosocomiales.

### 6-2- *Enterobacter cloacae*

C'est un germe qui colonise souvent les patients hospitalisés et plus particulièrement ceux traités par antibiotiques, et peut être à l'origine d'infections urinaires et de pneumonies, ainsi que d'infections cutanées. Il peut également être responsable de bactériémies, et c'est un pathogène dont l'incidence en milieu hospitalier a considérablement augmenté ces dernières années.

### 6-3- *Serratia marcescens*

Elle colonise les systèmes respiratoires, digestifs et urinaires des patients. Elle est responsable essentiellement des bactériémies, des infections des voies respiratoires inférieures.

.....

Ces infections sont dues à des germes qui proviennent des patients eux-mêmes ou de leur environnement. (Mirabaud, 1996).

#### **6-4- *Staphylococcus aureus***

Les souches de *Staphylococcus aureus* sont connues pour provoquer des infections cutanées : furoncles, folliculites, panaris, impétigo, abcès mammaires chez les femmes qui allaitent.

Les infections des muqueuses sont également fréquentes et peuvent atteindre les yeux (conjonctivites), les oreilles (otites), la sphère génitale (endométrite, salpingite) ou les voies respiratoires (pneumonies, pleurésies). Toutes ces infections cutané-muqueuses sont susceptibles de se compliquer et d'aboutir à des septicémies. *S. aureus* partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales.

#### **6-5- *Staphylococcus albus* : (*Staphylococcus epidermidis*)**

A la différence de *Staphylococcus aureus*, les staphylocoques " blancs " ou " à coagulase négative " principalement *Staphylococcus epidermidis* (70%), font naturellement partie des flores cutané-muqueuses de l'homme (bactéries commensales).

Ces staphylocoques sont potentiellement pathogènes essentiellement dans certaines circonstances : implantation de corps étrangers (prothèses osseuses ou cardiaques, sondes, cathéters,...) et/ou immunodéficience (SIDA, radiothérapie, chimiothérapie,...). Ces bactéries, dès lors considérées comme opportunistes, sont à l'origine d'infections graves (septicémies, endocardites, pyélonéphrites, méningites, ostéomyélites), dont la majorité sont des infections nosocomiales. De la même façon que les souches de *Staphylococcus aureus*, les souches de staphylocoques blancs isolées en milieu hospitalier sont fréquemment multirésistantes aux antibiotiques (50 à 70% des souches).

**6-6- *Candida albicans***

C'est une levure qui peut infecter différentes muqueuses : la cavité buccale, la muqueuse vaginale et l'œsophage. Elle est souvent responsable des infections nosocomiales systémiques. Les facteurs de risque de candidoses systémiques sont nombreux : autogreffe de moëlle, corticothérapie, chirurgie digestive lourde, réanimation, prématurité, brûlures étendues, ...

Au plan épidémiologique, tous facteurs de risque confondus, l'espèce *Candida albicans* est responsable d'environ la moitié des infections. Viennent ensuite, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* et *Candida parapsilosis*. Les autres espèces sont moins fréquentes et leur émergence dépend souvent d'écologies particulières.

**6-7- *Aspergillus sp***

*Aspergillus* est un champignon filamenteux (moisissure) dont les spores sont véhiculées par l'air et sont inhalées par tous les individus. Totalement inoffensif pour la majorité de la population, il peut cependant provoquer différentes formes de mycoses chez certains individus. L'espèce *Aspergillus fumigatus* est responsable de plus de 80% des aspergilloses humaines. Le champignon peut se développer dans une cavité préexistante dans le poumon et résultant d'une maladie antérieure, telle que la tuberculose ou la sarcoïdose provoquant un aspergillum.

**6-8- *Penicillium sp***

Ce sont des moisissures pour la plupart très communs dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations.

*Penicillium marneffei* est une espèce pathogène pour l'Homme, redoutable chez les patients séropositifs.

*Penicillium griseofulvum* largement répandue dans le sol et les matières en décomposition, cette espèce peut produire une mycotoxine dangereuse.

*Penicillium expansum* est un agent de pourriture des fruits (pommes et poires), cette espèce peut contaminer les jus de fruits et compotes (Anonyme, 2006-2007).

*Chapitre IV*  
*Matériels et méthodes*

## 1- Phytochimie de *Silybum marianum*

### 1-1- Extraction des flavonoïdes

#### 1-1-1- Matériel végétal

Notre étude est réalisée sur les graines d'une plante: *Silybum marianum*, dont la cueillette a eu lieu en Mai- Juin 2006 au niveau de CHAAB ERASSAS, c'est-à-dire quand la plante a atteint la phase de maturation et de sénescence totale. Les graines sont pulvérisées à l'aide d'un broyeur domestique.

#### 1-1-2- Méthode d'extraction

Les flavonoïdes sont extraits du végétal (graines) séché et broyé (100 g), par macération dans un mélange éthanol/eau (80/20 : V/V) (1000 ml). Cette macération se fait en trois temps, c'est-à-dire pendant trois jours successifs, avec changement de solvant chaque 24 heures, ceci pour permettre une meilleure extraction des composées flavonoïques.

Le volume total des macérations hydroalcooliques est filtré puis évaporé à sec sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

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

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



### 1-2- Préparation des extraits : affrontement avec les solvants

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

La phase aqueuse est affrontée successivement par les solvants suivants :

- éther de pétrole.
- chloroforme.
- acétate d'éthyle.
- butanol.

L'éther de pétrole permet d'extraire les impuretés, les molécules apolaires et surtout les lipides qui risquent de compliquer les épreuves chromatographiques.

Ces affrontements se font dans des ampoules à décanter, la phase aqueuse et le solvant (V /V) sont mélangés énergiquement en laissant s'échapper à chaque fois les gaz produits. Après un repos allant jusqu'à quelques heures, on récupère séparément d'une part, la phase aqueuse, et d'autre part, le solvant utilisé chargé de ses composés spécifiques. Pour chaque solvant (chaque partition), on refait deux à trois fois l'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 Rotavapor, puis pesées et reprise dans du méthanol (4 à 5 ml) (Fig. 5).

### **1-3- Réactions de caractérisation des flavonoïdes**

#### **1-3-1- Réaction à la cyanidine**

5 ml de l'échantillon de macération (graines pulvérisés et alcool) sont introduits dans un tube à essai. À cette solution sont ajoutés 5 ml acide chlorhydrique, 5 ml d'eau distillée et quelques copeaux de magnésium.

L'apparition d'une couleur rose orangée (flavones), rose violacée (flavonones), ou rouge (flavonols) rassemblée dans la couche surnageante de l'alcool indique la présence de flavonoïdes libres (génines). Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques. La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcone, les catéchines et les isoflavones (Nikiama, 2005).

#### **1-3-2- Test de chlorure ferrique**

Ce test est utilisé pour la détection des composés phénoliques. Environ 1 mg de produit est solubilisé dans l'éthanol auxquels sont rajoutées quelques gouttes de  $FeCl_3$ . La présence de composés phénoliques provoque la formation de complexes de couleur bleue ou violette (Pavia et coll., 1982).

### **1-4- Séparation des flavonoïdes**

La séparation des flavonoïdes a été réalisée par la méthode de chromatographie sur couche mince (CCM). La CCM s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexe de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction, et permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions sont bien déterminées.

.....

La mise en œuvre de la CCM nécessite plusieurs étapes :

➤ Préparation de la phase stationnaire

Dans notre étude, nous avons utilisé le gel de silice (G60). Il est préparé en mélangeant 30 g de la poudre de silice dans 60 ml d'eau distillée. Après étalement du gel sur les plaques en verre (20x10) et séchage, la phase stationnaire devient prête à l'utilisation.

➤ Choix de la phase mobile (systèmes solvants appropriés)

Quatre systèmes de solvants sont testés :

-1- butanol /acide acétique/eau (4/5/1) (solvant Pardridge).

-2- chloroforme/acétone/ acide formique (75/16.5/8.5).

-3- toluène /butanol/méthanol/éther de pétrole (2/1/1 /2).

-4- acétate d'éthyle / méthanol/ eau (50 /20 /10).

Nous avons retenu celui ayant donné les meilleures séparations (migrations) ; le deuxième (chloroforme/acétone/ acide formique (75/16.5/8.5).

➤ le dépôt

Le dépôt des extraits se fait linéairement de façon ponctuelle avec un capillaire. On fait plusieurs dépôts du même échantillon en même temps pour obtenir les produits séparés en grande quantité. Dans cette étude, nous avons travaillé avec trois extraits : phase chloroforme, phase acétate, phase butanol.

➤ développement des plaques

Les plaques sont placées dans la cuve de CCM après sa saturation par la vapeur du solvant d'élution. Le bord de la plaque où a été effectué le dépôt est trempé dans 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 taches que les constituants sur le trajet de migration du solvant.

➤ Visualisation des taches

La visualisation se fait :

- à l'oeil nu.
- avec un réactif spécifique de coloration (ex. vanilline /HCl).
- avec une lampe UV (254 et/ou 365 nm).
- en utilisant des plaques contenant un matériau fluorescent (ex : silicate de zinc activé au manganèse).

Dans notre travail, la visualisation des taches (spots) de flavonoïdes a été faite sous UV à 254 nm dans une chambre noire, puis elles ont été révélées avec  $\text{FeCl}_3$ .

### 1-5- Relation : structure- fluorescence

Les spots flavonoïques représentant les constituants séparés sont caractérisés par leur fluorescence (couleur) et leur facteur de rétention (Rf). L'examen sous UV fournit des informations importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. Il apporte des indications particulières concernant les substitutions.

Les relations entre la structure d'un composé flavoniques et sa fluorescence sous UV sont résumées dans le tableau 1.

## 2- Étude de l'activité antimicrobienne

### 2-1- Microorganismes testés

Les tests sont effectués sur des microorganismes provenant du CHU de Constantine, il s'agit des espèces suivantes :

- *E.coli*,
- *Enterobacter cloacae*.
- *Serratia marcescens*.
- *Staphylococcus aureus*.
- *Staphylococcus albus*.
- *Candida albicans*.
- *Aspergillus sp.*
- *Penicillium sp.*

### 2-2- Préparations des extraits

On s'est intéressé à l'activité antimicrobienne de deux extraits : phase acétate d'éthyle et phase butanol. Nous avons choisi ces deux extraits parce que la pharmacopée allemande indique que la silymarine se trouve dans ces deux phases.

Les phases sont évaporées à sec au Rotavapor et reprises dans 5 ml de méthanol, pour chaque nouvel extrait on a fait trois dilutions, ce qui donne 4 concentrations :

$$C_{\text{initiale}}, C_{1/2}, C_{1/4}, C_{1/8}.$$

### 2-3- Préparation des disques (patches)

Des disques de 0.5 mm de diamètre sont découpés dans du papier Wattman n°2 puis autoclavés pendant 20 min à 120°C. Ces disques sont ensuite trempés dans les principes actifs (phase acétate, phase butanol) (10µl) et laissés sécher pendant 15 à 30 min avant utilisation.

#### **2-4- Préparation de l'inoculum**

Les souches sont ensemencées dans des bouillons nutritifs (annexe 03) et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance.

A partir d'une culture sur BN, on a préparée une suspension en solution saline 0.9% NaCl. La suspension bactérienne a été bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland (annexe 05) ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

#### **2-5- Méthode de diffusion en milieu solide : (méthode des disques)**

Le principe de la méthode utilisée (Méthode de Kirby-Bauer, 1966), consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de la croissance microbienne autour d'une source d'antibiotique déposée à la surface de la gélose. Cette source peut être, soit du papier buvard imprégné d'une concentration fixe d'antibiotique, soit une cupule (puit cylindrique) remplie d'une dilution d'antimicrobien. Un gradient de concentration est obtenu par diffusion du produit antimicrobien à partir de la zone source ; aucune culture n'est alors observée dans la zone où la concentration d'antibiotique est égale ou supérieur à la CMI (concentration minimale inhibitrice). La mesure de la zone d'inhibition a lieu après 24 h d'incubation à 37°C.

##### **2-5-1- Ensemencement**

L'ensemencement est réalisé par inondation sur boîtes Pétri sur une épaisseur de 4 mm contenant de la gélose : Mueller-Hinton (MH) pour les bactéries (annexe 01), Milieu Sabouraud (annexe 02) pour les moisissures et levures. Les géloses sont séchées avant emplois.

L'ensemencement est effectué dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum

### 2-5-2- Dépôt de disque et incubation

A l'aide d'une pince stérile, les disques sont imprégnés par 10 $\mu$ l de chaque extrait à différentes concentrations calculées à partir de la concentration initiale de l'extrait et de la dilution (voir calculs en annexe 06):

- 76-38-19 et 9,5 mg/ml pour la phase acétate d'éthyle
- 56-28-14 et 7 mg/ml pour la phase butanol.

Les disques sont ensuite placés sur les géloses puis pressés afin de s'assurer de leur application. Chaque boîte contient au maximum 6 disques. Le méthanol est utilisé comme témoin négatif.

Les boîtes sont alors incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. La durée d'incubation est prolongée pour les levures et moisissures.

### 2-5-3- Lecture

Les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée.. Les manipulations sont répétées 3 fois pour s'assurer du bon déroulement de la méthode.

### 2-6- Méthode de dilution en milieu liquide

Le principe consiste à réaliser des dilutions croissantes d'une solution-mère d'un agent antimicrobien dans un milieu liquide ou gélosé approprié que l'on ensemence avec un inoculum calibré de la souche à étudier. Après 24 h d'incubation à 37°C, la plus faible concentration de la gamme produisant l'inhibition de la culture microbienne est qualifiée de CMI.

### **2-6-1- Ensemencement et incubation**

Nous avons introduit aseptiquement 100 µl des différentes concentrations des extraits dans des tubes à essais contenant 5 ml de bouillon nutritif pour les bactéries et du YPG liquide pour les levures et moisissures (annexe 04) puis d'une manière stérile nous avons ajouté 20 µl de microorganismes dans chaque tube, nous avons obtenu à la fin une série de tubes contenant différentes concentrations d'extraits. Après une bonne agitation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 h.

### **2-6-2-Lecture**

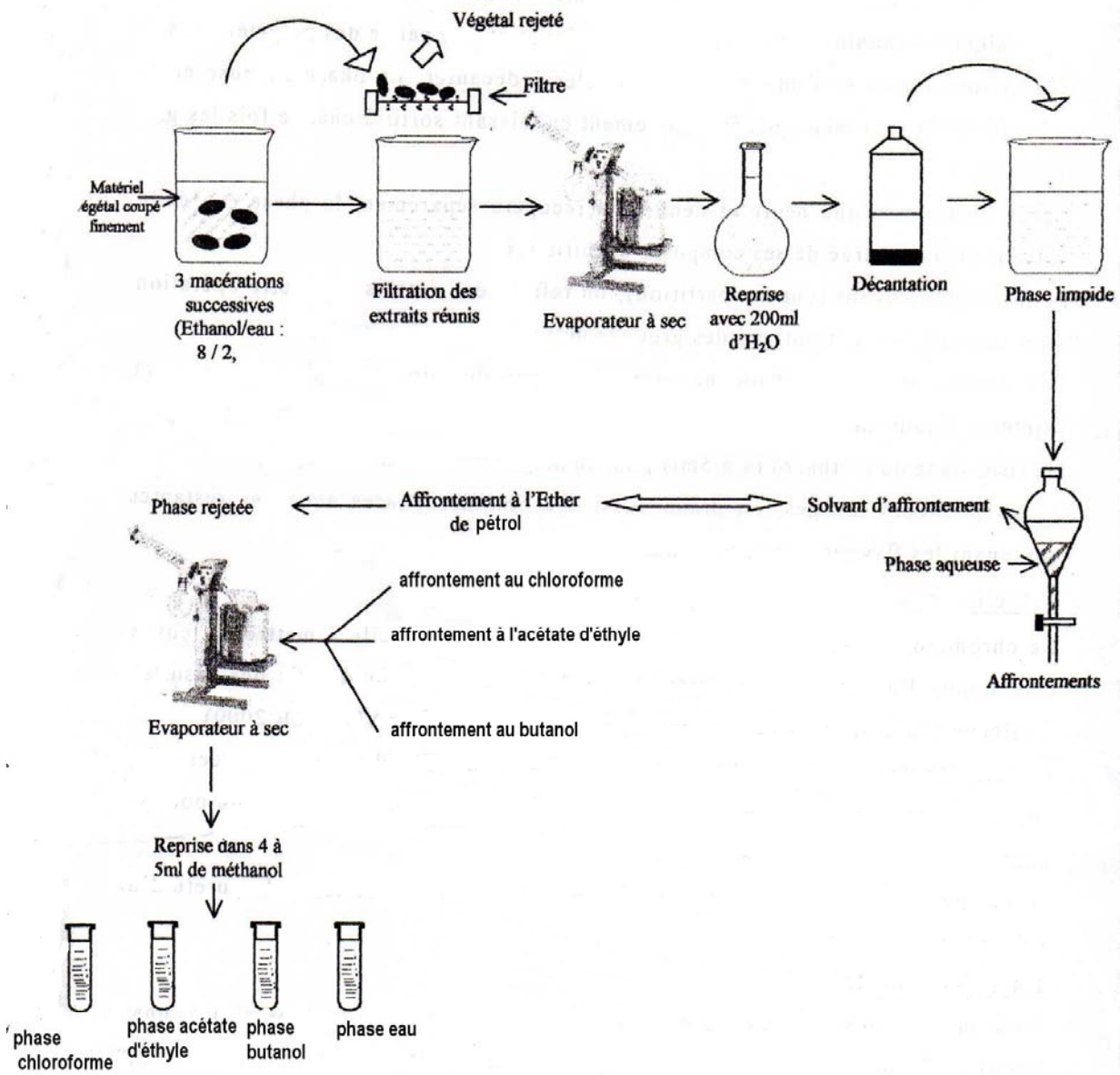
La lecture a été faite en comparant la présence ou l'absence de turbidité dans les différents tubes.

En parallèle nous avons utilisé pour chaque microorganisme un tube control ou témoin, contenant que le milieu de culture et le microorganisme concerné, pour s'assurer de la bonne croissance de nos souches.

### **2-7- Antibiogramme**

Un antibiogramme est réalisé suivant les mêmes étapes que celles décrites précédemment (diffusion en milieu solide). Les antibiotiques utilisés sont : oxacilline (OX) 1µg, gentamycine (GM) 10µg, minocycline (MNO) 30µg, spiramycine (SP) 100µg, fosfomycine (FOS) 50µg, lincomycine (L) 15µg, rifampicine (RA) 30µg, vancomycine (VA) 30µg, acide fusidique (FA) 10µg et erythromycine (E) 15µg. Cet antibiogramme est réalisé pour les Staphylocoques qui ont donné un résultat positif. L'expérience est répétée 3 fois. L'antibiogramme sert de test positif.





**Figure n°05:** Protocole d'extraction des flavonoïdes .

**Tableau n°1 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes.**

<b>Spots colorés</b>	<b>Types de flavonoïdes</b>
Violet- brunâtre	<ul style="list-style-type: none"><li>- 5 OH</li><li>- flavone 3-OH</li><li>- 5, 6,7 ou 5, 7,8-tri-OH</li></ul>
Violet	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavone ou flavone 5-OH</li><li>- flavonol sans 5-OH</li><li>- flavonol avec 3-OH</li></ul>
Jaune	<ul style="list-style-type: none"><li>- Flavonol avec ou sans 5-OH</li></ul>
Orange brillant	<ul style="list-style-type: none"><li>- isoflavone</li></ul>
Jaune verdâtre	<ul style="list-style-type: none"><li>- Aurones</li></ul>
Vert	<ul style="list-style-type: none"><li>- chalcones</li></ul>

## *Chapitre V*

### *Résultats et interprétations*

## 1-Partie phytochimie

### 1-1-Extraction

#### - Rendement

Les extraits éthanoliques récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant, cet extrait renferme les flavonoïdes, le rendement a été déterminé par rapport à 100 g de matériel végétal (graines de *Silybum marianum*); rendu en poudre ; subissant une extraction douce à température ambiante, les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 2.

**Tableau 2:** Les rendements massiques de l'extraction.

	Extrait brut	Phase chloroforme	Phase acétate d'éthyle	Phase butanol
rendements	2,56 g	0,41 g	0,38 g	0,28 g

D'après ce tableau, les valeurs obtenues sont conformes à ceux rapportées par certains travaux. En effet, dans une étude sur quatre plantes de la région de Tlemcen, Mohammedi (2005) a obtenu une masse en extrait sec inférieur de 5 %. Alors que Djabou (2005) a obtenu un rendement de 0,26% pour la phase acétate.

Par ailleurs, comme la macération est une méthode discontinue, le solvant devrait être remplacé jusqu'à ce que la matière végétale soit épuisée (Yrjonen, 2004), il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie de manière générale. En effet, le rendement n'est pas relatif ; il dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. D'autre part, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénol et flavonoïdes et en capacités antioxydantes (Lee et coll., 2003).

---

## 1-2- Groupes chimiques caractérisés

### 1-2-1- Réaction à la cyanidine

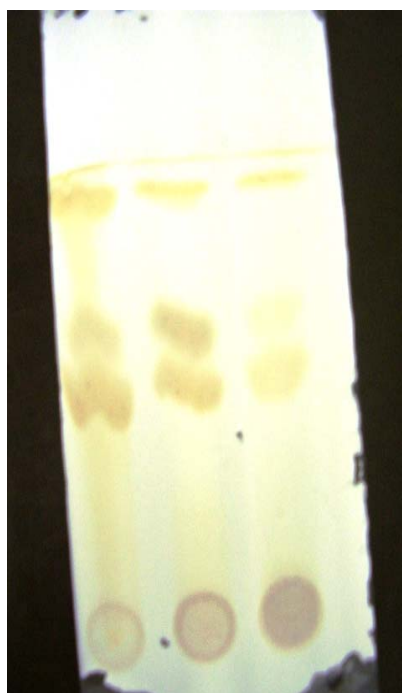
La réaction a donnée une coloration rose, ce qui indique la présence de flavones et/ou de flavanones.

### 1-2-2- Test de chlorure ferrique

Le test a donné une coloration bleu foncé, cela confirme la présence de composés polyphénoliques.

## 1-3- Profil flavonique sur CCM

Pour la CCM, le système choisi est : chloroforme/acétone/acide formique (75/16.5/8.5), il a donné la meilleure migration des spots (séparation visible). La plaque de la chromatographie montre trois taches, dans chacune des phases (chloroforme, acétate, butanol), de couleur marron-jaune à la lumière visible (Fig. n°6). Elles ont des Rf différents : 0.35-0.45-0.64, elles apparaissent sous UV d'une coloration violette, donc notre échantillon contient des flavones, la révélation par le FeCl<sub>3</sub> confirme qu'il s'agit de polyphénols.



**Figure n°6: Résultats de la chromatographie sur couche mince.**

**Tableau n°3 : Résultats de la CCM dans le système chloroforme/ acétone / acide formique.**

Détection	extrait	Rf	couleur
UV à 254 nm	Phase chloroforme	0.35	Violette
		0.45	Violette
		0.64	Violette
	Phase acétate	0.35	Violette
		0.45	Violette
		0.64	Violette
	Phase butanol	0.35	Violette
		0.45	Violette
		0.64	Violette

On remarque quasiment les mêmes spots dans les trois phases (chloroforme, acétate et butanol) cela veut dire que les trois phases contiennent les mêmes constituants chimiques puisque les spots ont les mêmes Rf.

Dans le même système utilisé dans ce travail (chloroforme /acétone / acide formique) et d'après le *DAB9* (Hartke et coll., 1989) la silymarine correspond à un Rf voisin de 0.4. Mais si l'on compare le chromatogramme à celui présenté dans le *Plant drug analysis*, il semble que la silybine (fraction majeure de la silymarine) migre à un Rf de 0.6 alors que la taxifoline à un Rf de 0.4 ; il n'est donc pas exclu que lors de la CCM une quantité de la silymarine s'est partiellement dégradée en taxifoline (scission de la fonction éther en milieu acide). Cette remarque ne permet toutefois pas de douter de la présence des flavonolignanes, puisque les Rf obtenus conviennent tout à fait à ce qui a été rapporté dans la littérature (Wagner et coll., 1996 ; Hartke et coll., 1989).

## 2-Partie microbiologie

### 2-1-Diffusion en milieu solide

La méthode de diffusion solide ou méthode de disque a pour but d'étudier l'activité antimicrobienne des substances naturelles. Elle a permis d'obtenir les résultats mentionnés dans les tableaux 4 et 5 et figures 7, 8 et 9. Ces résultats montrent une activité antimicrobienne de la phase acétate d'éthyle et de la phase butanol, pour les souches de Staphylocoques et la levure *Candida*.

**Tableau n°4: Diamètre de zone d'inhibition pour la phase acétate.**

diamètre d'inhibition en mm concentration en extrait sec en mg/ml					
Souches	phase acétate				méthanol 90%
	76mg/ml	38mg/ml	19mg/ml	9,5mg/ml	
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescense</i>	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	11	11	10	0
<i>Staphylococcus albus</i>	28	26	27	26	0
<i>Candida albicans</i>	16	16	16	16	0
<i>Penicillium sp</i>	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp</i>	0	0	0	0	0

**Tableau n°5 : Diamètre de zone d'inhibition pour la phase butanol.**

diamètre d'inhibition en mm concentration en extrait sec en mg/ml					
Souches	phase butanol				méthanol 90%
	56mg/ml	28mg/ml	14mg/ml	7mg/ml	
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescense</i>	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	12	10	0	0
<i>Staphylococcus albus</i>	24	20	17	17	0
<i>Candida albicans</i>	10	10	10	10	0
<i>Penicillium sp</i>	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp</i>	0	0	0	0	0

Le pouvoir antimicrobien le plus élevé de la phase acétate est observé pour *Staphylococcus albus* avec une zone d'inhibition de 28 mm. Par contre pour *S.aureus* il est de 12 mm et pour *Candida albicans* 16 mm.

Les substances végétales de la phase butanol, ont montré un pouvoir antimicrobien dont le diamètre d'inhibition le plus élevé est de 24 mm pour *S.albus* et 12 mm pour *S.aureus* et enfin seulement 10 mm pour *Candida albicans*.

Aucune zone d'inhibition n'est observée pour *E.coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescense*, *Penicillium sp* et *Aspergillus sp*.

### 2-2- Antibiogramme

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°6 et figures n°10 et n°11. Ils montrent des zones d'inhibitions les plus élevées de 40 mm pour *Staphylococcus aureus* avec la fosfomycine, la lincomycine et la rifampicine. Alors que pour *S.albus* elles sont supérieures à 40 mm avec la spiramycine, la lincomycine et l'erythromycine. Aucune zone d'inhibition n'est observée pour *S.albus* avec l'oxaciline et un diamètre d'inhibition de 9 mm et observé avec la gentamycine.

**Tableau n°6 : Résultats de l'antibiogramme (diamètre d'inhibition en mm).**

	OX	GM	MNO	SP	FOS	L	RA	VA	E	FA
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	22	20	30	40	40	40	22	34	25
<i>Staphylococcus albus</i>	Pas de zone d'inhibition	9	20	> 40	20	>40	40	15	>40	20



À partir des tableaux n°4 et n°5 et figures n°7, n°8, et n°9 on constate que deux extraits acétate et butanol ont une activité inhibitrice sur les Staphylocoques (*S. albus* et *S. aureus*) et sur la levure (*Candida albicans*).

Chez les bactéries Gram négatif et les moisissures, nous n'avons remarqué aucune zone d'inhibition, cela veut dire qu'il n'y a pas d'effet antimicrobien. Ces bactéries sont résistantes aux substances végétales contenues dans les deux extraits.

Le témoin (méthanol à 95°) n'a exercé aucune activité inhibitrice, les colonies se développent normalement en sa présence, donc c'est un bon diluant pour ces extraits.

#### ❖ *Staphylococcus aureus* :

Pour *Staphylococcus aureus* la zone d'inhibition est comprise entre 10 et 12 mm pour les deux extraits acétate et butanol.

La zone d'inhibition d'un bon agent antimicrobien diffère d'un auteur à un autre, d'après Pereira et coll., (2006) la zone d'inhibition doit être égale ou supérieure à 10 mm, pour Vieira et coll., (2001) elle est de 13 mm et selon Seokwon Kim et coll., (2006) elle est supérieure à 6 mm. Dans tous les cas, les substances végétales des extraits des graines de *Silybum marianum* pourraient être des bons agents antimicrobiens.

Le tableau n°7 synthétise les valeurs critiques des zones d'inhibition pour les Staphylocoques (Anonyme, 2007 ; Anonyme, 2007 ; Anonyme, 2005). Il permet d'évaluer les inhibitions obtenues avec chaque antibiotique.

Le diamètre d'inhibition de l'oxacilline est de 22 mm cela permet de classer *Staphylococcus aureus* dans la classe des microorganismes sensibles. Pour la gentamycine le diamètre d'inhibition de *Staphylococcus aureus* est de 22 mm, cette bactérie est sensible à cet antibiotique. La spiramycine a, de son côté, donné un diamètre d'inhibition de 30 mm, ce qui montre une sensibilité de *Staphylococcus aureus* à cet antibiotique. Pour la fosfomycine, le diamètre d'inhibition a été de 40 mm, ces bactéries sont également sensibles à cet antibiotique (tableau n°7).

Il en est de même avec la lincomycine et la rifampicine qui ont entraîné la formation de diamètres d'inhibition de 40 mm, *Staphylococcus aureus* est sensible à ces deux antibiotiques. Avec la vancomycine on a noté un diamètre d'inhibition de 22 mm, cette souche est sensible elle est également sensible à L'érythromycine qui a montré un diamètre d'inhibition de 34 mm. (Tableau n°7).

Par ailleurs, le diamètre d'inhibition de la minocycline est de 20 mm, la bactérie est donc résistante à cet antibiotique. Pour l'acide fusidique on a détecté un diamètre d'inhibition de 25 mm, la souche est résistante à cet antibiotique également (tableau n°7).

D'après tous ces résultats, on constate que les souches étudiées sont résistantes à la minocycline et l'acide fusidique.

#### ❖ *Staphylococcus albus* :

*Staphylococcus albus* a une zone d'inhibition comprise entre 26 et 28 mm pour la phase acétate et entre 17 et 24 mm pour la phase butanol. On constate alors que les substances végétales de ces deux extraits sont actifs (Pereira et coll., 2006), (Vieira et coll., 2001), (Seokwon Kim et al, 2006) et que l'extrait d'acétate est plus actif que l'extrait de la phase butanol.

À côté de la zone d'inhibition de *Staphylococcus albus*, on remarque une légère pousse de quelques colonies, cela nous explique que les extraits n'ont pas un effet bactéricide sur cette souche mais un effet bactériostatique.

Il faut savoir que l'antibiogramme permet seulement de dire si la molécule empêche la croissance d'une souche bactérienne donnée, il ne suffit donc pas pour dire si la bactérie est totalement détruite (Reinert, 2000).

.....

L'oxacilline n'a donné aucune zone d'inhibition, la souche est résistante à cet antibiotique. Avec la gentamycine le diamètre d'inhibition est de 9 mm, *S.albus* est résistante à cet antibiotique également.

L'acide fusidique et la minocycline ont tout deux donnés un diamètre d'inhibition de 20 mm, *S.albus* est résistante à ces deux antibiotiques. La vancomycine a donné un diamètre d'inhibition de 15 mm, elle est résistante à cet antibiotique aussi. La spiramycine, la lincomycine et l'érythromycine ont donnés tous un diamètre d'inhibition >40 mm, la souche est sensible à ces antibiotiques. La fosfomycine a donné un diamètre d'inhibition de 20 mm, la bactérie est sensible. La rifampicine a donné un diamètre d'inhibition de 40 mm, le microorganisme est sensible.

#### ❖ *Candida albicans*

*Candida albicans* a quant à elle une zone d'inhibition de 16 mm pour la phase acétate et 10 mm pour la phase butanol. Les substances de la phase acétate ont donc une meilleure activité inhibitrice par rapport à ceux de la phase butanol.

les extraits ont plus ou moins une bonne activité antimicrobienne sur les bactéries Gram+, ces résultats sont conformes avec les travaux de Lee et coll. (2003) ; mais contrairement à leurs résultats, *Candida albicans* est également sensible à la plante.

D'après Lee et coll. (2003), la sensibilité des bactéries à Gram+ est due à l'action inhibitrice de la silibine sur les protéines de synthèse et sur l'ARN. Par ailleurs, Pathak et coll. (1991), relie la sensibilité des Gram+ aux polyphénols soit à l'inhibition des enzymes nécessaires à la production de l'énergie dans la cellule bactérienne, soit au changement au niveau de la perméabilité de la cellule et aussi à l'inhibition de la synthèse de l'ARN.

Dans une étude sur l'effet antimicrobien des plantes polyphénoliques sur bactéries causant la détérioration des aliments, Toshitsugu Tagurie et coll. (2004) concluent que la sensibilité des microorganismes aux polyphénols, dépend de l'espèce elle-même et de la structure du polyphénol.

.....

Toutefois, la connaissance des mécanismes d'action des antibiotiques (action sur Gram+), permet d'expliquer la sensibilité des souches à ces antibiotiques.

C'est ainsi que la vancomycine inhibe la synthèse du peptidoglycane et donc de la croissance bactérienne ; la minocycline, inhibe la synthèse des protéines au niveau de la sous unité 30 S du ribosome ; l'erhytromycine et la spyramycine agissent en inhibant la synthèse protéique bactérienne (ils se fixent sur l'unité 50 S du ribosome et bloquent ainsi la réunion du dernier stade de la synthèse) ; la lincomycine agit sur la fraction 50 S du ribosome en inhibant la phase initiale de la synthèse protéique ; l'acide fusidique agit sur la synthèse des protéines ; la rifampicine agit en bloquant la transcription par inhibition de l'ARN polymérase ; la gentamycine perturbe la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30 S du ribosome entraînant la destruction bactérienne et l'oxacilline agit au niveau de la paroi bactérienne en inhibant la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane entraînant une lyse bactérienne. (Yala et coll., 2001).

La fosfomycine inhibe pour sa part la synthèse de la paroi bactérienne ; elle bloque la formation d'acide N-acétylmuraminique, constituant important du peptidoglycane pariétal (Anonyme, 1997).

En ce qui concerne les levures, leur sensibilité aux antifongiques est généralement due à l'affinité antifongique pour l'ergostérol ; principal constituant de la membrane fongique, et donc, à la formation des complexes insolubles responsables d'une altération de la perméabilité cellulaire. L'inhibition de la synthèse protéique par incorporation à l'ARN, et inhibition de la synthèse d'ADN, est un autre mécanisme de sensibilité des levures (Boiron, 1996). D'autres antifongiques, bloquent le déroulement des mitoses en métaphase, interférant avec la synthèse des acides nucléiques et inhibant la fonction des microtubules.

Ces perturbations cellulaires aboutissent à l'altération de la paroi du filament fongique (Epstein et coll., 1972). Tout cela pourra vraisemblablement expliquer la sensibilité de *Candida albicans*.

L'antibiogramme par disques est une méthode simple qui donne de bons résultats mais il est difficile d'utiliser cette méthode avec des quantités importantes d'échantillon, car le disque est petit et le papier filtre utilisé ne permet pas d'imprégner une grande quantité au risque de déborder l'échantillon à étudier (la quantité maximale est de 25 $\mu$ l).

Le test de diffusion en milieu solide n'est qu'un criblage des activités antimicrobiennes des extraits végétaux, il nous permet de sélectionner pour chaque souche l'extraits qui présente le plus une activité parmi l'ensemble des extraits naturels.

C'est aussi un test préliminaire pour un autre essai microbiologique complémentaire, qui est la dilution en milieu liquide pour déterminer la CMI.

### 2-3-Dilution en milieu liquide

Pour déterminer la concentration minimale inhibitrice, on a utilisé la méthode de dilution en milieu liquide. Les résultats sont mentionnés dans les tableaux 8 et 9.

**Tableau n°8: Résultats de la méthode de dilution en milieu liquide pour la phase acétate.**

souches	concentration en extraits sec mg/ml				témoin
	phase acétate				
	76mg /ml	38mg/ml	19mg/ml	9,5mg/ml	
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescense</i>	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus albus</i>	-	-	-	+	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	+
<i>Penicillium sp</i>	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus sp</i>	+	+	+	+	+

**Tableau n°9 : Résultats de la méthode de dilution en milieu liquide pour la phase butanol.**

souches	concentration en extraits sec mg/ml				témoin
	phase butanol				
	56mg/ml	28mg/ml	14mg/ml	7mg/ml	
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	+	+
<i>Serratia marcescense</i>	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	+
<i>Staphylococcus albus</i>	-	-	-	-	+
<i>Candida albicans</i>	-	-	+	+	+
<i>Penicillium sp</i>	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus sp</i>	+	+	+	+	+

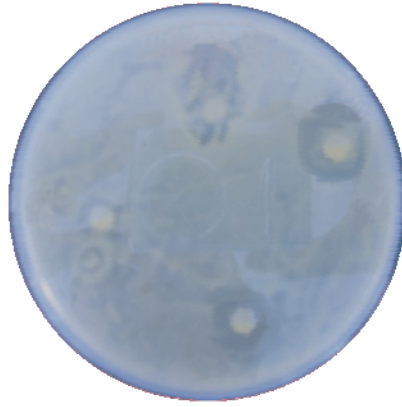
+ : trouble (croissance) ; - : absence de croissance (inhibition).

Pour *Staphylococcus*, la concentration minimale inhibitrice de la phase acétate est de 19 mg/ml. Pour la phase butanol la CMI pour les deux souches de *Staphylococcus* est de 7 mg/ml. La CMI de *Candida albicans* est de 28 mg/ml pour les deux extraits.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les substances naturelles de *Silybum marianum* sont de bons agents antimicrobiens, on peut en déduire donc, que les extraits de cette plante agissent comme des antibiotiques.



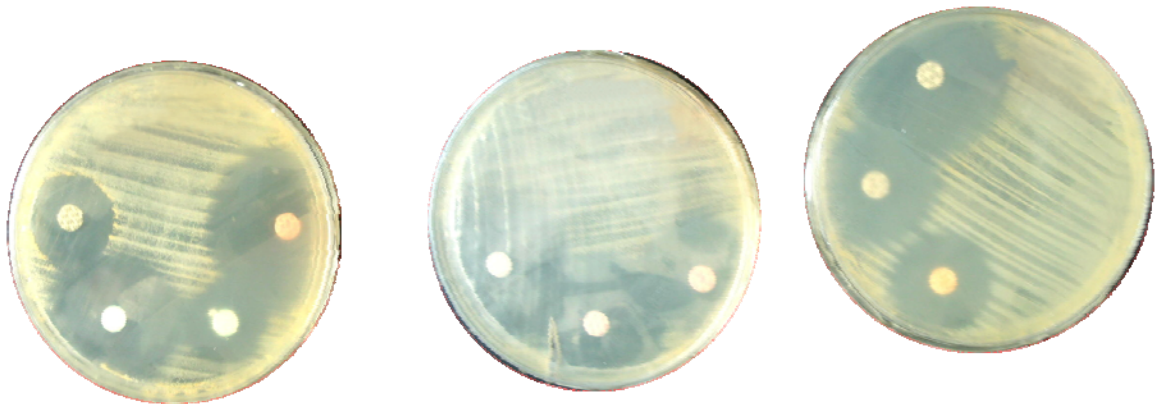
**Figure n°07** *Candida albicans*



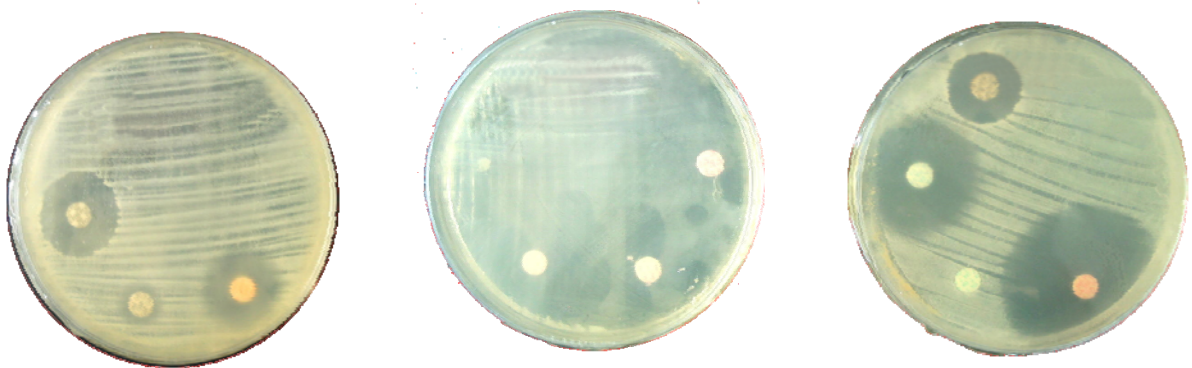
**Figure n°08 :** *Staphylococcus aureus*



**Figure n°09** *Staphylococcus albus.*



**Figure n°10** : antibiogrammes de *Staphylococcus aureus*.



**Figure n°11** : antibiogrammes de *Staphylococcus albus*.



**Tableau n°7 : Valeurs critiques des zones d'inhibition pour Staphylocoques**  
**(Anonyme, 2007 ; Anonyme, 2007 ; Anonyme, 2005)**

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètres critiques en mm		
		R	I	S
Acide fusidique	10µg	≤ 29	-	≥ 30
Amikacine	30µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Erhytromycine	15µg	≤ 17	18-21	≥ 22
Fosfomycine	50µg	<14	-	≥ 14
Gentamycine	10µg	≤ 19	-	≥ 20
Lincomycine	15µg	≤ 17	18-20	≥ 21
Minocycline	30µg	≤ 27	-	≥ 28
Ofloxacine	5µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Oxacilline	01µg	≤ 14	-	≥ 15
Penicilline	10µg	≤ 28	-	≥ 29
Riphampicine	30µg	≤ 14	15-28	≥ 29
Spiramycine	100µg	≤ 19	20-23	≥ 24
Vancomycine	30µg	≤ 15	16	≥ 17

R : résistant ; I : intermédiaire ; S : sensible.

## Conclusions et perspectives

Au cours de ce mémoire, nous avons étudié *Silybum marianum*, une plante très utilisée en pharmacopée traditionnelle pour ses vertus thérapeutiques.

Malgré son importance biologique et médicinale, cette espèce a été très peu étudiée en Algérie. C'est pourquoi notre étude est destinée à étudier les métabolites secondaires et plus précisément les flavonoïdes de *Silybum marianum* afin de prouver l'intérêt biologique de cette plante et évaluer l'importance de la flore sauvage de notre pays.

L'étude phytochimique préliminaire basée sur des tests spécifiques a permis de caractériser les polyphénols et les flavones. La détermination de rendement massique en flavonoïdes a montré une rentabilité de 2,52 % ce qui est en accord avec ce qui est décrit dans la littérature.

Qualitativement, la chromatographie sur couche mince sur gel de silice a montré sous UV la présence de flavones pouvant être assimilés à la silymarine (principe actif majeur de *Silybum marianum*).

Enfin les tests de l'activité antimicrobienne des substances végétales de l'extrait d'acétate et de butanol sur des microorganismes pathogènes sont très promoteurs, vu que cette plante a révélé une activité sur deux souches de Staphylocoque et sur la levure *Candida*.

En perspective, il serait donc intéressant de mener une étude plus approfondie sur *Silybum marianum* afin d'isoler, de purifier et d'identifier les principes actifs de cette plante en utilisant des méthodes plus précises telles que l'HPLC et la RMN. En ce qui concerne l'activité antimicrobienne il serait intéressant de définir le mécanisme d'action de cette substance végétale sur les microorganismes.

L'étude de l'activité antioxydante serait un atout car *Silybum marianum* est connue pour son pouvoir antioxydant, cette propriété est recherchée dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique.

Cependant en sachant que les antioxydants contribuent de manière significative à la prévention des maladies telles que le cancer et les maladies cardiaques, le développement de nouveaux médicaments à base d'antioxydants d'origine naturelle doit être à l'ordre du jour.

La réalisation d'une étude toxicologique serait une étape substantielle afin de pouvoir cerner tout effet indésirable et de mieux comprendre les sites d'action des substances actives.

Sachant que l'Afrique en général et l'Algérie en particulier possèdent une immense biodiversité qui ne demande qu'à être étudiée, les sujets dans ce domaine ne manquent donc pas, car chaque plante est un réservoir potentiel de métabolites avec des caractéristiques phytochimiques et pharmacologiques particulières.

## Résumé

Dans le but de rechercher de nouveaux composés naturels à activité antimicrobienne, *Silybum marianum* une plante endémique de la région méditerranéenne est soumise à un criblage phytochimique et biologique.

Dans cette étude, les principes actifs de *Silybum marianum* sont extraits par la méthode de solvants successifs: l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le butanol. L'étude phytochimique préliminaire basée sur des tests spécifiques a permis de caractériser des polyphénols et des flavones. La détermination de rendement en flavonoïdes a montré une rentabilité massique de 2,52 %, la CCM a montré la présence d'un complexe de flavones pouvant être assimilé à la silymarine. Ces extraits sont testés *in vitro* par la diffusion sur gélose et par la dilution en milieu liquide sur plusieurs espèces microbiennes (Entérobactéries, Staphylocoques, moisissures et levures). Les résultats obtenus montrent que les extraits du *Silybum marianum* possèdent un effet inhibiteur sur les souches appartenant au Gram (+) (genre *Staphylococcus*) et sur la levure *Candida albicans*. Pour *Staphylococcus*, la concentration minimale inhibitrice pour la phase acétate est de 19 mg/ml et de 7 mg/ml pour la phase butanol. La CMI de *Candida albicans* est de 28 mg/ml pour les deux extraits. *Silybum marianum* n'a aucun effet inhibiteur sur les moisissures et les bactéries Gram (-).

D'après les résultats de cette étude, nous pouvons suggérer l'utilisation des extraits acétate d'éthyle et butanol de *Silybum marianum* dans le traitement de certaines maladies infectieuses.

**Mots clés :** *Silybum marianum*, activité antimicrobienne, silymarine.

## Summary

In order to research new antimicrobial natural compounds, extracts of ethyl acetate and butanol from *Silybum marianum*, an endemic plant to the Mediterranean region, were subjected to phytochemical and biological screening.

In this study, the active ingredients of *Silybum marianum* are extracted by the successive solvents method: petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and butanol. The phytochemical preliminary study is based on specific tests that permit the polyphenols and flavones characterization. The determination of flavonoids performance showed a 2.52 % yield thus the TLC showed the presence of flavones complex could be corresponding to silymarin. These extracts are tested *in vitro*: agar diffusion and liquid dilution methods on several microbial species (Enterobacteria, Staphylococci, molds and yeasts). The results showed an inhibitory effect of the *Silybum marianum* extracts against Gram (+) strains (Staphylococcus genus) and the yeast *Candida albicans*.

Ethyl acetate extract inhibited the growth of the strain Gram (+) bacteria with a MIC of 19 mg/ml then butanol extract showed an inhibitory activity against Gram (+) bacteria with a MIC of 7 mg/ ml. The MIC value of yeast was 28 mg / ml for the both extracts. *Silybum marianum* showed any antimicrobial activity against fungi and Gram (-) bacteria.

The results of this study suggested that the extracts of *Silybum marianum* could be used in the treatment of some infectious diseases.

**Keywords:** *Silybum marianum*, antimicrobial activity, silymarine.

## ملخص

في هذه الدراسة، تعرضت نبتة *Silybum marianum* المنتشرة في البحر الأبيض المتوسط، لتحليل فيثوكيميائي و بيولوجي وذلك من أجل إيجاد مركبات طبيعية جديدة ذات نشاط مضاد ميكروبي.

يتم استخلاص المكونات النشطة لهذه النبتة باستعمال : Ether de pétrole ، Chloroforme ، Acétate d'éthyle. الدراسة الفيتوكيميائية تعتمد على اختبارات مميزة ، أدت إلى تمييز Polyphenol و Flavone ، مرد ودية استخلاص Polyphenol كانت بنسبة 2,52% ، أما كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أظهرت وجود Flavone مشتبه فيه أن يكون Silymarine.

كل من مستخلص Acétate d'éthyle و Butanol قد درسا - *in vitro* - على عدة جراثيم (Entérobactéries، Staphylocoques، الخمائر و الفطريات)، أظهرت النتائج أن مستخلص *Silybum marianum* له أثر مضاد على سلالات تنتمي إلى غرام (+) و الخميرة *Candida albicans*. مستخلص Acétate d'éthyle أظهر نشاط ضد غرام (+) فكانت CMI 19 ملغ/ مم ، أما مع مستخلص Butanol قدرت CMI ب 7 ملغ/ مم و ذلك ضد نفس السلالة. CMI خميرة *Candida albicans* قدرت ب 28 ملغ/ مم لكلا المستخلصين.

*Silybum marianum* لم تظهر أي نشاط ميكروبي ضد الفطريات و البكتيريا غرام (-).

نتائج هذه الدراسة، تسمح لنا اقتراح ن مستخلصي actétate d'éthyle et butanol نبتة *Silybum marianum* يمكن أن تستخدم في علاج بعض الأمراض المعدية.

**كلمات المفتاح :** *Silybum marianum*، Silymarine، نشاط مضاد ميكروبي.

## Annexes

### Annexe 01 :

#### Milieu Mueller- Hinton :

Infusion de viande de bœuf déshydratée	300g
hydrolysate de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Agar-agar	13g
Eau distillée	1000ml
PH final	7.2-7.4

### Annexe 02 :

#### Milieu sabouraud :

Peptone	10g
Glucose	20g
Agar-agar	15g
Eau distillée	1000ml
PH final	6.3

### Annexe 03

#### Bouillon nutritif :

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Eau distillée	1000ml
PH final	7.2

## **Annexe 04 :**

### **YPG : yeast –peptone- glucose :**

Extrait de levure	5g
Peptone	10g
Glucose	1à20g
Eau distillée	1000ml
PH final	6

## **Annexe 05 :**

### **Étalon Mc farland :**

- En versant 0.5ml de solution de BaCl<sub>2</sub> déshydraté à 1% (10g/l), dans une éprouvette de 100ml, compléter à 100ml avec du h<sub>2</sub>so<sub>4</sub> à 1%(10ml/l).ainsi préparé il doit avoir une DO de 0.08 à 0.1 lu à 625 nm.
- Aliquoter la solution en volumes de 10 ml, dans des tubes identiques à ceux qui serviront à la préparation des inoculums.
- Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (parafilm, ruban adhésif,..).
- repérer le niveau du liquide à l'aide d'un marqueur, et le contrôler régulièrement en prenant la densité optique.
- Conserver les tubes à la température ambiante et à l'abri de la lumière (papier aluminium).
- Homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé : inoculum et étalon doivent avoir la même turbidité lorsqu'ils sont examinés sur un fond rayé.



## Annexe 06 :

### Préparation des différentes concentrations des extraits :

- L'extrait acétate d'éthyle :

Les concentrations : 76-38-19 et 9,5 mg/ml sont obtenu comme suit :

Le ballon vide 286.22g  $\Longrightarrow$  ballon + phase acétate 286.60 g  $\Longrightarrow$  phase acétate 0.38 g (380 mg).

- Nous avons dilué dans 5 ml de méthanol :

380 mg  $\longrightarrow$  5 ml de méthanol  
X mg  $\longrightarrow$  1 ml  $\Longrightarrow$  la concentration d'acétate dans 1ml est 76mg.

Puis nous avons fait des dilutions à base de deux et nous avons obtenu : 76mg/ml, 38mg/ml, 19 mg/ml, 9.5 mg/ml.

- L'extrait butanol :

Les concentrations 56-28-14 et 7 mg /ml sont obtenu comme suit :

Le ballon vide 286.22 g  $\Longrightarrow$  ballon + phase butanol 286.50 g  $\Longrightarrow$  phase butanol 0.28g (280 mg).

- Nous avons dilué dans 5 ml de méthanol :

280 mg  $\longrightarrow$  5 ml de méthanol  
X mg  $\longrightarrow$  1 ml  $\Longrightarrow$  la concentration du butanol dans 1 ml est 56 mg.

Puis nous avons fait des dilutions à base de deux et nous avons obtenu : 56mg/ml, 28mg/ml, 14 mg/ml, 7 mg/ml.

## Références bibliographiques

- **Adrian J., Potus J., frangne R., 1995:** La science alimentaire de A à Z 2<sup>ème</sup> Edition ; (38,164-166).
- **Alais C et Linden G., 1997:** Abrégé de biochimie alimentaire. 4<sup>ème</sup> Edition Masson ; Paris, (119-123).
- **Allain H, Schuck S.,1999May-Jun:** Aminotransferase levels and silymarin in the novo tacrine-treated patients with Alzheimer's disease. Dement Geriatr Cogn Disord,; 10(3):181-5.
- **Anonyme, 1984 :** Document technique n°1 station nationale d'essais de semences.Liste alphabétique des principales espèces de plantes cultivées et des mauvaises herbes.Noms Latins et noms communs français.2<sup>ème</sup> Ed, Ed Geus.
- **Anonyme, 1987 :** Fitoterapia, 1987, 58, 1,51-53.
- **Anonyme, 1995:** Commmity for veterenary medicinal product *silybum marianum*.
- **Anonyme, 1997 :** Drugs ; 53.637-656.
- **Anonyme, 2005 :** Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle national selon les recommandations de l'OMS ,4<sup>ème</sup> ed, 2005.
- **Anonyme, 2007:** BSAC version 6, Janvier 2007(British Society of Antimicrobial Chemoterapy).
- **Anonyme, 2007 :** SFM (Société Française de Microbiologie) comité de l'antibiogramme recommandation 2007.
- **Anonyme 2006-2007 :** [www.pasteur.fr](http://www.pasteur.fr) (maladies infectieuses).
- **Babayi H, Kolo I, Okogum JI.2004:** The antimicrobial activities of methanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* ans *Terminalia catappa* against some pathogen microorganisms.Biochemisten:16(2):102-105.
- **Baharum, 1997 :** Substances naturelles actives ; la flore mauricienne une source d'approvisionnement potentielle, AMAS, food and agricultural research council.
- **Bassene E ., 2001:** Cours de phytochimie.AEA chimie et biochimie des produits naturels, UCAD ; DAKAR ;.
- **Batawita K, Kokou K, Akpagona K, Koumaglo K, Bouchet P., 2002 :** Activité antifongique d'une espèce en voie de disparition de la flore togolaise : *Conyza aegyptiaca*

- (L.) Ait.var.lineariloba (DC) O.Hoffm. (Asteraceae). *acta bonica gallica* ISSN1253-8078, vol146, n 01, pp41-48(16ref).
- **Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. , 1966 Apr:** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.*; **45**(4):493–496.
  - **Bellakhdar J, 1997 :** La pharmacopée marocaine traditionnelle Ed, ISBN.IBIS Press, p202.
  - **Beloued A, 1998 :** Plantes médicinales d’Algérie, Ed office des publications universitaires INA EL HARACH, p68.
  - **Beniston NT,Beniston WS.1984 :** Fleures d’Algérie .Ed Entreprise Nationale de livre, Alger p274. N° ed. 1822/84.
  - **Bhatia N, Agarwal R., 2001 Feb:** Detrimental effect of cancer preventive phytochemicals silymarin, Prostate. *46*(2):98-107.
  - **Blache D. :** Rôle bénéfique des polyphénols et du resveratrole du vin. *Equation-Nutrition* n 16 ; **Juillet 2001**([www.aprifel.com](http://www.aprifel.com)).
  - **Boiron P., 1996:** Organisation et biologie des champignons. Nathan, 126 p.
  - **Bourzeix, M., Weiland, D., and Heredia, N ., 1986:** A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bulletin de l'O.I.V* **669-670**, 1173-254.
  - **Boussaboua H., Janvier 2002:** Elements de microbiologie générale, p (160,161,) Ed de l’université Mentouri Constantine.
  - **Bruneton J., 1987:** Eléments de phytochimie et de pharmacognosie. Techniques et documentation Lavoisier ; (156-183).
  - **Carames C, 1990:** Milk-thistle: *Am.J Health –system Pharm*; 56p, 1195-1197.
  - **Carducci R., 1996 May:** Silibinin and acute poisoning with *Amanita phalloïdes*, *Minerva Anestesiol*; *62*(5):187-93.
  - **CE : commission euraupéenne, Juin 2001 :** proposition de la commission en matière de lutte contre la resistance microbienne. BRUXELLE.
  - **Chatterjee A.2004:** Inhibition of *Helicobacter pylori*; in vitro by various berry axtracts with enhanced susceptibility of calarithromycine. *Mol. Cell.Biochem* ; *265*(1-2) :19-26.
  - **Deysson G, 1979:** Organisation et classification des plantes vasculaires 2ème partie. systematique, cour de botanique générale, 4ème séries Ed CUDSEDES 540p.

- **Diallo Mamadou Aliou , 2003:** contribution a l'étude de la composition en polyphenols de *Tephrosia pedicellata.bak*, mémoire de DEA de chimie et biochimie des produits naturels.
- **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.
- **Djabou Nassim, 2006:** *Sambucus Nigra L.*, une plante de la pharmacopée traditionnelle Nord africaine, mémoire de magister en chimie organique appliquée, Tlemcen.
- **Dodd J, 1989:** Phenology and seed production of varbегatee thistle in Ausralia in relation to mechanical and biological control weed researcher 29, pp255-263.
- **Epstein et al, 1972 :** Griseofulvin levels in *Stratum corneum*. Arch Dermatol, 1972, 106 : 344-348.
- **Euzéby, 2005 :** J.O n° 104 page 7859 abrégé de bactériologie générale et médicale.
- **Farombi, 2003:** Africain indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agent, African journal of biotechnology; 2(12), 662-671.
- **Florkin M, Mason HS, 1962:** Comparative biochemistry, a comprehensive treatise. Vol III: constituents of life –part A. Academic press, New York AND London; (755-805).
- **Foster S, 1995:** Milk thistle: herbal seeds and medicinal needs. Better nutrition for today's living p 64-710.
- **Gabay R, Plitmann U et Danin A., 1994 ;** Facteurs affectant le dominane du marianum L de silybum dans ses habitats spécifiques Flore189 pp 201-206.
- **Gaussen H, Leroy HF, 1982 :** Précis de botanique (végétaux supérieurs) 2ème ED .426.
- **Geissman, 1962:** The chemistry of flavonoid compounds. Pergamon Press; Oxford, London, New York, Paris; (8, 9, 70, 73, 409, 548,549).
- **Gibaudlt T., Avril, 2001:** Flavonoïdes et cœur .Equation-Nutrition n14 (APRIFEL) ;.
- **Guillaume Viviane, 2000 :**  
<http://seconde.euro-bioweb.com/microbiologie/microbiologiecours/antimicrobiens.html>
- **Guinard JL ., 1979:** Abregé de biochimie végétale 2 ème Ed ; Masson, Paris, (1, 2,193-197,237).
- **Guinard JI., 1994:** Abrégé botanique, 9ème ed, p (204).
- **Guinard JL., 1998:** Botanique 11ème Ed révisée .Masson, Paris, (49-152,272).
- **Guinard JL., 2000:** Biochimie végétale, Dunod. (63, 96, 157,171-176,213).
- **Guiraud J P., 1998 :** Microbiologie alimentaire, édition Dunod, , p71-75.

- **Guittonneau et Huon A, 1983** : Connaître et reconnaître la flore et la végétation méditerranéenne. Ed. Ouest France, p331.
- **Gnanou D, Nitriema JB, Sourabié S, Traoré Ik, Guisson IP, Kondogbo B, 2003** : Etude in vitro de l'activité antifongique d'extraits des inflorescences mâles de *Bourassus aethiopum* Arecaceae. Revue sciences et techniques sciences de la santé Vol 26, n°1.
- **Grisbach H, 1982**: biosynthesis of anthocyanidines, in Markakis P, ed. anthocyanidines as food colours. New York, USA : Academic Press, p69-92.
- **Groves, R and Kaye PE, 1989**. Germination et phenology of seven introduced thistle species in southern austrialia aust, J, Bot.37pp351-357.
- **Grupta OP, Sing S, Bani S., 2000**: Anti –inflammatory and anti-arthritic activities of silymarin action through inhibition of 5-lipoxygenase phytomedecine; 7(1):21-4.
- **Harbone JB, Swain T, 1969**: Prespectives in phytochimistry, Academic Press, London, New York.
- **Harbone JB., 1973**: Phytochemical methods. Chapman and Hall; London; (5-9, 12, 13, 52-79).
- **Harbone JB, Mabry T J, Mabry H., 1975**: The flavonoids. Chapman and Hall ; London ; (2-4, 46, 129, 868,878).
- **Halbach G et Gorler K., 1971** : Separation of flavone in *silybum marianum* fruits, planta med ; 19 :293-298.
- **Hartek K, DAB9** : kommentar Wissensechaftlick Verlags-gesellschaft mbH, Stuttgart, 187, pp2226-2227.
- **Hauf M, 1982** : Les adventices d'Europe, leurs plantules, leurs semences, ed BASF.90p.
- **Heller W and Forkmann G, 1993**: Biosynthesis of flavonoids, in the flavonoids advences in research since 1986, Chapman et Hall, London (Harborne, JB, Ed), pp399-425.
- **Ikan R**: Natural products. A laboratory guide. Academic Press; London, New York and San Fransisco; 1969(17, 19).
- **Jiang C, Angarwal R, Lu J.,2000**: Anti-angiogenic potential of cancer chemopreventive flavonoid antioxyant, silymarine, biochem biophys Res commun sep16; 276(1):371-8.
- **Kalt, 2000**: Agriculture et Agroalimentaire Canada, Centre de recherches de l'Atlantique sur les aliments de l'horticulture, Kentville, N.É. B4N 1J5
- **Karé M Juin 2001**: étude de la composition en polyphénols de *tephrpsia platycarpa* ; mémoire de DEA chimie organique ; UCAD-DAKAR ;

- **Kneki P, Jarvinen R, Seppanen R, Heliovaara M, Teppo I, Pukkala E, Aromaa A., 1997:** Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms .Am .J. epidemiol ,146(3) ,223-230.
- **Lahouel M, 2005 :** interactions des flavonoides-mitochondrie et rôle de la propolis dans la prévention de l'apoptose induite par certains médicaments anticancéreux (thèse de doctorat) Univ Constantine.
- **Latte Lp,Kolodziej H, 2000 :** Antifungal affects of hydrolysables tannins and relates compounds on dermatophytes,mould fungi and yeasts. Naturforsch 55 (5-6) :467-72.
- **Lee et al, 2003:** Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxydant capacity than teas and red wine, J Agric Food chem 51, 7292-7295.
- **Lee DG, 2003:** Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from Silybum marianum. Arch Pharm Res. 2003 Aug; 26(8):597-600.
- **Lee et al, 2006:** Analysis and comparison of active constituents in commercial stanrdardized silymarin extract by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry.journal of chromatography B, XXX (2006) XXX XXX.
- **Leito DP, Polizello Ac, Ito IY, Spadaro Ac, 2005:** Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cramberry juice. j led food : 8 (1) :36-40.
- **Levisalles J et Jozefowicz M., 1974:** Chimie organique .Tome 3 : Composés organiques complexes .Flammarion sciences ; France, (155).
- **Li et coll., 1999:** phytochemistry, 50,139-142.
- **Luckner M., 1972:** Secondary metabolites in plant and animals, Chapman and Hall, London, , (70, 154,357-363).
- **Luper S, 1998:** A review of plants used in the treatment of liver disease: Part 1. alteranative medecine review volume ; 3(6) :p410-21.
- **Mamatha B, 2005:** Screening of medecinals plants used in Rural Indian Folk medecine for treatment of diarrhea (en ligne)  
[http://www.pharmainfo.net/exclusive/reviews/sceerning\\_of\\_medecinal\\_plants\\_used\\_in\\_rural\\_indian\\_folk\\_medecine\\_for\\_treatment\\_of\\_diarrhea](http://www.pharmainfo.net/exclusive/reviews/sceerning_of_medecinal_plants_used_in_rural_indian_folk_medecine_for_treatment_of_diarrhea).
- **Manyani H, Carolina, Maria-Eugenia Soria Diaz, Gil Serrano A and Magias M 2001:** Regulation of nod factor sulphation genes in rhizobium tropici CIA T829. Rev. Can. Microbiol.47 (6) :574-579
- **Marfak A, 2003 :** Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène conmaronne en ligne : [http:// unilim.fr/thse /2003/sante/2003limo0300e/marfak.pdf](http://unilim.fr/thse/2003/sante/2003limo0300e/marfak.pdf).

- **Marfak A, 2003** : Radiolyse gama des flavonoïdes .Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools (en ligne) :  
<http://www.unilim.fr/thse/2003/sante/2003limo0300e/notice.htm>.
- **Markham K R., 1982**: Techniques of flavonoids identification .Academic Press; New York,.
- **Matinez Vicent, 2007**: El mundo de las plantas; www.botanical-onlne.com
- **Mesegue M, 1975** : Mon hercier de santé, les plantes qui guérissent. Ed Robert Laffont, Paris, 334p.
- **Meyer et Buchtela, 1999** : Tee-Rezepturen-Ein. Hundbuch for Apotheker und frzte. Stuttgart : Deutscher Apotheker Verlag.
- **Min Ha Kim, Jin Hee Park, Hyosing Won, and Choug Wook Park., 2000**: Flavonoid chemistry and chromosome numbers of fallopia section pleuropterus (polygonaceae) Rev Can Bot 78(9):1136-1143
- **Mirabaud M, 1996** : Entérobactéries à betalactamase à spectre élargi, thèse Genève.
- **Modak B., 2001** : Actividad antibacteriana des flavonoides aislados des exudado resinosa des *Heliotropium sinnuatum*. efecto del tipo des estructura. bol soc quin : 47(1) :366-421.
- **Mohammedi, 2006** : Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentiels et flavonoides de quelques plantes de la région de Tlemcen.Thèse de magister en biologie, Tlemcen.
- **Moll Manfred et Moll Nicole., 1998**: Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques Dunod ; Paris ; (25-26,55-56).
- **Moore and Dalrymple., 1976**: Experimental methods in organic products chemistry. Second Edition. Saunders Golden Sunburst Series, Philadelphia, London, Toronto, (58-60).
- **Morazzoni P Montalbetti A, Malandrine S, Piffori G., 1993**: Comparative pharmacokinetics of silipide and silymarine in rats. EUR J drug metab pharmacokinet 18 p289-97.
- **Morazzoni P and Bombardelli E, 1995** : Silybum marianum .Fitoterapia, 66(1) : p3-49.
- **Nakanishi K, Goto T, Ito S, Natori S, Nozoe S., 1975**: Natural products chemistry vol 1 et 2 Kodansha scientific Ltd ; (12, 18,218-239).
- **Navin Kumar Ambasht and Madhoolika Agrawal., 1998**: Physiological and biochemical responses of Sorghum vulgare plants to supplemental ultra violet b radiations. Rev. Can. Bot. 72(7) :1280-1294.

- **Neil S and Gould K S., 1999:** Optical properties of leaves in relation to anthocyanin concentration and distribution. *Rev Can Bot* 77(12) :1777-1782.
- **Nikiema Wendpagnagdé Patricia Rachel, 2005:** propriétés pharmaco- chimiques de *Calotropis procera* Ait (Asclepiadaceae) récoltés au mali ; étude préclinique des effets anti-inflammatoires et antimicrobiens des extraits des écorces de racines.
- **Nugon-Baudon L., 1994:** Toxic- Bouffe. Enquête sur les aliments d'aujourd'hui. Marabout, ed Jean -Claude Latté ; (76,227).
- **Okigbo RN, Mabajinka Cs, Niku Co, 2005:** Antimicrobial potentials of UDA *Xylopi aethopica* and *Occinum gratissimum* L. Some pathogenous of man international journal of molecular medecine and advances sciences 1(4):392-397.
- **Orturno, 2005:** *Citrus paradis* and *Citrus sinensis* flavonoids : Their influence in the defence mechanism against *Penicilium digitatum*. Food chemiistry.
- **Paris M, Hurabielle M., 1981:** Abrégé de matière médicale Tome I. Masson, (82-101, 104, 105,153).
- **Paris R R et Moyse H., 1971:** Matière médicale Tome III Masson et Cie, Paris ; p397.
- **Pathak et al:** flavonoids as medicinal agents-recent advances. *Fitoterapia* 1991,62(5) ,371-389.
- **Paulian P ,1967 :** Guide pour l'étude de quelques plantes tropicales .Ed Gauthier Villard Paris.
- **Pavia DL, Lampman Gm, Kriz-JR GS., 1982:** Introduction to organic laboratory techniques. A contemporary approach, second edition CBS college publishing; (417-419).
- **Pepping J, 1999:** Milk thistle: *Am. J Health –system. Pharm*, 56:p1195-1197.
- **Pereira S et al 2006 :** antimicrobial activity of *indigofera suffruticosa*.
- **Peris, JB ; Stübing, G ; Figuerola, R., 1996 :** Guide des Plantes Médicinales de la Communauté de Valence. Valence : Les Provinces, p 127.
- **Peser M, Poitier P., 1954:** Methodes et réactions de l'analyse organique. Vol III : Réactions colorées et fluorescences. Masson et Cie ; (36).
- **Pichersky E, Gang R, 2000 :** TIRS ,VOL.5,439-445.
- **Prescott M, Harley P, Klein A., 2003 :** Microbiologie 2 éme edition française, traduction de la 5éme édition américaine par Claire Michelle Bacq Calberg et Jean Dusart (Univ de Liège) p (139-142-144-118-119).
- **Punyasiri PA et al., 2005:** Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *exobasidium vaxans* infections. *J Chem Agri* : 31(6)1315-24.



- **Quenzel P et Santa S ,1963** : Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionale Tome 2 Ed CNRS p1011.
- **Rakipov N., 1987**: Biochimie des cultures tropicales. traduction française : Ed Mir Moscou (95,98-99,154-159,319-321).
- **Ritcher G., 1993**: Metabolisme des végétaux physiologie et biochimie. Press Polytechnique et Universitaire Romandes ; (317-339).
- **Reinert P., 2000**: l'antibiogramme extrait de SOS mucoviscidose n °52,1ér trim,.
- **Roch C, 1991**: Milk thistle Pacific Northwest extension publication Washington State University, Oregon State University p382.
- **Roulier G 2002**: en ligne: la methode naturelle anti age ( [www.naturemania.com](http://www.naturemania.com))
- **Saller R ,1995** : Phytothérapie, Hang Heidelberg, pp267-274.
- **Seokwon Kime et al, 2006**: antibacterial and antifungal activity of sulfur-containig compounds from *Petiveria alliacea* l.
- **Shin Ming Kao and Penny S, Leavitt., 1999**: Genistein increases metallothionein in human intestinal cells, caco-2. Biochem, Biol Cell 77(2) :72-88.
- **Shiv Shankhar Kaundum, Lebereton P, and Bailly A., 1998**: Needle flavonoid variation in coastal Douglas Fir population .Rev Can Bot 76(12):2076-2083.
- **Sindel, BM, 1991**: a review of the ecology and control of thistles in australis .weed research vol31, p189-201.
- **Sivakumaran S,Molan AL,Meagher LP,Kolb B,2004** : Variation in antimicrobial action of pranthocyanmidine from *Dorycrium rectum* against rumen bacteria .Phys Chem :5(3) :106-111.
- **Spichiger, Re., Savolainen V et Figeat M., 2000** : botanique systématique des plantes à fleurs.Une approche phylogénétique nouvelle des angiospermes des régions tempérées et tropicales, 1ére Ed.Ed presses polytechnique et universitaires romande 372p.
- **Stevens JF Miranda C L and Buhler DR Deinzer ML., 1998**: chemistry and biology of hop flavonoids, , 1204p.
- **Szila S, Szentgui D, Demeter J.,1988**: Protective effect of legalon in workers exposed to organic solvents: Acta Med Hung,; 45(2), 249-56.
- **Teixeira de Silva, 2004**: Mining the essential oil of the Anthemideae, African journal of biotechnology 3(12), 706-720.
- **Toshitsugu Tagurie et al, 2004**: antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. Biol Pharm Bull.27 (12)1965-1969(2004).

- **Ulanowska K, 2006:** Differentiel antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of ADN, ARN and protein synthesis in some bacterial strains, Arch Microbiol.184(5) :271-8.
- **Venkataramanan R., 2000:** Milk thistles, an herbal supplement, decrease the activity of CY3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transferase in human hepatocyte culture. Drug metabolism and disposition ; 28(11) :1270-1273.
- **Viera et al 2001:** microbiocidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* LINN, and *Carica Papaya* LINN) upon bacteria isolates from fish muscle and known to induce diarrhea in children.
- **Volak et Stodola ,1984 :** Plantes medicinales, illustration de Frantiskek Severa, ed ARITA Grund, Paris, p319.
- **Wagner H, S Bladt 1996 :** Plant drug analysis 2<sup>nd</sup> Ed, springer, Berlin, pp234-235.
- **Wawiziniak JJ ,1999-2000 :** L'essentiel de chimie organique (en ligne) <http://membre.lycos.fr//jjww/>
- **Weidenborner M, JHA HC :** Les flavonoïdes pour protéger les silos de céréales contre les champignons toxiques. [www.cbb-developpement.com](http://www.cbb-developpement.com).
- **Yala D, A.S. Merad D. Mohamedi, M.N. Ouar Korich, 2001 :** Médecine du Maghreb n°91.
- **Yrjonen T 2004:** Extraction and planar choromatographic séparation techniques in the analysis of natural products. conferance room 513 at Viikki info center. Faculty of pharmacy of the University Helsinki p64.

---

**TITRE** : Extraction de la silymarine et étude de son activité antimicrobienne

---

**Résumé**

Dans le but de rechercher de nouveaux composés naturels à activité antimicrobienne, *Silybum marianum* une plante endémique de la région méditerranéenne est soumise à un criblage phytochimique et biologique.

Dans cette étude, les principes actifs de *Silybum marianum* sont extraits par la méthode de solvants successifs: l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le butanol. L'étude phytochimique préliminaire basée sur des tests spécifiques a permis de caractériser des polyphénols et des flavones. La détermination de rendement en flavonoïdes a montré une rentabilité massique de 2,52 %, la CCM a montré la présence d'un complexe de flavones pouvant être assimilé à la silymarine. Ces extraits sont testés *in vitro* par la diffusion sur gélose et par la dilution en milieu liquide sur plusieurs espèces microbiennes (Entérobactéries, Staphylocoques, moisissures et levures). Les résultats obtenus montrent que les extraits du *Silybum marianum* possèdent un effet inhibiteur sur les souches appartenant au Gram (+) (genre *Staphylococcus*) et sur la levure *Candida albicans*. Pour *Staphylococcus*, la concentration minimale inhibitrice pour la phase acétate est de 19 mg/ml et de 7 mg/ml pour la phase butanol. La CMI de *Candida albicans* est de 28 mg/ml pour les deux extraits. *Silybum marianum* n'a aucun effet inhibiteur sur les moisissures et les bactéries Gram (-).

D'après les résultats de cette étude, nous pouvons suggérer l'utilisation des extraits acétate d'éthyle et butanol de *Silybum marianum* dans le traitement de certaines maladies infectieuses.

---

**Mots clés** : *Silybum marianum*, activité antimicrobienne, silymarine.

---

**Laboratoire de recherche** : Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri, Constantine.