

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mohamed Khider – Biskra
Faculté des Sciences et de la technologie
Département : Chimie Industrielle



جامعة محمد خيضر بسكرة
كلية العلوم و التكنولوجيا
قسم : الكيمياء الصناعية

Mémoire présentée en vue de l'obtention
Du diplôme de Master en : **Génie des Procédés**
Option : Génie Chimique

L'étude de l'activité antibactérienne des flavonoïdes de les grains de la plante *Lepidium Sativum*

Présenté par
TERFAS Noussaiba

Devant le jury composé de

Président : M^{me} .ALMI Sana

Encadreur : M^{me} .ADJEL Fatima

Examineur : M^{me} .REHALI Hanane

Promotion Juin 2017

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*عن أبي هريرة رضي
الله عنه أن النبي صلى الله
عليه وسلم قال: "عليكم
بالتقاء فإن الله جعل فيه
شفاء من كل داء" *

[رواه ابن السني وأبو نعيم]

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu « ALLAH » le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et patience pour terminer ce travail.

Je commence par exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements au M^{me} 'ADJAL FATIMA' qui m'a honoré en acceptant de diriger ce travail, pour ses encouragements, ses conseils, sa disponibilité et surtout pour sa patience dans la correction de ce mémoire.

Je remercie les membres de jury, d'accepter de juger notre travail,

M^{me} ALMI Sana et M^{me} REHALI Hanane.

Je remercie tout les membres de l'équipe de laboratoire de chimie industrielle de l'université Mohamed Khider Biskra pour leur sympathie ainsi que leurs idées constructives.

Je remercie l'homme qui a donné la consolidation jusqu'à terme à ce travail.

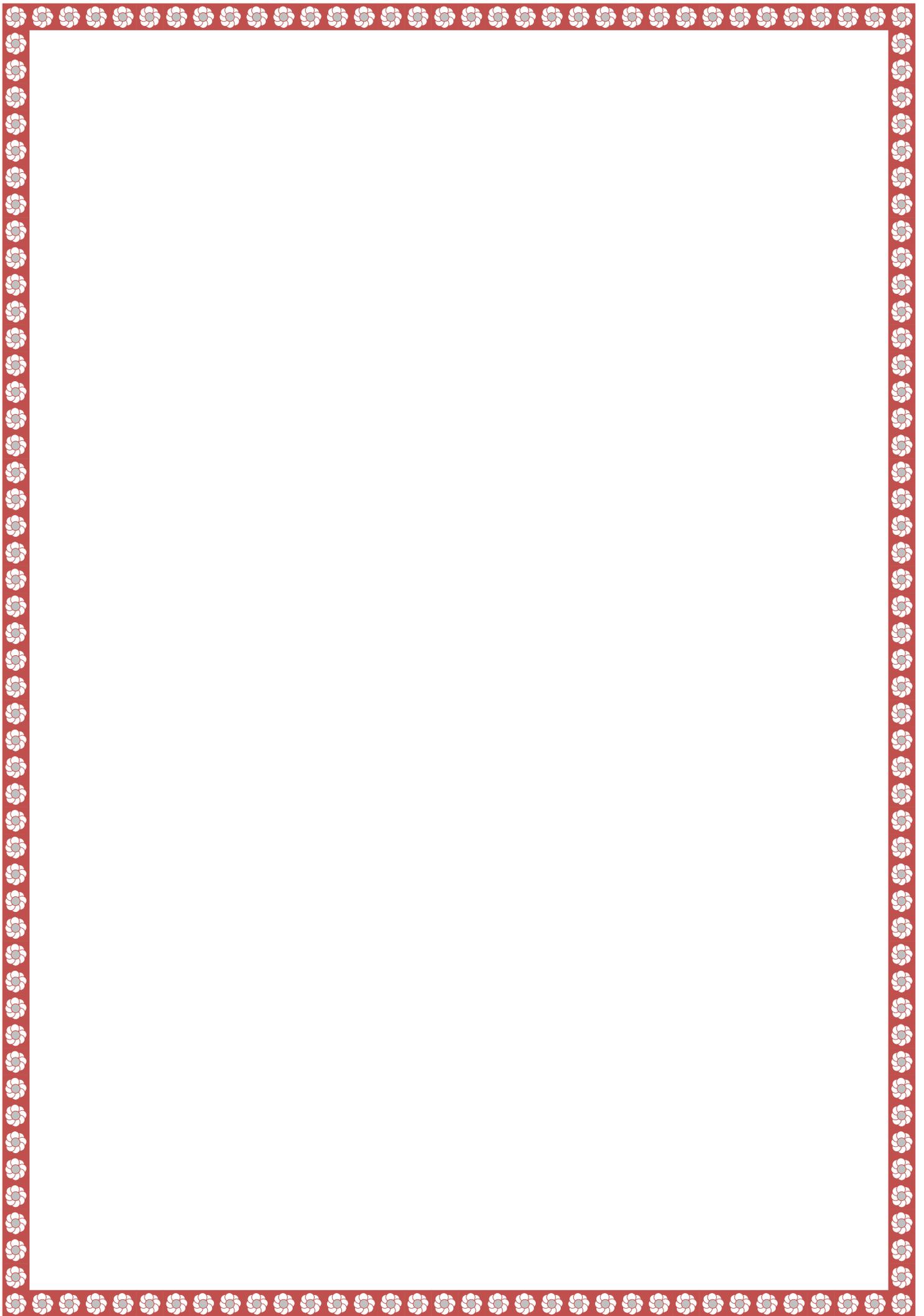
*Je remercie de même chef de laboratoire **Amo Said Zanouda** et madame **Manawi Fayroz** qui m'a accueilli dans son laboratoire de hôpital **ASHOUR ZAYEN** de **Ouled Djellel**, et le chef de laboratoire de hôpital **HAKIM SADAN**, madame **Fatiha** chef de labo **Zhaira Djatta** de hôpital de **DJAMORA**, chef de labo madame **Saliha** et les étudiants **Fatima** et **Sana** de **Lhadjeb** pour les conditions techniques mises à ma disposition afin de réaliser la partie de l'activité antibactérienne.*

Enfin je veux dire merci à tous les enseignants du département de chimie industrielle l'université de Biskra pour l'aide pendant ma formation d'étude.

A tous personnes qu'est aidé de proche ou loin.

Terfas Noussaiba





Dédicace :

*Je dédie ce modeste travail :
Aux deux être le plus chers au monde, qui ont souffert nuit et
jour*

Pour nous couvrir de leur amour, mes parents

A mon père, Ma mère

A mes frères

A mes sœurs

A ma chère grande mère

A mes fideles amies

A tous ceux que j'aime et que je respecte.

A toute promotion génie chimique 2017

Terfas Noussaiba



Sommaire

Sommaire

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale	1

❖ Chapitre I

Etude Botanique et Généralité sur les flavonoïdes.

I-1-Etude Botanique	3
I-1-1-Définition de lepidium sativum.....	3
I-1-2- Description et systématique de lepidium sativum.....	4
I-1-3- Planter et cultiver.....	5
I-1-4-Substances bioactives	5
I-1-5- Propriétés de lepidium sativum.....	5
I-1-6-Utilisations traditionnelles de lepidium sativum	6
I-2- Généralités sur les flavonoïdes	7
I-2-1-Définition des flavonoïdes.....	7
I-2-2- Répartition.....	8
I-2-3-Propriétés physicochimique.....	8
I-2-4-Propriétés antibactériennes.....	8
I-2-5- Autres propriétés des flavonoïdes.....	9
I-2-6-Constitution chimique et classification.....	9
a- Les flavones vraies	9
b- Les flavonols	10
c- Les flavanones	11
d- Glycosides flavonoïdes	12
e- Les anthocyanes	12
f- Les chalcones.....	13
g- Isoflavones	13
h- Les xanthones	14
i- Les aures	14

Sommaire

I-2-7- Importance des flavonoïdes.....	15
I-2-7-1- Importance économique	15
I-2-7-2- Importance écologique	15
I-2-8 Utilisation en thérapeutique	15

Chapitre II : Matériels Et Méthodes

II-1-Matériels utilisé	18
II-1-1-Matériel végétal.....	18
II-1-2-Matériels de laboratoire	18
II-1-3- Les appareils.....	19
II-1-4- Produits de laboratoire	19
II-2 -Les tests chimiques.....	20
II-2-1-Test des saponosides.....	20
II-2-2-Test des flavonoïdes.....	20
II-2-3-Test des stérols et terpènes.....	20
II-2-4-Test des tanins.....	22
II-2-5-Test des cardénolides	21
II-3-Extraction des flavonoïdes	21
II-3-1.L'extraction traditionnelle des flavonoïdes.....	21
II-3-2 L'extraction par Soxhlet.....	22
II-3-2 -Conservation des flavonoïdes	24
II-3-3-Rendement de l'extraction	24
II-4 .Milieux de culture.....	24
II-1-4. Matériel biologique.....	24
Les souches bactériennes testées	24
a- Staphylococcus aureus ATCC 25923	24
b- Escherichia coli ATCC 25922	25
c-Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	25
II-5- Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes....	25
II-5-1-Méthode d'aromatogramme.....	25
a- Préparation des disques.....	25

Sommaire

b- Préparation des milieux de culture	25
c- Ré-isolément des souches bactériennes	26
d- Préparation de la suspension bactérienne et ensemencement.....	27
e- Préparation des dilutions.....	28
f- Application des disques	30
g- Lecture de l'aromatogramme	30
❖ Chapitre III : Résultats et Discussion	
III-1. Résultats des testes chimiques	34
III-2- Caractéristiques organoleptiques des flavonoïdes de la plante lepidium sativum	34
III-3- Rendements des flavonoïdes	35
III-4- Résultats de l'activité antibactérienne.....	36
III-4-1- Résultats de l'aromatogramme.....	36
a- Extrait butanolique	36
b- Extrait éthanolique	40
Conclusion Générale.....	43
Références bibliographiques	44

Liste de Figure

Liste de Figure

N°	Titre de figure	Page
I.1	les feuilles de lepidium sativum	04
I.2	Les germes de lepidium sativum	04
II.1	l'organigramme de l'extraction traditionnelle des flavonoïdes	22
II.2	montage de soxhlet	23
II.3	évaporateur rotatif	23
II.4	Les étapes pour préparation ses disques	25
II.5	Gélose Nutritive	26
II.6	Gélose Mueller-Hinton	26
II.7	Ré-isolément des souches bactériennes	27
II.8	Les trois souches bactériennes	27
II.9	La préparation de la suspension bactérienne	27
II.10	L'ensemencement des bactéries	28
II.11	Technique de dilution de flavonoïde étudiée dans le DMSO	29
II.12	les dilutions de l'extrait botanique et l'extrait éthanöique	29
II.13	Imprégnation les disques avant sont application.	29
III.1	Les extraits butanolique et éthanolique.	35
III.2	Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait	36

Liste de Figure

	Botanique) testée (E-Coli)	
III.3	Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait Botanique) testée (Staphylococcus aureus)	36
III.4	Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait Botanique) testée (pseudomonas)	37
III.5	Histogramme présent les zones d'inhibition pour toutes les souches bactéries de l'extrait botanique.	39
III.6	Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait éthanoïque) testée (E-Coli)	40
III.7	Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait éthanoïque) testée (pseudomonas)	40
III.8	Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait éthanoïque) testée (Staphylococcus)	40
III.9	Histogramme présent les zones d'inhibition pour toutes les souches bactéries de l'extrait éthanoïque.	41

Liste de Tableau

Liste de Tableau

N°	Titre de tableau	Pages
I.1	Utilisations traditionnelles de lepidium sativum.	06
I.2	Tableau d'utilisations thérapeutiques de quelques flavonoïdes.	17
II.1	Les appareils de laboratoire utilisés.	19
III.1	Résultats des tests chimiques de lepidium sativum.	34
III.2	Caractères organoleptiques des flavonoïdes étudiés.	34
III.3	Diamètre des zones d'inhibition des flavonoïdes de l'extrait butanolique.	38
III.4	Diamètre des zones d'inhibition des flavonoïdes de l'extrait ethnolique.	41

Liste des abréviations

UV : Spectrophotométrie UV

DMSO : diméthyle sulfoxyde

MH : Gélose Mueller Hinton

GN : Gélose Nutritive

ATCC : Américain Type culture Collection

C₄H₉OH : Butanol

C₂H₅OH : Ethanol

FeCl₃ : Chlorure de ferre

CHCl₃ : Chloroforme

CH₃COOH : Acide acétique

H₂SO₄ : Acide sulfurique

NH₄OH : Hydroxyde d'ammonium

HCl : Chlorure d'hydrogène

NaCl : Chlorure de sodium

R : Rendement

RF : Rendement de flavonoïde

% : Pourcentage

C° : Degrée celcus

mm : millimètre

µl: microlitre

S. aureus : Staphylococcus aureus

E.coli : Escherichia coli

P. aeruginosa :Pseudomonas aeruginosa



Introduction Général

Introduction Générale

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicaments. Aujourd'hui encore une majorité de la population mondiale, plus particulièrement dans les pays en voie de développement, se soigne uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. L'industrie pharmaceutique moderne elle-même s'appuie encore largement sur la diversité des métabolites secondaires végétaux pour trouver de nouvelles molécules aux propriétés biologique inédites.

Le choix de la plante étudiée a été guidé d'une part par l'indication d'usage traditionnelle, et d'autre part par le fait de *lepidium sativum* n'a pas fait l'objet d'investigations chimique et biologique.

Lepidium Sativum une espèce des zones désertique, connue localement sous le nom « Taifa » est utilisée par la population dans le traitement de plusieurs maladies.

Les flavonoïdes représentent une classe très importante de poly phénol. Ils jouent un rôle important, notamment dans la chimio-taxonomie de plusieurs espèces végétales et dans les mécanismes de résistance à certaines maladies. Ils possèdent aussi de nombreuses propriétés pharmacodynamiques et font objet de diverses applications dans l'industrie alimentaire. Leur extrême variabilité structurale et leur bonne stabilité en sont les principales responsables.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'activité antibactérienne d'extraits de la plante *lepidium sativum* vis-à-vis les souches bactérien (E- coli, Pseudomonas, Staphylococcus).

Notre travail est réparti en trois chapitres :

Le premier chapitre présente une étude botanique et écologique de la plante *lepidium sativum* (systématique, description, utilisation médicinal), et généralités sur les flavonoïdes (classification, propriétés physiques et chimiques,....).

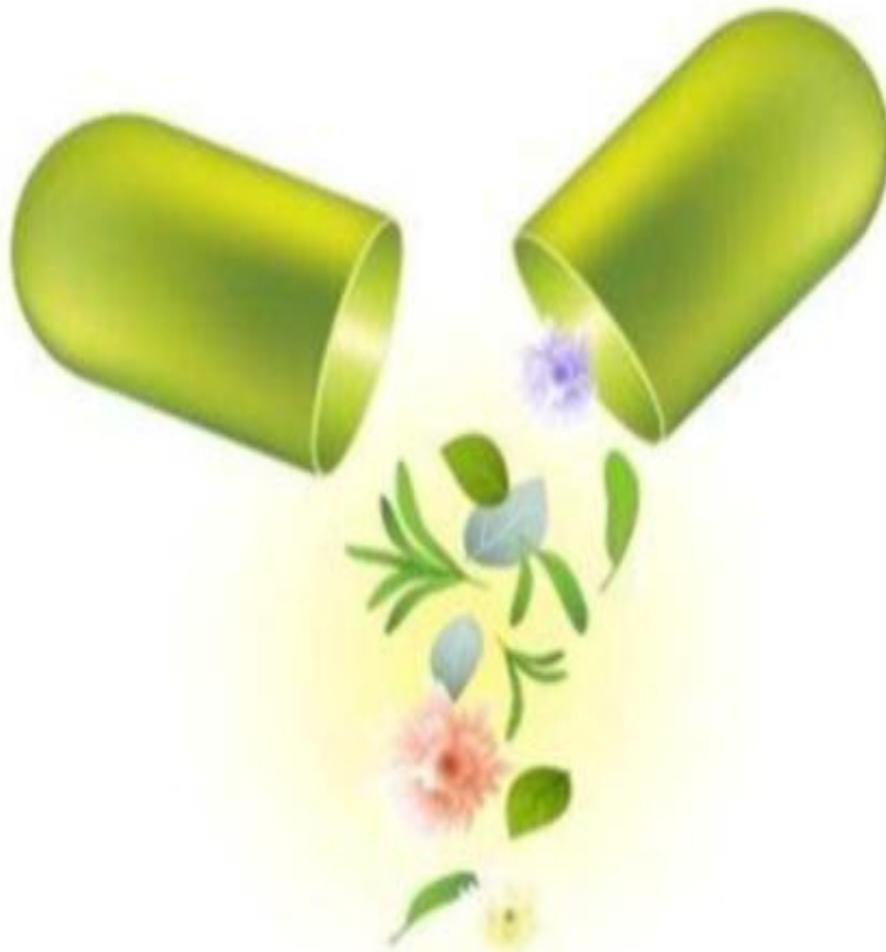
Le deuxième chapitre présente les matériels, les méthodes et les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail à savoir

-La provenance du matériel végétal et les parties utilisées.

- L'extraction des flavonoïdes.
- Les testes chimiques.
- Le teste de l'activité anti bactérienne.

Le troisième chapitre présente les différents résultats et leurs discussions.

Finalement, on termine par une conclusion générale.



Chapitre I

**Etude Botanique Et Généralité
sur les flavonoïdes**

I-1. Etude Botanique

La valorisation des plantes médicinales peut être un des moyens de relancer durablement une région. En effet, de nombreux prescrits à des milliers de personnes dans le monde sont d'origine naturelle, qu'on découvre, étudiant l'usage des plantes dans la médecine populaire [1].

I-1-1. Définition de *lepidium sativum*

Lepidium sativum, appelée cressonnette, passerage cultivée ou cresson alénois, est une plante annuelle appartenant à la famille des Brassicacées. Cultivée comme plante potagère depuis des siècles, le cresson alénois est d'origine incertaine, puisque qu'il est devenu spontané dans les zones civilisées : il pousse naturellement dans les friches au milieu de zones habitées [2].

C'est une plante cultivée, dont les feuilles relèvent une salade ou entrent dans la composition du mesclun.

La cressonnette est parfois aussi consommée en graines germées [3].



Figure I.1 : Les feuilles de *lepidium sativum*



Figure I.2 : Les germes de *lepidium sativum*

I-1-2. Description et systématique de *lepidium sativum*

C'est une plante annuelle glabre dont la tige est dressée et rameuse. Les feuilles sont sessiles, linéaires, petites à quatre pétales. Les fleurs sont petites et blanches. Les fruits sont des graines rougeâtres qui naissent dans une petite capsule [5].

- Nom Scientifique: *Lepidium Sativum*
- Famille: Brassicacées
- Nom Commun: Cresson Alénois
- Nom Local: Hab. Rachad
- Origine : Asie, Afrique du nord
- Période de floraison : juillet, août
- Couleur des fleurs : blanc
- Type de plante : légume
- Type de végétation : annuelle
- Hauteur : 20 à 50 cm

I-1-3. Planter et cultiver

- Rusticité : rustique, jusqu'à -12 °C
- Type de sol : normal à riche
- Acidité du sol : basique
- Humidité du sol : normal [1]

I-1-4.Substances bioactives

Il contient les graines et les feuilles ont la saveur légèrement piquante, intense et chaude, car elles renferment un composé soufré qui leur confèrent ce goût caractéristique de cette famille. Il est très riche en vit C, E, A, B1, B2, des sels minéraux, des glucosides [4].

I-1-5.Propriétés de *lepidium sativum*

Antiscorbutiques c'est un bon reconstituant, stimulantes, diurétiques, antianémiques, vermifuges, contraceptives. Les graines de *lepidium sativum* prises telles quelles sont ou en tisane se montrent bénéfiques pour la dissolution des calculs rénaux et les infections urinaires.

Le décocté est préconisé dans les cas de dysurie. Les graines pilées et mélangées au miel passant pour traiter les blennorragies. Cette plante est également recommandée pour ses propriétés contraceptives (10 g de graines grillées réduites en poudre sont données une fois par mois le troisième jour des règles à jeun assurent la contraception de la femme pendant toute une année).

Les graines sont aussi indiquées pour traiter les pyrosis, d'autre part mélangées au miel, ils calment la toux [2]

I-1-6.Utilisations traditionnelles de *lepidium sativum* [5.6.7]

Tableau I.1 : Utilisations traditionnelles de *lepidium sativum*.

Utilisations traditionnelles	Méthodes utilisations
réguler les fonctions digestives et à ouvrir l'appétit (appétissante)	Mangée avec le déjeuner et le dîner
Utiles pour le traitement, l'anémie et gènère des urines et abaisse la pression et expulser les toxines	Pris chaque matin avec du lait
Atténuation des douleurs abdominales, élimine les parasites intestinaux et la diarrhée	pris le à jeun avec lait

Utilisation du cresson alénois pour la solidité des os, en particulier pour traiter les fractures	pris trois fois par jour avant de manger avec du lait ou yaourt
Utilisé pour traiter la sciatique, interne et externe.	mis le queue du mouton sur feu, jusqu'à ce qu'il se transforme en une couleur brune, puis on le mélanger avec lepidium sativum broyée puis on mettre le mélange dans l'emplacement du sciatique.
Huile de lepidium sativum est très utile en cas de maladies pulmonaires et sensibilité.	Où il est placé sur la poitrine avec un massage constant.
Efficace contre la grippe, l'asthme et des douleurs thoracique	pris avec du lait chaque jour pendant une semaine
Lepidium sativum est utilisé à l'extérieur pour traiter la perte de cheveux et de leur fragilité	Utilisé avec l'huile d'olive
Efficace dans le traitement des hémorroïdes.	es suppositoires sont préparé par mélangé le cresson alénois sous forme de poudre avec du suif et de miel. l'huile d'olive aide nous de facilite la préparation
Efficace dans le traitement de maux de tête.	Utilisé avec colorant du henné à la tête du patient

I-2. Généralités sur les flavonoïdes

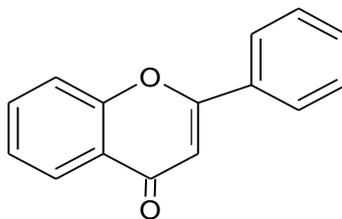
Les plus connus sont les citroflavonoïdes. Ils se trouvent dans les écorces d'agrumes : Oranges, citrons ou pamplemousses. La peau de l'orange contient de minuscules vésicules baignant dans un tissu de soutien, appelé 'flavedo', qui doit sa couleur jaune orangée aux flavonones. En dessous de cette fine couche colorée se trouve une seconde couche blanche appelée 'albedo' qui ne contient aucun flavanone soluble. C'est la couche externe des écorces d'orange, le flavedo qui prêté son nom aux flavonoïdes [1.8.9].

La première substance flavonoïde obtenue à l'état pur est le Morin, isolé par E.CHEVREUL en 1814 de *Morus tinctoria* (les qualités tinctoriales de nombreux végétaux contenant des flavonoïdes ont été utilisées pendant longtemps) [10.11.12].

Enfin quelques années plus tard, les progrès de la biochimie permettaient de décrire leur structure moléculaire.

I-2-1.Définition des flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels, au sens strict, sont des pigments jaunes, généralement phénolique, très répandus chez les végétaux, généralement à l'état d'hétérosides dont les génines sont des dérivés de la phényl chromone (flavones vrais) [12.13].



Squelette de base des flavonoïdes Phényl -2 chromone [14]

I-2-2.Répartition

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racine, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois ...) particulièrement dans certaines familles : polygonacées, rutacées, légumineuses, ils ont une teneur maximale dans oranges jaunes [10.13].

I-2-3.Propriétés physicochimique

Les flavonoïdes sont des solides cristallisés dont la teinte varie du blanc ivoire au jaune vif. Les flavonoïdes sont solubles dans les solutions alcalines (ammoniaque, potasse) en donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide [15]. Ils possèdent un spectre d'absorption dans l'ultraviolet avec généralement deux maximums caractéristiques variant avec chaque type flavonique et permettant leur identification [10.13].

I-2-4. Propriétés antibactériennes

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

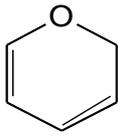
Les poly phénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis- a -vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbo hydrates) ou d'autres interactions pour inactiver les andésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire [16].

I-2-5. Autres propriétés des flavonoïdes

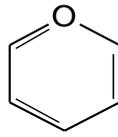
- Protection des plantes contre les radiations UV
- Sont impliqués dans les processus de défense de la plante contre les infections
- Bactériennes et virales.
- Agissent comme des pigments ou des Co-pigments.
- Modulation de la distribution d'auxine.
- Fonctionnent comme des signaux moléculaires de reconnaissance entre les bactéries symbiotiques et les légumineuses afin de faciliter la fixation de l'azote moléculaire.
- Régulation de l'élongation des tiges.
- Interviennent dans la maturité des fruits.
- Sont à l'origine des goûts amers et astringents afin de repousser les animaux [16].

I-2-6. Constitution chimique et classification

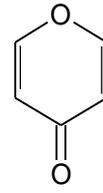
La structure des différents types de flavonoïde vraie selon la nature de l'hétérocycle oxygéné, ce hétérocycle est dérivé soit des formules de pyrane (1), du pyrylium (2), soit de celle γ -pyrane(3) [1.17].



(1)



(2)



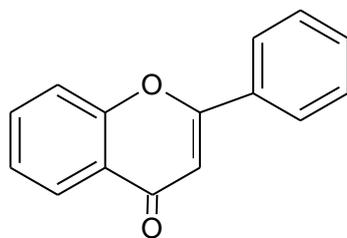
(3)

Les flavonoïdes se divisent en plusieurs classes selon le niveau d'oxydation de cycle central C3, on distingue :

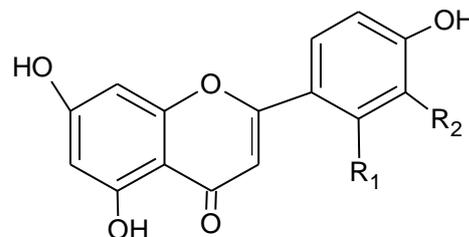
a- Les flavones vrais :

Sont une sous-famille des flavonoïdes dont la structure est basée sur la flavone . Ce sont des colorants végétaux jaunes dont environ 300 composés naturels sont connus. Comme d'autres flavonoïdes, elles sont parfois présentes sous forme d'hétérosides solubles dans l'eau. On les trouve parfois comme Co-pigment avec les anthocyanes [1.18].

Exemple : Dérivées de la phényl -2-chromone.



(Flavone vrais)



	R1	R2
Apigénine	H	H
Lutéoline	OH	H
Tricine	O-CH ₃	O-CH ₃

b-Les flavonols :

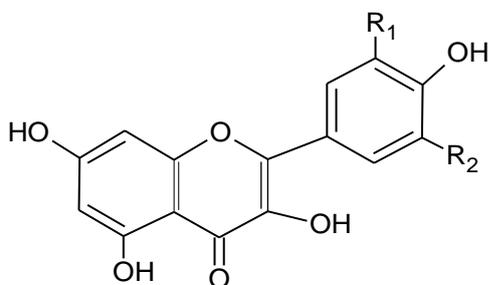
Sont un sous-groupe de flavonoïdes dérivés de la 3-hydroxyflavone ou flavonol, c'est-à-dire des flavonoïdes possédant un hydroxyle phénolique en C3 et une fonction carbonyle C=O en C4 sur l'hétérocycle central du squelette de base des flavonoïdes [19.20].

Ce sont des pigments végétaux de couleur jaune plus ou moins clair.

Ils diffèrent par le nombre et la position d'hydroxyle phénolique –OH, parfois méthyles (groupes méthoxy).

Les flavonols ne doivent pas être confondus avec les flavanols qui ne comportent pas en position 4 de fonction carbonyle C=O [2.18].

Exemple : possédant un hydroxyle alcoolique 3 (OH-3 flavones) [21].



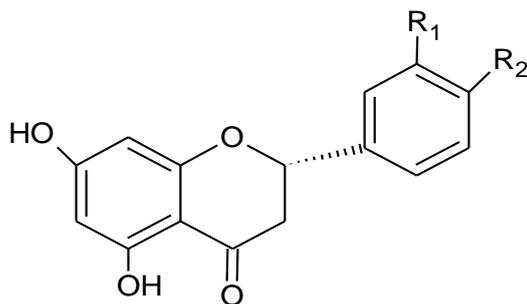
Flavanols

	R1	R2
Kaemp férol	H	H
Quercétine	OH	H
Isorhamnétine	O-CH ₃	H
Myncétine	OH	OH

c-Les flavanones :

Sont un sous-groupe de flavonoïdes, dérivés 2,3-dihydrogénés des flavones. Elles sont généralement glycosylées par un disaccharide en position 7 pour donner des hétérosides de flavonones [2].

Exemple : ne comportant pas de doubles liaisons en 2-3



Les flavonones

	R1	R2
Pinocembrine	H	H
Narigénine	H	OH
Eriodictyol	OH	OH

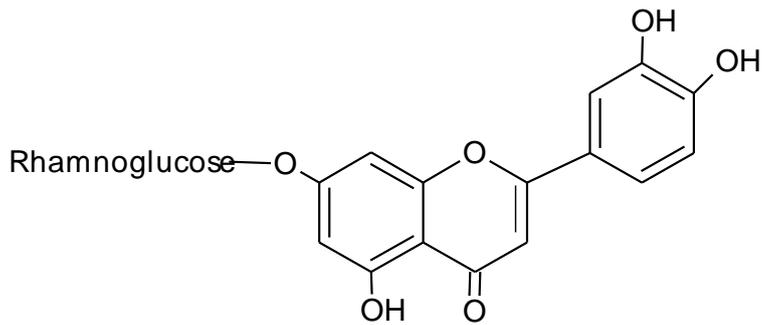
d-Glycosides flavonoïdes :

Glycosides flavonoïdes sont un groupe de composés chimiques qui apparaissent dans quantités faibles mais significatives dans les fruits et légumes.

Plus de 4000 flavonoïdes différents ont été identifiés, dont certains sont examinés en détail est soupçonné d'avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine. Certains des avantages liés à la santé de ce groupe comprennent le renforcement du système immunitaire, protection contre le cancer et une réduction de la fragilité capillaire [1.18.22].

On les trouve sous forme d'O- Hétérosides dont les sucres sont les plus souvent liés à l'oxygène en 7 chez les flavones et flavonones, et par l'oxygène en 3 chez les flavonales.

Les glycosides flavonoïdes tels que la rutine, la rutoside, la quercitrine, et hespéridine sont employés, empiriquement et de puis longtemps comme vas cula protecteuse, anti œdémateuse, et anti-inflammatoires [2.23.37].



Glycosides flavonoïde

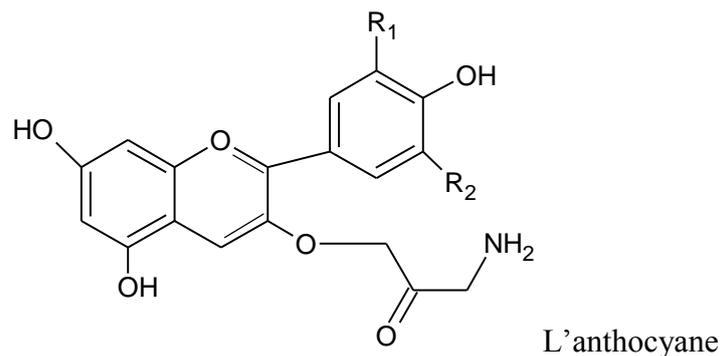
e- Les anthocyanes :

Ils occupent la première place parmi les responsables de la couleur des fleurs. Les plus part des pigments végétaux rouges et bleus sont des anthocyanes.

Ils offrent un grand intérêt technologique en raison de leur solubilité et de leur résistance à la chaleur et à la lumière.

Les anthocyanes naturels sont tous glycosylés. La structure aglycone est appelée anthocyanidine, et les formes glycosylées anthocyanines [1.24].

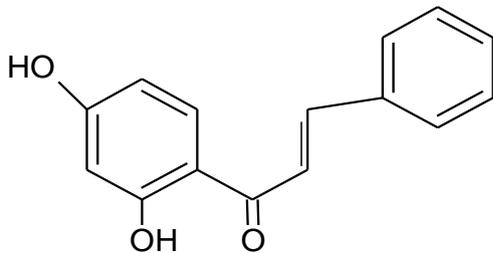
Il existe dans la nature 6 classes d'anthocyanidines différentes représentées sur le tableau.



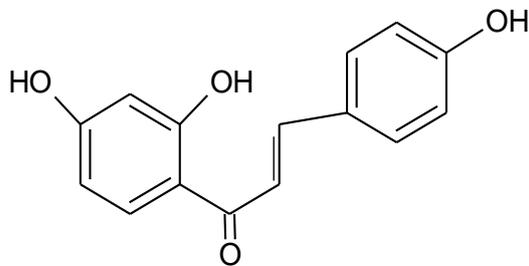
L'anthocyanine

	R1	R2
Pèlargonidine	H	H
Cyanidine	OH	H
Oèonidine	O-CH ₃	H
Dèlphinidine	OH	OH
Pètunidine	O-CH ₃	OH
Molvidine	O-CH ₃	O-CH ₃

f- Les chalcones : Dont le cycle pyronique est ouvert (isomères des flavanones)



Squelette des dihydrochalcones

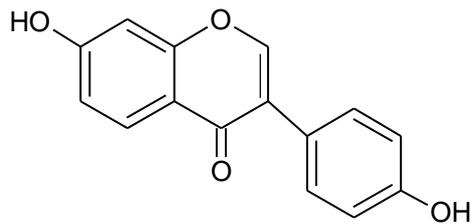


Isoliquiritigène (trihydroxy -4, 2,4 chalcone)

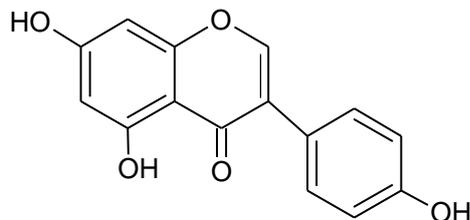
g-Isoflavones :

Sont une sous-famille des flavonoïdes très étudiée pour leurs propriétés pseudo-ostrogéniques. Ce sont les isomères de flavones, avec une structure quasi identique, la seule différence étant la position du groupe phényle, lié au carbone 3 au lieu du carbone 2 pour les flavones[1].

Exemple : Les isoflavones sont des dérivées de la phényl-3 chromone.



Diazéne (soja)

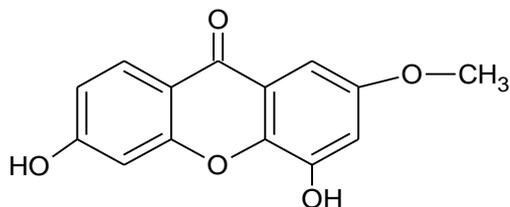


Génistéine (légumes)

h-Les xanthones : (dibenzopyrones)

Est un composé organique de formule brute $C_{13}H_8O_2$. La xanthone est plus communément appelée la dibenzo gamma-pyrone. Les xanthones ou xanthonoïdes sont des colorants jaunes dérivés de la xanthone [1].

Exemples : gentisine (di OH-1,7 méthyloxy -3 xanthone)

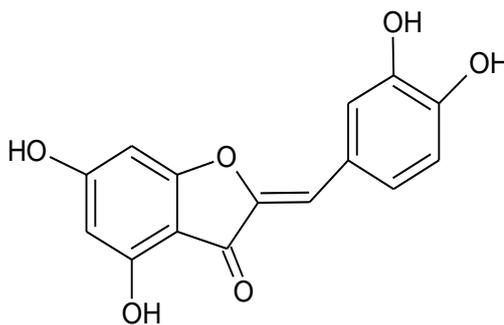


Gentisine

i- Les aurones : (benzalcoumaranones).

Sont une classe restreinte de flavonoïdes présente naturellement dans certaines fleurs, comme le Muflier, le Dahlia ou le Coréopsis, et qui leur confère leur couleur jaune d'or [2.18].

Exemple : Les aurones (Aureusidine).



Aureusidine

I-2-7. Importance des flavonoïdes

I-2-7-1. Importance économique

Les flavonoïdes ont une importance économique dans l'industrie pharmaceutique pour leurs activités anti-inflammatoire, spasmolytique, de plus ils sont utilisés dans l'industrie cosmétique puisque les dérivés de la lutéoline réduisent l'hyper pigmentation de la peau.[25]

Le caractère électrophile de la structure de base de flavonoïde explique leur grande réactivité dans l'industrie alimentaire, ils sont utilisés comme anti oxydants naturels pour la conservation aliments [1.26].

I-2-7-2.Importance écologique

L'activité écologique des flavonoïdes est liée à la coloration des oranges végétaux par les molécules flavonoïdes, en particulier les anthocynes. L'un des rôles de la couleur chez les plantes est d'attirer les insectes et cela afin de déclencher la fécondation.

On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certain insectes par leur gout désagréable, peuvent également jouer un rôle dans la protection de ces plantes [1.27.36].

I-2-8. Utilisation en thérapeutique

Par delà résultats partiels fournis par des tests biochimiques ou des études de pharmacologie animale, la réalité de l'efficacité clinique de la plupart des flavonoïdes et a fortiori, celle des drogues qui en contiennent – est rarement correctement établie, les essais chez l'homme qui ne sont pas assez souvent des « observation », ne sont pas toujours conduits en conformité avec les normes actuellement en vigueur pour ce type d'évaluation seul un petit nombre de molécules ou d'extrait standardisés a pu faire la preuve d'une supériorité par rapport à un placebo, malgré la subjectivité des symptômes et l'importance de l'effet placebo dans le type de pathologie concernée :

L'insuffisance veineuse la majorité de médicaments à base flavonoïdes naturellement disponibles reste donc « proposée dans... », Ces remarques, comme d'ailleurs les emplois énumérés ci-dessous, sont valable pour les anthocyanosides et les anthocyanidolods.

C'est essentiellement dans le domaine capillaire-veineux les constituant habituels des vacuole- protecteurs et vernoniques, des toniques utilisés en phlébologies, d'une façon générale les spécialités actuellement disponibles sur le marché ont les indications ou proposition d'emploi suivant :

- Traitement des symptômes en rapport avec l'insuffisance veino-lymphatique :

Jambes lourdes, paresthésies, crampes, douleurs et autres signes fonctionnels, œdèmes.

- Traitement des troubles de la fragilité capillaire au niveau de la peau (ecchymoses, pétéchies) et des muqueuses (gingivorragies, épistaxis).
- Métrorragies liées à la contraception par dispositif intra-utérin.
- Traitement des signes fonctionnels liés à la crise hémorroïdaire.
- Troubles liés à la circulation rétinienne et/ ou choroïdienne en association éventuelle avec d'autres traitements [1.28].

Tableau I.2 : Tableau d'utilisations thérapeutiques de quelques flavonoïdes

Flavonoïdes	Emploi thérapeutique
Thmonime	Diurétique
Cirsiliol	Digestive
Nepitrine	Anti-inflammatoire Anti –arthrique
Hypolaetion-8-glycoside	Anti-inflammatoire Anti-ulcère
Diméthyle ther apigenine Fisetine	Anti-inflammatoire
Khellin diméthoxy-methy-furano-chromone.	Anti-allergique
8-méthoxycirsilineol	Anti-spasmodique Stomachique
Cirsilaritine Baicaleine	Anti-prueique Anti-septique
Nepetine eupatorine ,eupatiline, jaceosidine,hispidulin et 5,7,4-trioh 6-ome flavone	Traitement des tumeurs
Quercetine	Anti-malaria Traitement du para influenza
Glucoside-3-kaempferol	Crises hémorroïdaires
Rutinoside-3- kaempferol	Troubles cardio- vasculaires
3-methl quercetine	Anti-viral
Morine	Traitement du poliovirus
Rutinoside -7-hesperetin (flavonane)	Maladies cérébrales vasculaires Hypotension

Rhamnosyl-3-kaempferol Glucoside-3-kaempferol	Activité analgésique
c-glycosyl flavonoides	Maladies rénales



Chapitre II

Méthodes Et Matérielles

Le présent travail a pour objectif la valorisation de la plante *lepidium sativum*.

L'expérimentation a été réalisée comme suit :

L'extraction des flavonoïdes a été effectuée au niveau du laboratoire de département de chimie industrielle des sciences de la technologie.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a été réalisée au niveau du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ashour Zayen de Ouled Djellel.

II-1. Matériels utilisés

II-1-1. Matériel végétal

La partie sur laquelle nous avons basée notre travail la plante *lepidium sativum*, a été achetée sous forme poudre séchée a couleur marrent foncer.

II-1-2. Matériels de laboratoire.

- Boites de pétri stériles.
- Tubes à essai stériles.
- Papiers filtre (pour préparer les disques).
- Pipette pasteur.
- Micropipette variable.
- Bec bunsen.
- Disques d'antibiotiques juntamicine (hôpital de djamora).
- Règle (pour mesurer les diamètres des zones d'inhibitions).
- Ecouvillon.
- Densitomètre.
- Papier aluminium.
- Eprouvette graduée
- Les flacons

II-1-3. Les appareils

Les appareils de laboratoire utilisés.

Tableau II.1 : Les appareils de laboratoire utilisé

Matériel	Utilisation
Rotavapeur (l'évaporateur rotatif)	Evaporer les solvants
Soxhlet	Extraction
Réfrigérateur	Conservation des échantillons
Autoclave	Stériliser les matériels et les milieux de culture
Etuve réglée à 37C°	Incubation les souches bactériennes.
Micropipette (10ul)	Préparation de micro volumes.

II-1-4. Produits de laboratoire

- l'eau physiologique (9g /l NaCl).
- DMSO (diméthylesulfoxyde).
- L'eau distillée.
- Butanol (C₄H₉OH).
- Ethanol (C₂H₅OH).
- Chlorure de ferre(FeCl₃).
- Chloroforme (CHCl₃).
- Acide acétique(CH₃COOH).
- Acide sulfurique (H₂SO₄).
- Hydroxyde d'ammonium (NH₄OH)
- .Chlorure d'hydrogène HCl (1%).
- Hexane.
- Acétate d'éthyle.
- Gélose Mueller Hinton (MH) (hopital Hakim sedan)
- Gélose Nutritive (GN) (hôpital de djamora)
- Les souches bactériennes (hôpital Ashor Zain Oulled Djellel)

II-2 .Les tests chimiques

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques [19].

Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les poly phénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les saponosides, les stéroïdes, les coumarines, les stérols, les terpènes.....etc [18.19].

II-2-1.Test des saponosides

2g de poudre de la plante est mélangé à 80 ml d'eau distillée puis porter à l'ébullition pendant 5 minutes. On filtre, l'extrait est ensuite refroidi et agité vigoureusement pendant 2 minutes. La formation d'une mousse plus ou moins importante indique la présence de saponosides [18.19].

II-2-2.Test des flavonoïdes

10g de plante, mise en poudre, est pesé puis mélangé à 150 ml solution HCl (1%). Ce mélange est macéré durant 24h, après filtration on ajoute $\text{NH}_4 \text{OH}$ au 10 ml du filtrat jusqu'à la basicité. L'apparition d'une couleur jaune claire implique la présence des flavonoïdes [18.19].

II-2-3.Test des stérols et terpènes

5g de plante, mise en poudre, a été mis dans 20 ml de chloroforme et filtrer, ajouté au filtrat 1 ml d' H_2SO_4 avec précaution sur les parois du tube. Le point de rencontre entre les deux phases donne une couleur verte qui indique la présence des stérols insaturés et terpènes [18.19].

II-2-4.Test des tanins

10g de plante mise en poudre, on extrait par l'alcool éthylique 50%, puis on filtre, on ajoute au filtrat quelques gouttes FeCl_3 (1%).En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre [18.19].

II-2-5. Test des cardénolides

Prendre 1g du produit sec, macérer dans 20ml d'eau distillée puis filtrer, prélever 10ml du filtrat. Ce lui-ci est ensuite extraite avec un mélange de 10 ml CHCl_3 ,

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1 :1), évaporer la phase organique, dissoudre le résidu dans 3ml d'acide acétique glaciale, ajouter quelque gouttes de FeCl_3 suivi de 1 ml d' H_2SO_4 . La présence de la couleur verte bleus dans la phase acide indique la présence des cardénolides.

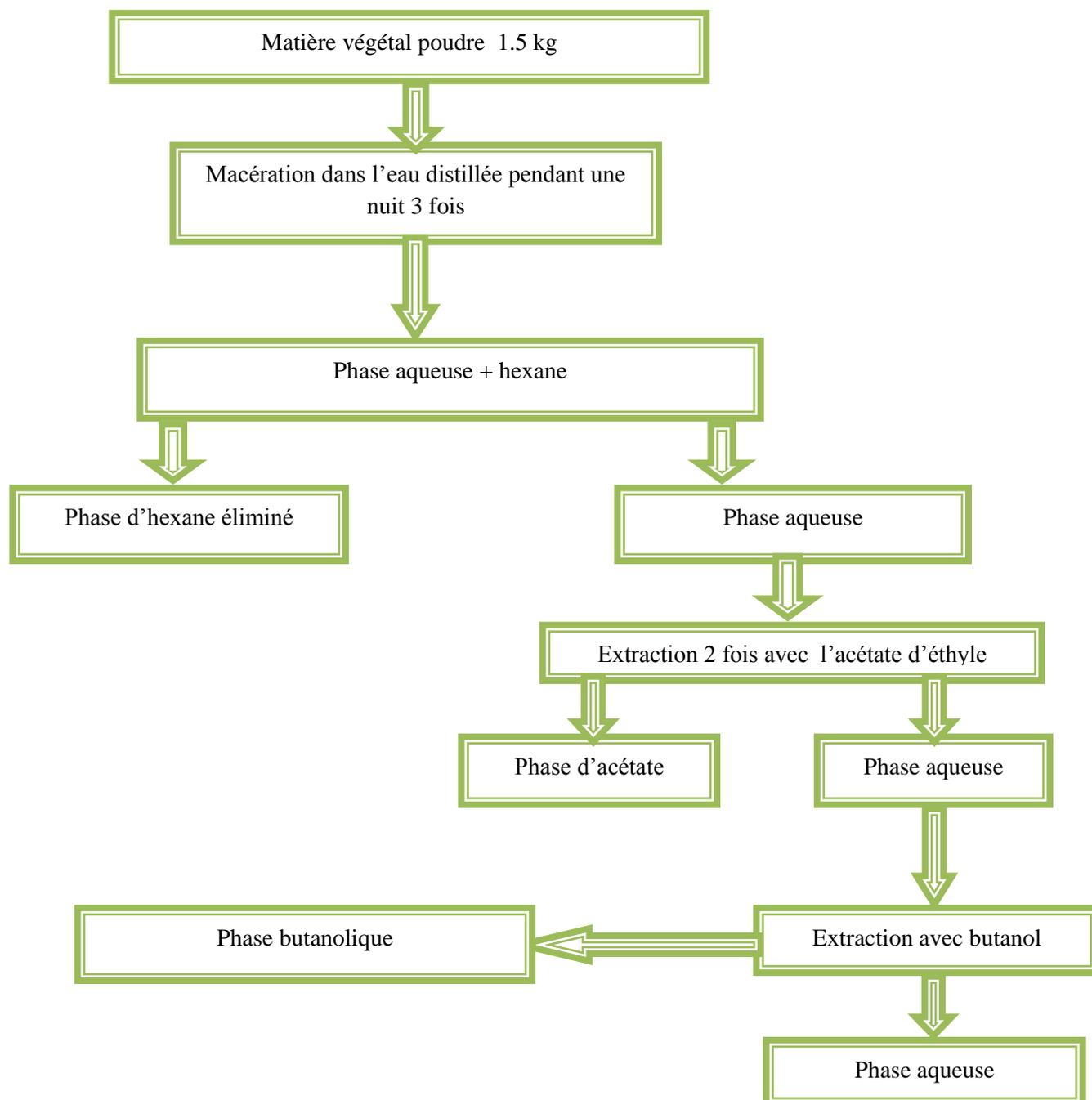
II-3.Extraction des flavonoïdes

II-3-1.L'extraction traditionnelle des flavonoïdes

Dans une erlenmeyer 2l, on ajoute 500g de la plante sous forme de poudre, avec l'eau distillée soin de bien recouvrir la matière végétale par le solvant. Après 24h, et après la filtration, on procède à des extractions successives, dans une ampoule à décanter de 1 L, en utilisant des solvants de polarité croissante : Hexane (pour éliminer les graisses), acétate d'éthyle, et en dernier le butanol.

La phase butanolique a été recueillie et évaporée à pression réduite à 92C° [30].

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme de la **figure II.1**.

Figure II.1 : l'organigramme de l'extraction traditionnelle des flavonoïdes

II-3-2. L'extraction par Soxhlet

20 g de plante séché est introduite dans l'appareil de soxhlet (**figure II. 2**) avec 300 ml d'éthanol pendant 2 h.

- On ajoute la phase éthanolique dans le rotavapeur (**figure II. 3**) pour évaporer le solvant (éthanol) à température d'ébullition 72C° [30].

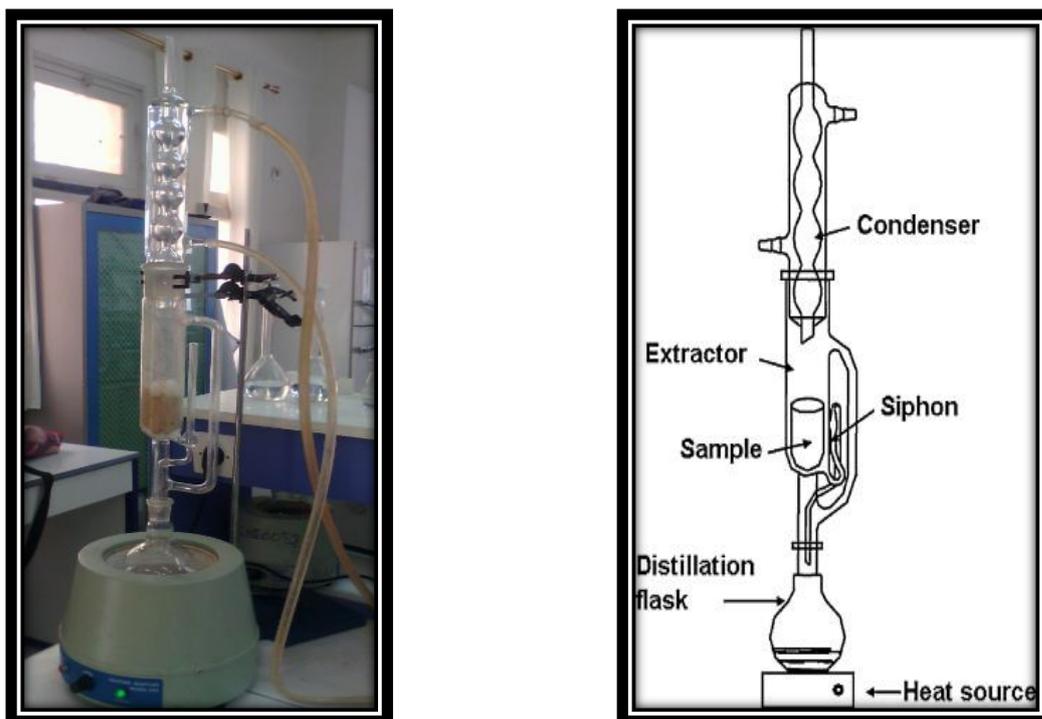


Figure II.2 : montage d'extraction par Soxhlet



Figure II. 3 : évaporateur rotatif

II-3-2 .Conservation des flavonoïdes

La conservation des flavonoïdes exige certaine précaution indispensable. Les flavonoïdes obtenues sont mises dans des flacons couverts par un film et sont conservés dans le réfrigérateur à température voisine de 4 C° à l'abri de la chaleur, de l'air et de la lumière, afin d'éviter leur altération [31.32].

II-3-3.Rendement de l'extraction

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec par le rapport entre le poids de l'extrait sec avec le poids du matériel végétal utilisé pour l'extraction en gramme [32 31] :

$$R \% = M_0 / M_1 * 100$$

R% : Rendement en pourcentage.

M₀ : la masse en gramme de l'extrait brut évaporé.

M₁ : la masse en gramme de la matière végétale initiale sèche.

II-4 .Milieux de culture

On utilise deux milieux de culture :

- Gélose Mueller Hinton (MH) : utilisé à l'étude antibactérienne de flavonoïde.
- Gélose Nutritive (GN) : utilisé pour l'obtention des souches jeunes.

II-1-4. Matériel biologique

Les souches bactériennes testées

Le choix des bactéries a été porté sur 3 souches fréquentes en pathologie humaine. Les souches bactériennes, référencées (ATCC : Américain Type culture Collection) proviennent du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Achour Zayen de Ouled djellel.

- ❖ Escherichia coli (ATCC25922) à gram négatif.
- ❖ Staphylococcus aureus (ATCC25923) à gram positif
- ❖ Pseudomonas aureus (ATCC27853) à gram négatif

a- Staphylococcus aureus ATCC 25923

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif qui tendent à se grouper en amas, irrégulier à la façon d'une grappe de raisin. Staphylococcus aureus est un germe aérobie – anaérobie facultatif, doit son nom d'espèce à l'aspect pigmenté de ses colonies. Il tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales, possède une coagulase, ce qui le distingue de la plupart des autres espèces de staphylocoques. La bactérie est très répandue chez l'homme et dans de nombreuses espèces animales. Chez l'homme, environ un tiers des sujets sont des porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des muqueuses et des zones cutanées humides. Il développe rapidement des résistances aux

antibiotiques et les souches hospitalières ne sont souvent sensibles qu'aux glycopeptides [33.34].

b- Escherichia coli ATCC 25922

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers [33.34].

c- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Le genre *pseudomonas* est fait de bacilles mobiles aérobies stricts, se cultive facilement sur les milieux usuels. *Pseudomona aeruginosa* (ou bacille pyocyanique) se caractérise par la pigmentation de ses colonies. C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des d'ivres animaux. Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales [33.34].

II-5.Méthodes d'évaluation de l'activité antibactérienne des flavonoïdes

II-5-1.Méthode d'aromatogramme

a- Préparation des disques

A l'aide d'une perforreuse, les disques sont découpés en diamètre de 6 mm à partir du papier filtre. Ces placer derniers sont dans un tube à essai et stérilisés à l'autoclave pendant 20 min à 120 °C.



Figure II.3 : Les étapes pour préparation des disques

b- Préparation des milieux de culture

La gélose Mueller Hinton est préparée en dissolvant 19g de poudre de gélose dans 500 ml d'eau distillé dans une erlène placées sur un agitateur –plaque chauffante. La gélose dissolue est versée dans des flacons puis stérilisé dans l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes, et enfin conservée dans le réfrigérateur à 4°C.

Avant utilisation la gélose Mueller Hinton stérile, prête à l'usage, a été coulée dans des boîtes des pétri stériles. Répartie uniformément dans des boîtes, ces dernières doivent être séchées 30 min à une température ambiante du laboratoire avant leur emploi.

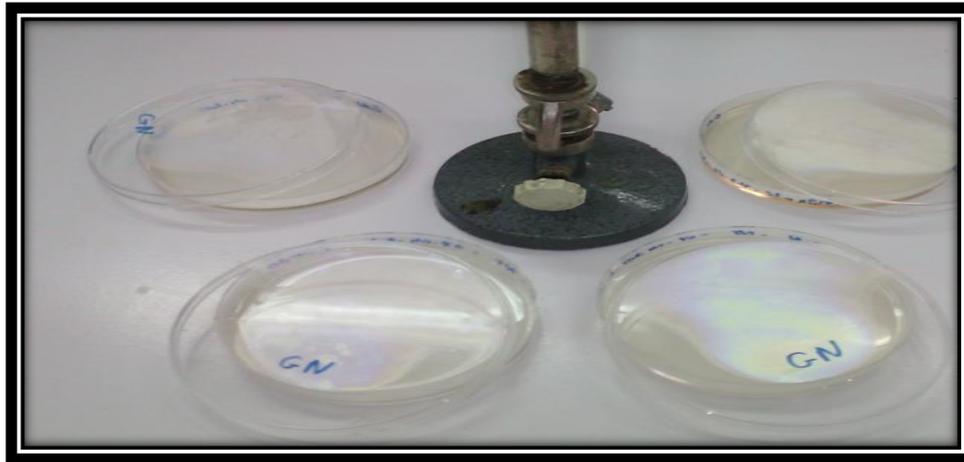


Figure II.4: Gélose Nutritive

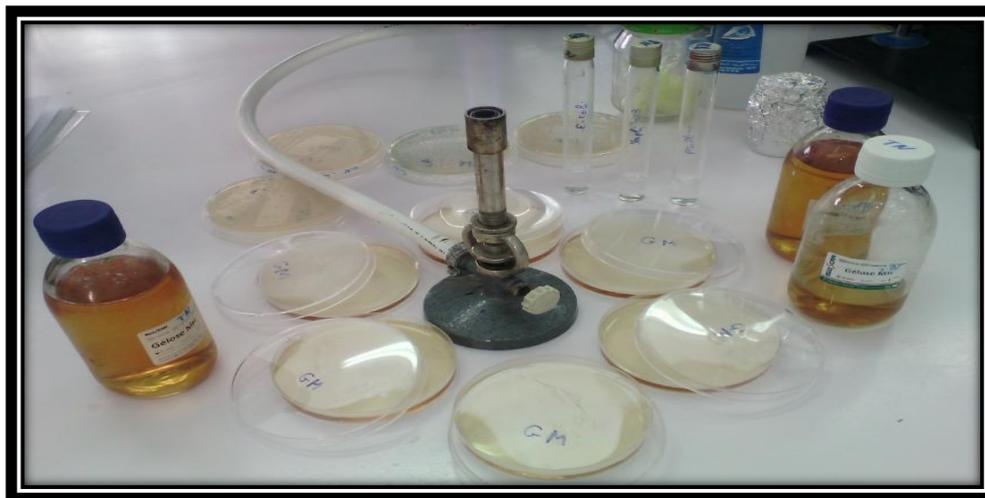


Figure II.5 : Gélose Mueller-Hinton

c- Ré-isolement des souches bactériennes

On a fait des prélèvements des souches bactériennes qui sont testés par once et ensemencée selon la méthode de stries sur une boîte de pétri coulé par gélose nutritive « GN » puis incubé 18 à 24 heures à 37°C, pour l'obtention des souches pures et jeunes.

On a réalisé le repiquage pour les trois souches référenciées (*E. coli* et *S. aureus*, *P. aeruginosa*).

Après 24 heures, les boîtes sont retirées et les cultures pures et jeunes serviront à la préparation des suspensions bactériennes.



Figure II.6 : Ré-isolément des souches bactériennes

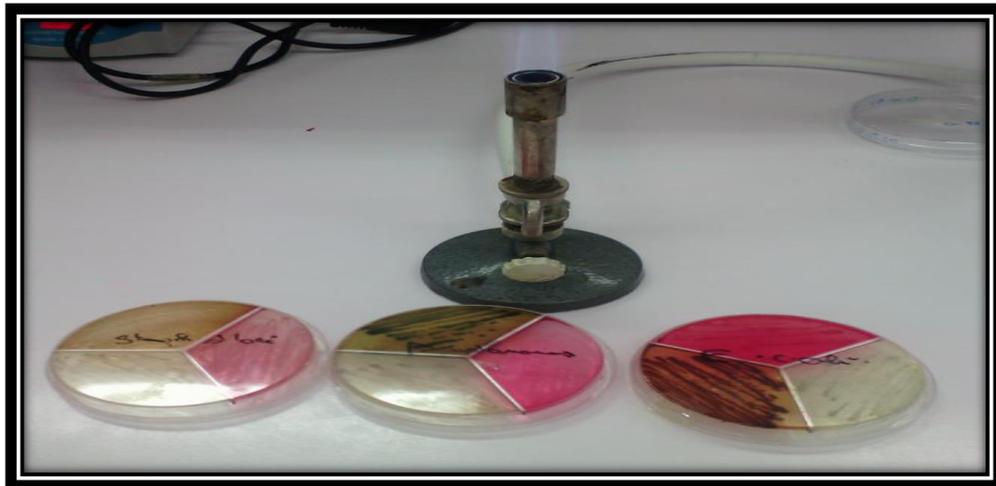


Figure II.7 : Les trois souches bactériennes

d-Préparation de la suspension bactérienne et ensemencement

A partir d'une culture pure des bactéries à tester sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques introduire l'anse de platine dans 5 ml d'eau physiologique stérile, bien homogénéiser la suspension bactérienne, la turbidité de la suspension peut être apprécié à l'œil nu.

L'ensemencement est réalisé par inondation sur les boîtes de pétri contenant de la gélose Mueller Hinton.



Figure II.8 : La préparation de la suspension bactérienne



Figure II.9 : L'ensemencement des bactéries

e. Préparation des dilutions

Le solvant de dilution est le DMSO, solvant organique, choisi pour son :
Innocuité vis-à-vis des bactéries (dépourvu d'activité antibactérienne).

Pouvoir solubilisant des flavonoïdes.

On prépare 3 dilutions de l'extrait flavonoïdique de concentration différents $1/2$, $1/4$ et $1/8$ (v/v) plus flavonoïde pur (solution mère de concentration 0.25g/ml). On prépare 4 tubes en verre stériles, 3 pour la préparation des concentrations ($1/2$, $1/4$, $1/8$) et le 4^{ème} contient l'extrait flavonoïdique (solution mère). On pose 2 ml de DMSO dans les 3 tubes. On ajoute dans le première tube 2ml de l'extrait soit une dilution de ($1/2$), puis on prend 2ml de la solution diluée du première tube vers le deuxième tube soit une dilution de ($1/4$), puis on prend 2ml de la solution diluée du deuxième tube vers le troisième tube soit une dilution de ($1/8$).

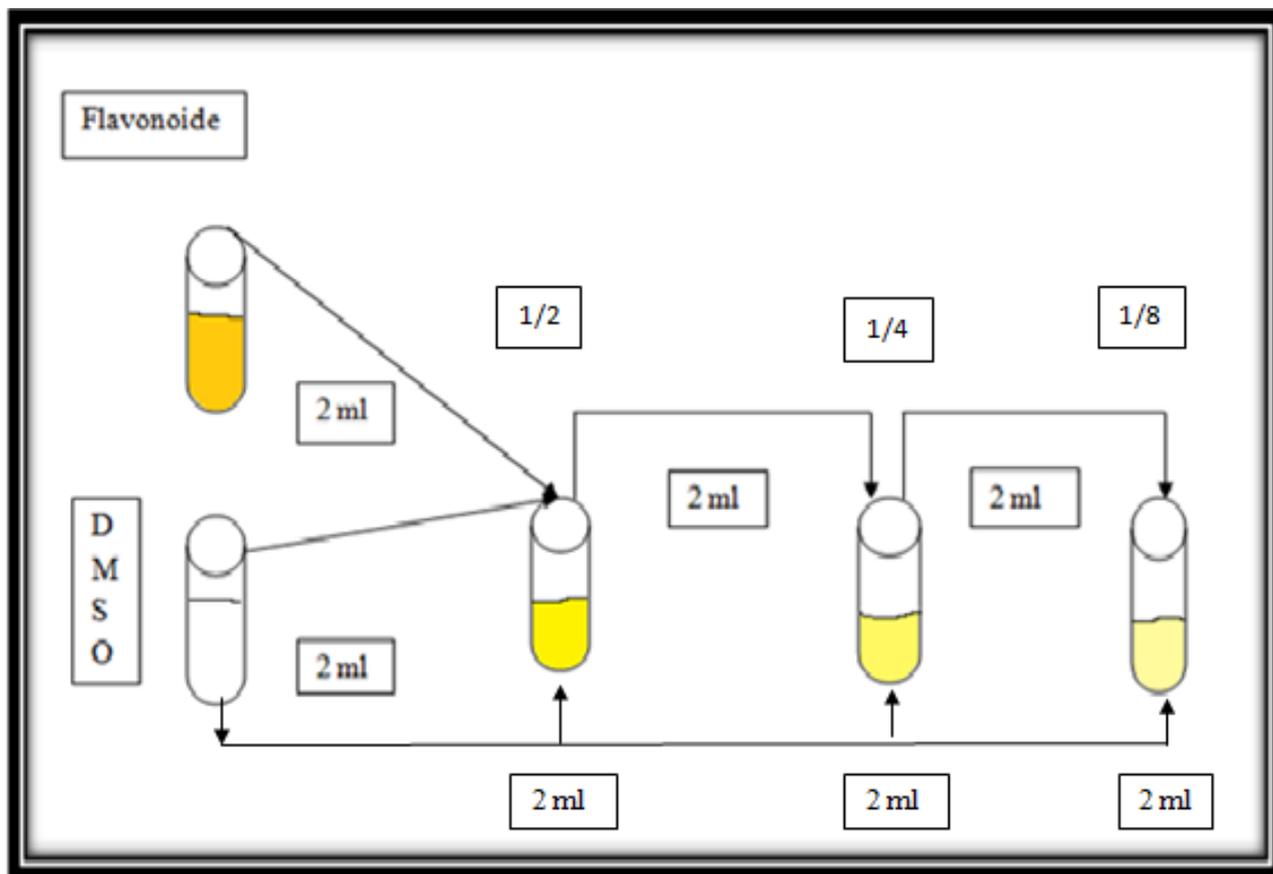


Figure II.10: Technique de dilution de flavonoïde étudiée dans le DMSO



Dilution de l'extrait Butanolique



Dilution de l'extrait Ethanolique

Figure II.11 : les dilutions de l'extrait butanolique et l'extrait éthanolique

f. Application des disques

Les disques stériles sont saisis a la pince stérile et imprégnés d'une faible quantité de flavonoïde (30 μ l) préalablement préparée a des différentes concentrations. Le 1^{er} disque contient flavonoïde pure, le 2^{ème} disque la dilution 1/2, le 3^{ème} disque la dilution 1/4, le 4^{ème} disque la dilution 1/8, et le 5^{ème} disque le DMSO. Les disques sont appliqués à la surface des milieux de cultures précédemmentensemencées. Après la mise des disques dans les boîtes de pétri, ces dernières sont laissées pendant 20minutes a température ambiante, puis incubés a 37C° pendant 24h.

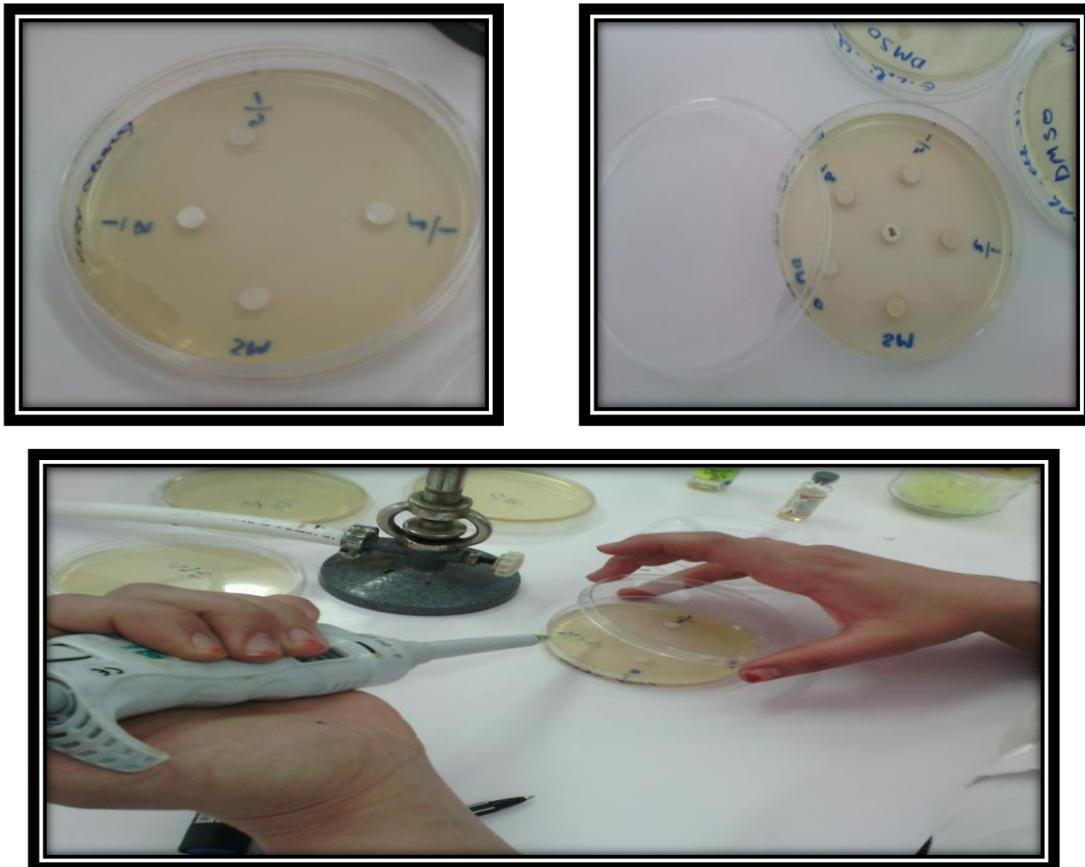


Figure II.12 : Imprégnation des disques avant application.

g- Lecture de l'aromatogramme

L'activité antibactérienne se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance bactérienne autour des disques contenant l'extrait à tester.

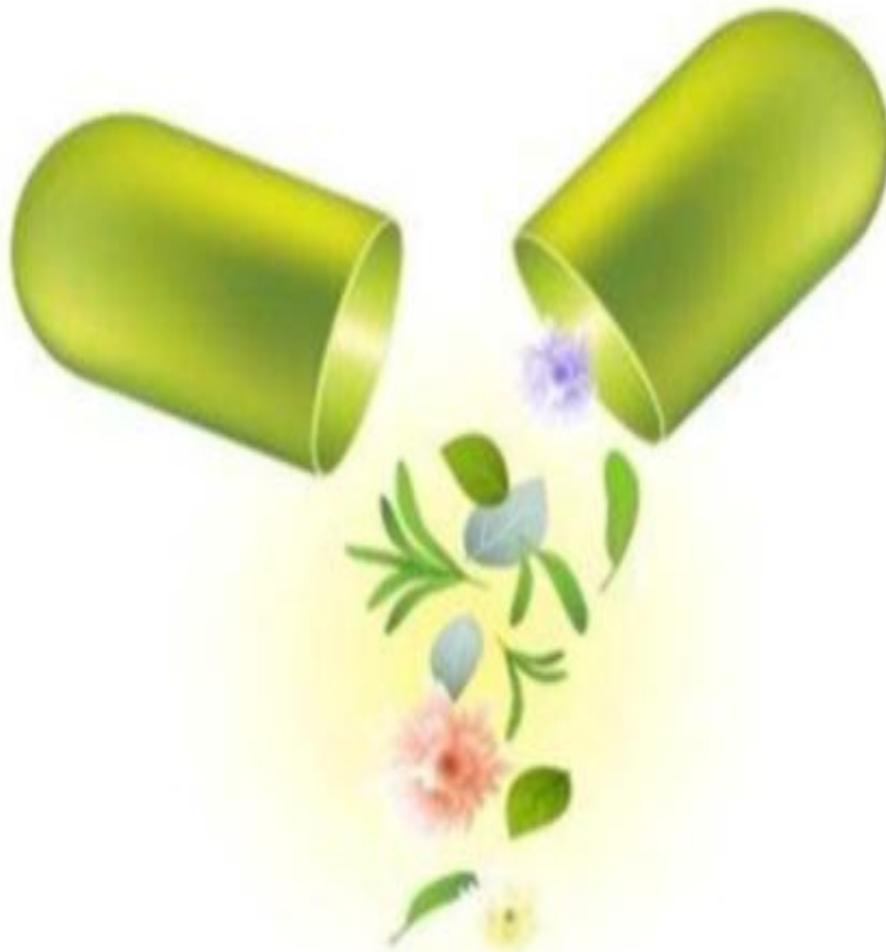
Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la zone d'inhibition et peut être symbolisé par des croix. La souche ayant un diamètre :

- Non sensible (-) ou résistante : diamètre < 8 mm.
- Sensible (+) : diamètre entre 9 a 14 mm.
- Très sensible (++) : diamètre compris entre 15 a 19 mm.

- Extrêmement sensible (+++) : diamètre >20 mm [35].

Remarque :

Nous avons réalisé les mêmes étapes pour les deux extraits.



Chapitre III

Résulta Et Discussions

III- 1.Résultats des testes chimiques

Les principaux groupes chimiques identifiés selon les méthodes classiques de caractérisation et d'identification sont consignés dans le tableau suivant:

Tableau III.1 : Résultats des tests chimiques de *lepidium sativum*.

Principe actif	Résultats obtenus
Saponosides	+
Flavonoïdes	+
Stérols et terpènes	–
Tanins	+
Cardénolides	–

Le **tableau III.1**. Montre que la plante *lepidium sativum* contient des flavonoïdes, des tanins, des saponosides.

Cette étude phytochimique qualitative montre que tous les groupes chimiques sont identifiés au niveau de la plante *lepidium sativum* dans la préparation traditionnelle (décoté de la plante). La méthode d'extraction utilisée en médecine traditionnelle est donc du point de vue qualitatif aussi efficace que les autres méthode d'extraction. L'abondance en principes actifs confère à la plante des propriétés pharmacologique remarquables, ce qui pourrait justifier ses multiples indications thérapeutiques et pour les quelles elle est utilisée en radiothérapie.

III-2.Caractéristique organoleptiques des flavonoïdes de la plante *lepidium sativum*

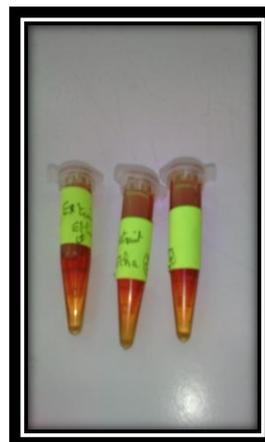
Les principales caractéristiques organoleptiques des flavonoïdes de la plante étudiée sont résumées dans le **tableau III.2**.

Tableau III.2 : Caractères organoleptiques des flavonoïdes étudiés

Les flavonoïdes	Aspect	Couleur
Phase butanol	Liquide épais	Marron clair
Phase éthanol	Liquide épais	Marron foncé



Extrait butanolique



Extrait éthanolique

Figure III.1 : Les extraits butanolique et éthanolique.

Notre flavonoïde est obtenu par l'extraction traditionnelle et par Soxhlet est sont les méthode normée pour l'extraction des flavonoïdes. Les paramètres organoleptiques de nos flavonoïdes sont en accord avec ceux répertoriés dans les normes.

III-3-Rendements des flavonoïdes

Nous avons utilisé 1.5 Kg de matière végétale (*lepidium sativum*), la masse de l'extrait butanolique sec est égale à 0.5 g.

Et pour l'extraction par Soxhlet nous avons utilisé 200 g de matière végétale, la masse obtenue de l'extrait éthanolique sec est égale à 1.2 g.

Le calcul du rendement R en % est alors effectué selon la formule suivante :

$$R\% = M_0/M_1 * 100$$

- R (éthanol) % = $(1.2 / 200) * 100 = 0.6 \%$
- R (butanol) % = $(0.5 / 1500) * 100 = 0.03 \%$

L'extraction des flavonoïdes est obtenue avec faible rendement qui est de 0.6% pour l'extrait éthanolique, et pour l'extrait butanolique on obtient un très faible rendement de 0.03%. Ce résultat peut être attribué à deux facteurs principaux liés d'une part au matériel végétal et d'autre part aux modes d'extraction.

III-4.Résultats de l'activité antibactérienne

III-4-1.Résultats de l'aromatogramme

L'activité antibactérienne des flavonoïdes de la plante *lepidium sativum* est évaluée sur trois germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*) après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37C°.

Cette activité est évaluée par la méthode d'aromatogramme, le pouvoir antibactérien des extraits éthanolique est obtenu par la mesure du diamètre de zone d'inhibition en (mm) à l'aide d'une règle.

III-4-1-1.Extrait butanolique



Figure III.2 : Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait Butanolique) testée (E-Coli)

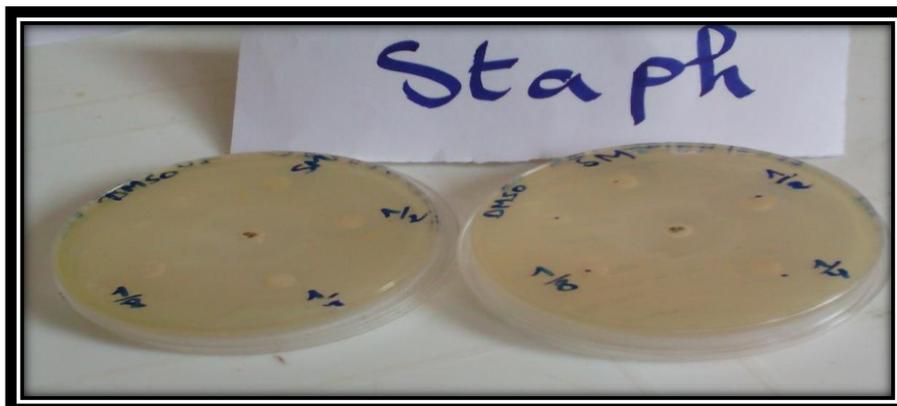


Figure III.3 : Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait Butanolique) testée (*Staphylococcus aureus*)



Figure III.4 : Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait Butanolique testée (pseudomonas))

Les résultats de la sensibilité des bactéries vis-à-vis de l'ATB, DMSO et de l'extrait butanolique de *lipedium sativum* sont donnés dans le tableau III. 3 et représentés sous forme d'histogrammes par la figure III. 5.

Tableau III.3 : Diamètre des zones d'inhibition (en mm) des flavonoïdes de Extrait butanolique .

Moyennes des diamètres des zones d'inhibition en mm						
Souches bactériennes	Antibiotique (témoin Positif)	DMSO (témoin Négatif)	Extrait butanolique	Dilution (1/2)	Dilution (1/4)	Dilution (1/8)
E. coli Gram (-)	19mm (++)	0	12mm (+)	11mm (+)	10mm (+)	8mm (-)
	19.5mm (++)	0	11.5mm (+)	11mm (+)	9.5mm (+)	7.5mm (-)
Moyenne	19.25mm (++)	0	11.75mm (+)	11mm (+)	9.75mm (+)	7.75mm (-)
P. auginosa Gram (-)	23mm (+++)	0	17mm (++)	11mm (+)	9mm (+)	0
	22mm (+++)	0	16.5mm (++)	11mm (+)	8.5mm (+)	0
Moyenne	22.5mm (+++)	0	16.75mm (++)	11mm (+)	8.75mm (+)	0
S. aureus Gram (+)	19mm (++)	0	19mm (++)	17.5mm (++)	10mm (+)	0
	20mm (+++)	0	18.5mm (++)	17mm (++)	9mm (+)	0
Moyenne	19.5mm (++)	0	18.75mm (++)	17.25mm (++)	9.5mm (+)	0

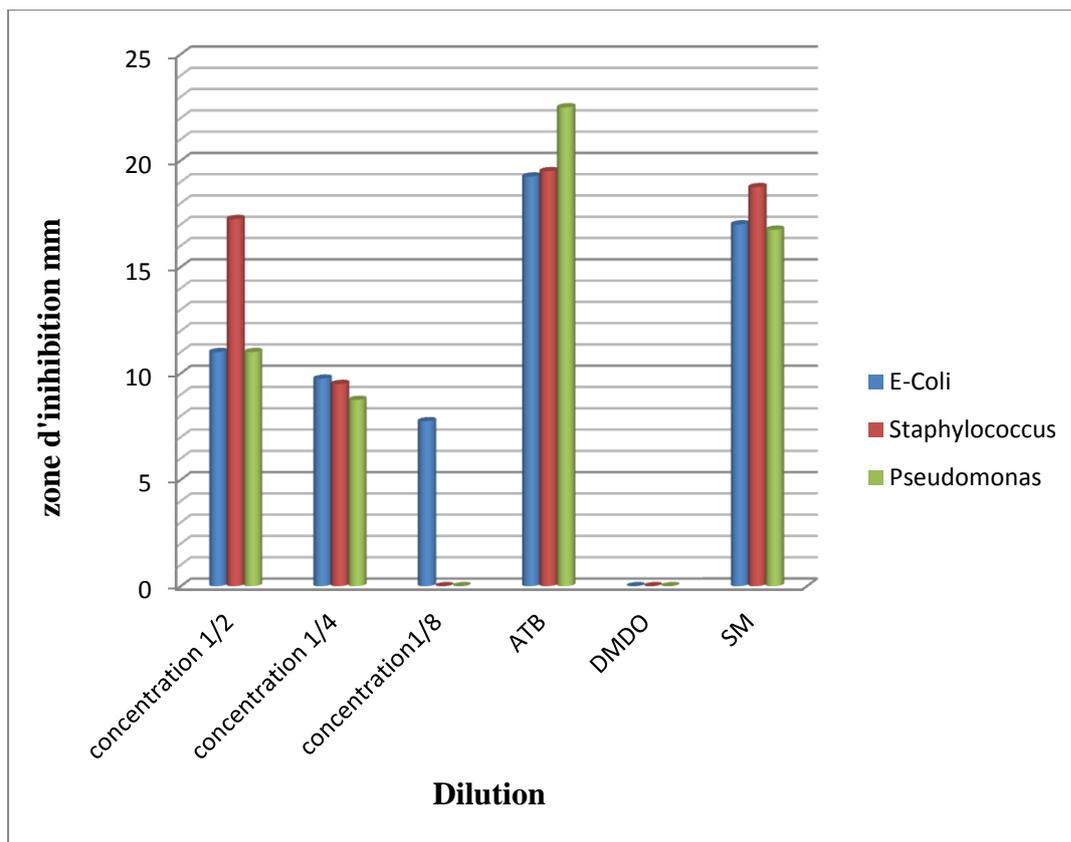


Figure III.5 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour toutes les souches bactériennes de l'extrait butanolique.

A partir des résultats des diamètres des zones d'inhibition dans le (**Tableau III.3**) et (**Figure III.5**), on observe que l'extrait butanolique de la plante *lepidium sativum* possède une activité antibactérienne différente contre E-Coli, Staphylococcus et Pseudomonas, dont les concentrations 1/2 et 1/4 les trois souches sont sensibles, par contre pour la dilution 1/8, les trois souches E-Coli sensible, staphylococcus et pseudomonas sont résistantes.

On remarque aussi que le diamètre de zone d'inhibition des antibiotiques utilisées est plus grand que celui de la zone d'inhibition de flavonoïde (extrait butanolique) de *lepidium sativum*.

Le DMSO n'a aucune activité antibactérienne, est totalement absente donc une zone d'inhibition autour de disque imbibé par DMSO.

III-4-1-2. Extrait éthanolique

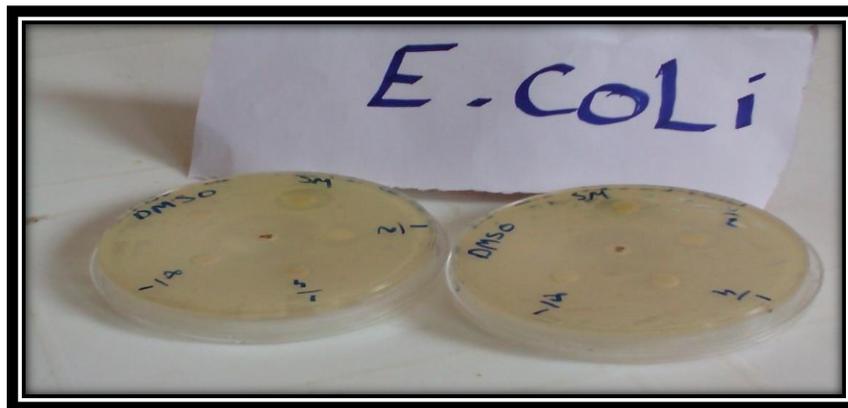


Figure III.6 : Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait éthanolique) testée (E-Coli)



Figure III.7 : Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait éthanolique) testée (pseudomonas)



Figure III.8 : Les zones d'inhibition de flavonoïde (Extrait éthanolique) testée (Staphylococcus)

Concernant l'extrait éthanolique, les résultats de l'aromatogramme obtenus sont reportés dans le tableau III.4. Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition de chaque souche (E-Coli, Staphylococcus et Pseudomonas), en fonction des dilution, DMSO et ATB testés sont représentées par la figure III. 9 sous forme d'histogrammes.

Tableau III.4: Diamètre des zones d'inhibition (en mm) des flavonoïdes de « Extrait ethnolique »

Moyennes des diamètres des zones d'inhibition en mm						
Tests	Antibiotique (témoin Positif)	DMSO (témoin Négatif)	Extrait éthanolique	Dilution (1/2)	Dilution (1/4)	Dilution (1/8)
Souches bactériennes						
E. coli Gram (-)	21mm (+++)	0	16mm (++)	9mm (+)	0	0
	21mm (+++)	0	15.5mm (++)	8.5mm (+)	0	0
Moyenne	21mm (+++)	0	15.75mm (++)	8.75mm (+)	0	0
P.aeuginosa Gram (-)	12mm (+)	0	14mm (+)	10mm (+)	0	0
	11.5mm (+)	0	13.5mm (+)	9.5mm (+)	0	0
Moyenne	11.75mm (+)	0	13.75mm (+)	9.75mm (+)	0	0
S. aureus Gram (+)	22mm (+++)	0	10mm(+)	9mm (+)	7mm (-)	0
	21mm (+++)	0	9mm(+)	8.5mm (+)	6mm (-)	0
Moyenne	21.5mm (+++)	0	9.5mm (+)	8.75mm (+)	6.5mm (-)	0

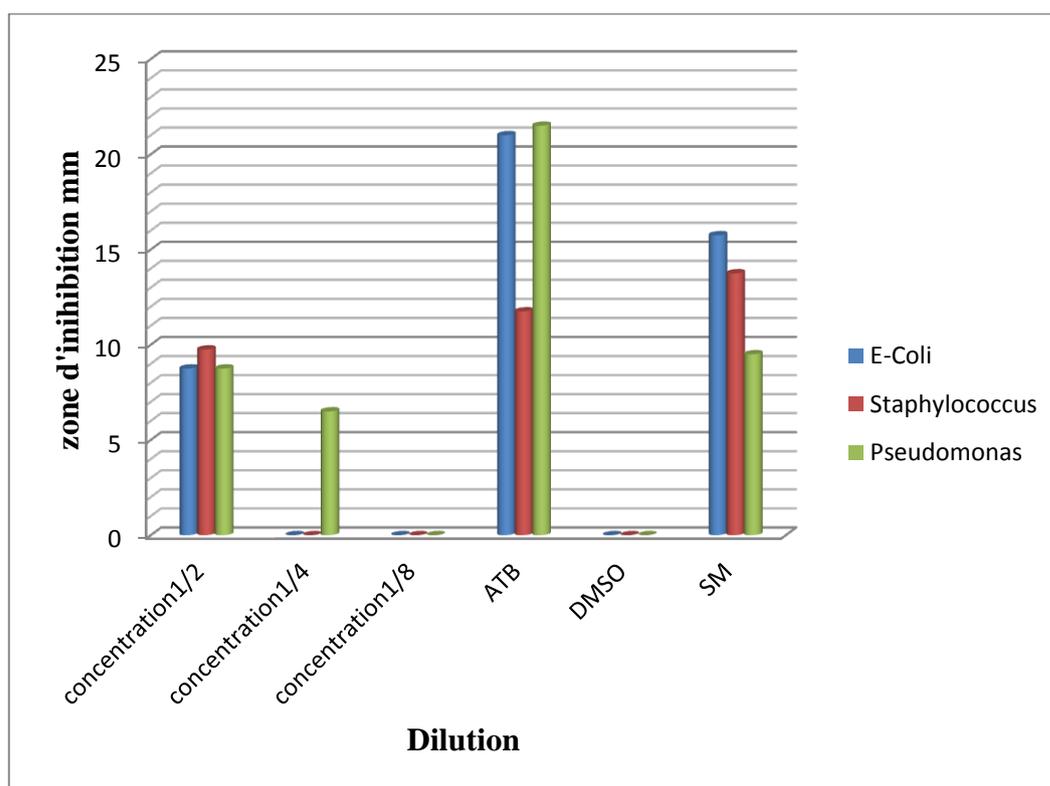
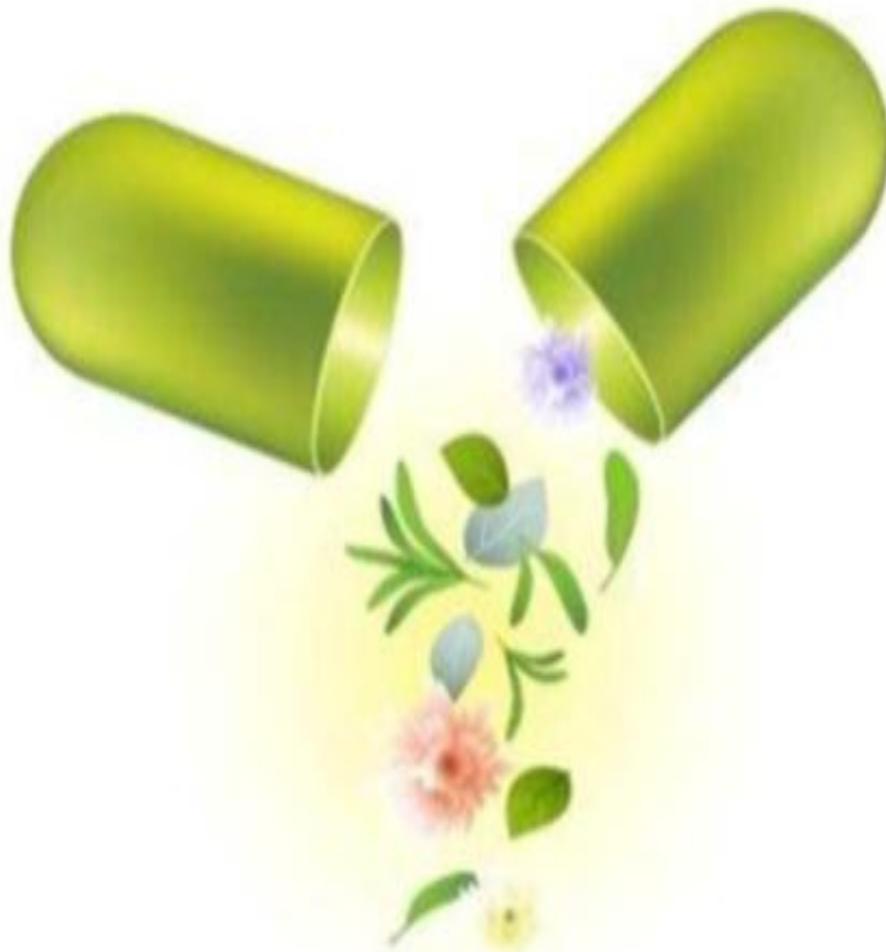


Figure III.9 : Histogramme présent les zones d'inhibition pour toutes les souches bactériennes de l'extrait éthanolique.

Comme le montrent les résultats schématisés par la figure III. 9, l'extrait éthanolique de *lepidium sativum* possède une activité antibactérienne différente contre E-Coli, Staphylococcus et Pseudomonas. Pour la dilution 1/2 nous remarquons que les trois souches sont sensibles, tandis que pour la dilution 1/4, deux souches E-Coli et Pseudomonas sont sensibles par contre la souche Staphylococcus est résistante. On peut également constater que pour l'extrait butanolique, les trois souches E-coli, Pseudomonas, Staphylococcus sont résistantes à la dilution 1/8 de l'extrait éthanolique.

On remarque que le diamètre des zones d'inhibition des antibiotiques utilisés est plus grand (très sensible) que celui de l'extrait éthanolique de *lepidium sativum*.

Le DMSO n'a aucune activité antibactérienne, est totalement absente donc une zone d'inhibition autour de disque imbibé par DMSO.



Conclusion Général

Conclusion Générale

Les plantes médicinales restent toujours la source fiable des principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutiques.

Les résultats obtenus dans ce travail complètent et confortent une démarche scientifique de plus en plus fréquente à savoir, l'établissement de relations entre l'utilisation empirique de plantes dans la médecine traditionnelle et la connaissance scientifique (chimique) de ces plantes.

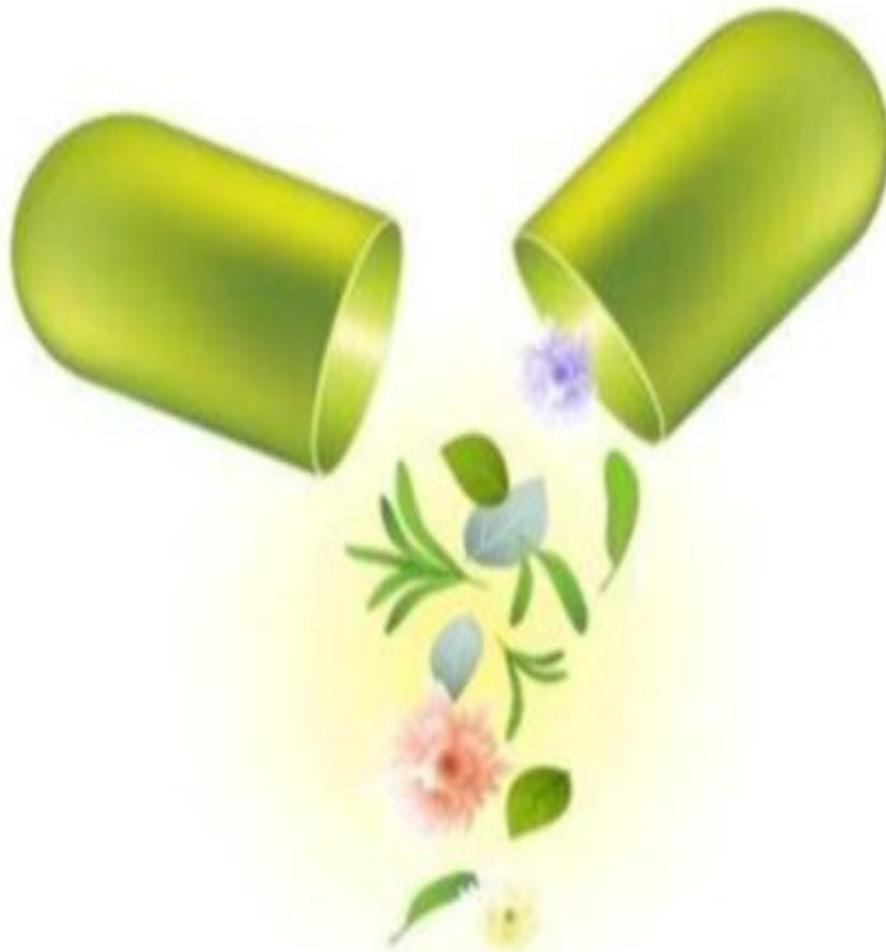
Dans ce contexte, ce travail avait pour but d'étudier l'activité antibactérienne d'une plante médicinale mentionnée par le Messager d'Allah Mohamed (la paix soit sur lui), sous le nom *lepidium sativum* (hab rachad), nous avons abordé à l'isolement des flavonoïdes par deux méthodes d'extraction et l'étude de leur activité antibactérienne.

Lepidium sativum, présente un intérêt direct. L'analyse de leur contenu chimique nous a permis, de caractériser la présence des différentes familles de composés : flavonoïdes, saponosides, tanins, stérols et terpènes, cardénolides.

Après extraction des flavonoïdes en utilisant deux méthodes d'extraction, les rendements obtenus sont 0,03% et 0,6% pour l'extrait butanolique et éthanolique respectivement.

De même que l'activité biologique de flavonoïde de la plante *lepidium sativum* donné un pouvoir antibactérien très important sur *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas*.

A la base du résultat trouvé-t-on peut prédire que nos flavonoïdes peuvent servir comme base de lutte biologique.



Référence
Bibliographiques

Bibliographie

Bibliographie

- [1] : **Z Baidji et H Rekis** ,2004, extraction et analyse des flavonoïdes contenus dans la plante acacia raddiana de la région de béchar, Diplôme d'ingénieur génie chimique , Université Mohamed Khaider Biskra, p 1-17.
- [2] : **Tela Botanica**, 2011. Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela botanica – 2011, p 1, 2,3.
- [3] : <http://www.aujardin.info/plantes/lepidiumsativum.php>.
- [4] : **H Chacha et H Mayou**, 2015, Etude des risques liés à la phytothérapie traditionnelle dans la région de Ouargla, Diplôme de master académique ,Science de la Nature et de la Vie, Université Kasdi Merbah, Ouargla ,p 49,50.
- [5] : **M, Paris, M, Hurabielle**, 1981, Abrégé de matière médicale, pharmacognosie : tome1, préface de R. Paris, p 82,85.
- [6]: **Wadhwa et al., ARPB**, 2012, Advance Research in pharmaceuticals and biological, Journal for pharmaceutical and Allied Research's, p 316-318.
- [7]: مجلة اليقظة , اختصاصي الطب البديل ,فهد البنائي
- [8] : **A Ramelet -A, Monti**, 1990, M, « Phlébologie », Ed .Masson, Paris.
- [9] : **W.Heller et G. Forkmann**,1993. « the flavonoïdes », advances in research since 198 éd. J. Harborne , chapman and Hall, London .
- [10] : **D Khmissi et Massaoud Laggoun**, 2003, extraction et identification des flavonoïdes de l'acacia Raddiana. Diplôme d'ingénieur génie chimique, Université Mohamed Khaider Biskra, p 12-19.
- [11] : **R Gerhard**,1993, « Métabolisme des végétaux »Presses polytechnique et Universitaire Romandes.
- [12] : **H. Grisebach**,1982, “Anthocynins as food colors”, éd. P, Markikis , Academic press ,New York.
- [13] : **D.J. Cram, G.S, Hammond**, 1968, chimie organique Ed. 2, Paris.
- [14] : **J.Adrian, G.Legrand, R. Frangne**, 1981, Dictionnaire de biochimie Alimentaire et de nutrition, Ed. 2. Paris.
- [15]: **J.B.Harborne**, 1965, chimistry and Biochimistry of plant Pigment , Ed .T, W ,Goodwin , p 247.
- [16] : **N Zeghad**. 2008. Etude du contenu poly phénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (*Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*) et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Magister, Université Mentouri Constantine, p 25,26.

Bibliographie

- [17] : **J Adrian** ,1995, hacques potus, Régine, frangne « la science alimentaire de A a Z », lavoisier.
- [18] : **K. Benzahi**, 2001, Contribution a l'étude des flavonoïdes dans la plante cynodn Dactylon-L « chindent », mémoire de Magister. Université d'Ouargla, p 15,17.
- [19] : **N. Chaouch**, 2001, Etude des alcaloïdes dans le coloquinte *Colocynthis vulgaris* (L) Schrad(cucurbitacées) Région de Oued N'sa Wilaya de Ouargla. Mémoire de Magister. Université d'Ouargla, p 44.
- [20] :**J.B. Harborne**, 1973, flavonoides in photochemistry, Organic metabolites, Edited By .M.Miller, p 2.
- [21] : **C Chanvallon ., Blanche maison P, Cance-Sanchez** ,1994,B « les flavonoïdes », Act Med Angiologie .
- [22] : **S.Baldira** , 1981, « Medicinal plant », Egyptian Dar Elkhoto.
- [23] : **S. A. Ghazanfar**,1994, “CRC Hand book of Arabian medicinal plants”, CRC press Inc, Bocaraton.
- [24] : **Peter H, Raven , Ray F-Evert , Susane. E Eichhorn**,2000 “ Biologie végétale”, Boeck ,Université .
- [25] : **J. Bruneton**, 1993,“phytochimie et pharmacologie des plantes médicales “,Lavoisier.
- [26] :**P.R.Gayon**, 1968,Les composes phénoliques des végétaux, Ed,Dunot.
- [27] : **J.L. Guichard , L . Cosson, M.Henry**,1985, Abrégé de phytochimie,Ed. Masson
- [28] : **M.N. Gharbeh**,1998, English. H and A.S.Salhab, ”journal of Echnopharmacology”.
- [29] : **N.Cheymol, M. Hoff** , 1999, “La Microchimie technique et experiences”,Paris.
- [30] :**M.chavane,A. jullien,G.Odernant, G.J. Beaudoin, E.Flamand,C.Taniellan**,1991, « chimie organique expérimentale » ,deuxième edition, canada.
- [31] : **F Berkshiri**, 2015, Etude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Rosmarinus officinalis* L, Mémoire Master Génie Chimique, Université Mohamed Khider-Biskra, p28, 29, 30.
- [32] : **K Dhahoua**, 2016, L'étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Thymus vulgaris* et Menthe verte. Mémoire Master Génie Chimique, Université Mohamed Khider- Biskra, p 26, 27, 28,29.
- [33] : **Nauciel**, 2000, C.Bactériologie médicale. Masson (Ed).Paris, p276.
- [34] : **Avril**, 2000, J, L, Dabernat, H, Denis, F, Montiel, H, Bactériologie clinique. 3^{eme} Edition Ellipses (Ed) Paris, p 602.
- [35] : **Ponce A.G**, 2003, Fritz R, del Valle C.E. Roura S.I . Antimicrobial activity of senschaft und- Technologie, p 679,684.

Bibliographie

[36] : **C.Alis, G.Linden**, 1997, Biochimie Alimentaire ,Ed, Masson paris, p 4.

[37] : **R Gerhard**, 1993, « Métabolisme des végétaux » Presses polytechnique et Universitaire Romandes.

Résumé :

Ce travail se concentre sur l'extraction des flavonoïdes de la plante *lepidium sativum* et l'étude de leur activité antibactérienne.

L'analyse phytochimique a révélé la présence de tanins, saponosides, et flavonoïdes.

L'extraction des flavonoïdes a été effectuée par deux méthodes, l'extraction traditionnelle et par soxhlet. Les valeurs de rendements obtenues de l'extrait éthanolique et butanolique sont 0,6% et 0,03% respectivement.

Les résultats de l'activité antibactérienne vis-à-vis de trois bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas*) par la méthode de diffusion sur disque (technique de l'aromatogramme); ont montré que les flavonoïdes des deux extraits éthanolique et butanolique de cette plante possèdent un effet inhibiteur contre les bactéries Gram négatif (*P. aeruginosa* et *E. coli*) et relativement inhibiteur contre les bactéries Gram positif (*S. aureus*).

Mots clés : L'activité antibactérienne, extraction, des flavonoïdes, *lepidium sativum*.

Abstract:

This work focuses on the extraction of flavonoids from the watercress plant in *Alenia* and the study of their antibacterial activity.

Phytochemical analysis revealed the presence of tannins, saponosides, and flavonoids.

The extraction of the flavonoids was carried out by two methods, the traditional extraction and by soxhlet. The yield values obtained from the ethanolic and butanol extract are 0.6% and 0.03%, respectively.

The results of the antibacterial activity against three pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) by the disk diffusion method (aromatogram technique); Showed that the flavonoids of the two ethanolic and butanolic extracts of this plant had an inhibitory effect against Gram negative bacteria (*P. aeruginosa* and *E. coli*) and relatively inhibitory against Gram positive bacteria (*S. aureus*).

Keywords: antibacterial activity, extraction, flavonoids, *lepidium sativum*.

ملخص :

لقد قمنا في هذا العمل باستخلاص الفلافونويد من نبتة الثفاء (حب الرشاد) و دراسة نشاطها المضاد للبكتيريا .

يركز هذا العمل على استخراج فلافونيدات من نبات *lepidium sativum* ودراسة نشاطها المضاد للبكتيريا.

كشفت التحليل الكيميائي النباتي وجود كل من التانينات، السابونينات والفلافونيدات.

تم إستخلاص الفلافونويدات بطريقتين، التقليدية و عن طريق soxhlet . قيم المرودود التي تم الحصول عليه لكل من المستخلص الإيثانولي والبيوتانولي هي 0.6% و 0.03% على التوالي.

نتائج النشاط المضاد للبكتيريا ضد ثلاثة انواع من البكتيريا المسببة للأمراض (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*) باستخدام طريقة الانتشار القرصي (aromatogramme)؛ أظهرت أن مركبات الفلافونويد لكل من

المستخلصين الإيثانولي والبيوتانولي لهذا النبات، لها تأثير كايح بشكل خاص ضد البكتيريا سالبة الجرام (*P. aeruginosa* and *E. coli*) ونسبيا ضد البكتيريا إيجابية الجرام (*S. aureus*).

الكلمات المفتاحية: الفعالية البكتيرية. الاستخلاص. الفلافونويد. حب الرشاد. (الثفاء).

