



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
Loubna BOUZAHER

Le : mercredi 10 juillet 2019

Thème

**Contribution à l'étude *-in vitro-*, des activités
biologiques des saponines de
*Chenopodium quinoa Willd.***

Jury :

Mme.	Yamina BOUATROUS	MCA	Université de Biskra	Président
Mr.	AbdelOuahab DEHIMAT	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme.	Randa GAOUAOUI	MCB	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2018 - 2019

Remerciements

*Tout d'abord, louange à « ALLAH » ; le tout puissant, le très
miséricordieux qui m'a donné la santé,
la force, le courage et l'opportunité
de réaliser ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr. DEHIMAT
d'avoir accepté d'être promoteur de ce mémoire.*

*Je le remercie pour sa disponibilité et pour la confiance qu'il
m'a accordé tout en me laissant libre dans mon choix.*

*Mes remerciements s'adressent également aux membres de jury
d'avoir accepté de juger ce travail, notamment
..... (examineur) et
..... (président)*

*Je remercie l'équipe de techniciens du service laboratoire
pour leurs conseils, assistance et aide à cœur ouvert.*

*Mes chaleureux remerciements s'adressent pour toute
personne ayant contribué de près ou de loin
à la réalisation de ce mémoire.*

Dédicace

✍ Avec un grand plaisir, un cœur ouvert et une joie immense, je dédie ce travail à mes chers parents qui m'ont soutenue le long de ma vie et durant cette année surtout pour accomplir ce présent travail... ✍

A mes frères Louai et Younes, mes sœurs Hiba et la petite Douaa.

A l'âme de mes grands-pères si précieuse...

A mes tantes et oncles...

A tous mes cousins et cousines ; grands et petits...

A mes amis de vie : Nihed, Ikhlass, Kahina, Sara, Imène, et Linda...

A mon ami d'enfance : Khalil...

A celui qui m'a encouragé même dans les moments difficiles 🌸...

A toutes les personnes qui me sont chères 😊



Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1
Chapitre 1. <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	3
1.1. Famille des <i>Chenopodiaceae</i>	3
1.2. Aperçu historique	3
1.3. Description botanique et taxonomie	3
1.1. Distribution géographique	5
1.2. Conditions environnementales de culture.....	5
1.3. Valeur nutritionnelle et utilisation culinaire	5
1.6.1. Autres domaines d'application des saponines.....	6
Chapitre 2: Activités biologiques des saponines	7
2.1. Rôle pharmacologique des saponines	7
2.1.1. Activité antimicrobienne	7
2.1.2. Effet immuno-modulateur et anti-inflammatoire	7
2.2. Toxicité des saponines.....	8
2.2.1. Pouvoir hémolytique.....	8
2.3. Mode d'action des saponines sur les biomembranes	8
Chapitre 3: Matériel et méthodes	10
3.1. Matériel.....	10
3.1.1. Appareillage et réactifs	10
3.1.2. Matériel végétal	10
3.1.3. Matériel biologique.....	10
3.2. Méthodes	11
3.2.1. Extraction	11
3.3. Tests des activités biologiques <i>-in vitro-</i>	12
3.3.1. Test de l'activité antimicrobienne	12
3.3.2. Effet de l'inhibition de la dénaturation du BSA	13
3.3.3. Test du pouvoir hémolytique.....	14
3.4. Analyse statistique	15
Chapitre 4: Résultats et discussion	16

4.1. Rendement d'extraction.....	16
4.2. Résultats du dosage	16
4.3. Résultats du test de l'activité antimicrobienne	17
4.3.1. Technique de diffusion en milieu gélosé (sans traitement alcalin des extraits)	17
4.3.2. Technique de dilution en milieu liquide (avec traitement alcalin des extraits).....	18
4.4. Résultat de l'inhibition de la dénaturation du BSA	20
4.5. Résultat du test du pouvoir hémolytique	21
Conclusion	24
Références	26
Annexes	31

Liste des tableaux

Tableau 1. Position taxonomique de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	4
Tableau 2. Souches bactériennes et fongiques utilisées.	11
Tableau 3. Poids des extraits secs de <i>Chenopodium quinoa</i> et rendement d'extraction.	16
Tableau 4. Valeurs des CMI des extraits sur les souches microbiennes testées.	18
Tableau 5. Résultats de l'inhibition de la dénaturation du BSA.	20

Liste des figures

Figure 1. Grains de <i>Chenopodium quinoa</i> / Structure la graine de <i>C. quinoa</i>	4
Figure 2. Distribution géographique du quinoa.	5
Figure 3. Structure générale d'une saponine.	8
Figure 4. Interaction d'une SM avec les biomembranes.	9
Figure 5. Photographies originales de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	10
Figure 6. Teneur en saponines totales des extraits de <i>Chenopodium quinoa</i> .	17
Figure 7. Pourcentage d'hémolyse des extraits de <i>Chenopodium quinoa</i> .	22

Liste des abréviations

Aq : Aqueux.

ATCC : American Type Culture Collection.

BGT : Bouillon glucosé tamponné.

BMH : Bouillon Mueller Hinton.

BSA : Bovine Seric Albumin.

BuOH : n-Butanol.

CHU : Centre hospitalo-universitaire.

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DG : Déosgénine.

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

EA : Extrait Aqueux

EB : Extrait butanolique

EM : Extrait méthanolique.

EPH : Etablissement Public Hospitalier.

EUCAST : European Universal Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

FAO : Food and Agriculture Organization.

GN : Gélose nutritive.

ILSI : International Life Sciences Institute.

ITDAS : Institut Technique de Développement de l'Agriculture Saharienne.

MeOH : Méthanol.

MH : Gélose de Mueller Hinton.

PDA : Potato Dextrose Agar.

PBS : Phosphate buffer saline.

rpm : Rotations par minute.

SB : Saponine bidesmosidique.

SM : Saponine monodesmosidique.

UFC : Unité formant colonie.

Introduction

L'être humain participe inconsciemment dans le développement des armes biologiques qui sont même plus dangereuses que les armes nucléaires ou chimiques. Ces armes biologiques n'exigent aucune technologie ou moyens de transports sophistiqués pour se déplacer d'un lieu à un autre ; les microbes, responsables des maladies infectieuses les plus graves qui peuvent coûter la vie de l'homme. Les bactéries en font une très grande partie.

L'évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques représente un danger énorme de santé publique, à cause de l'automédication et l'usage abusif et inconscient des antibiotiques. D'ailleurs, une connaissance et une conscience accrues des problèmes associés à l'utilisation d'antibiotiques stimulent les efforts de recherche visant à identifier des alternatives à leur utilisation (Hassan *et al.*, 2010).

L'inflammation chronique constitue également un problème commun nécessitant la prise régulière de médicaments anti-inflammatoires.

Néanmoins, il faut signaler que la principale contrainte des médicaments anti-inflammatoires commercialisés consiste en leurs effets secondaires indésirables, en particulier l'ulcération. Dans ce contexte, les recherches pour de nouveaux composés anti-inflammatoires portent un intérêt particulier aux produits d'origine végétale (Herbillon, 2015).

Les plantes médicinales, connues par leurs métabolites secondaires, notamment pour leur défense contre les agents externes, représentent un moyen de soin efficace de plusieurs maladies chez l'homme.

Or, on ne peut pas aussi négliger le volet négatif de l'utilisation des plantes médicinales car certaines plantes utilisées pour leurs bienfaits peuvent, à fortes doses, présenter une certaine toxicité pour l'homme (Haddouchi *et al.*, 2016).

L'étude de la toxicité d'une plante est une étape cruciale lors de l'étude de ses activités pharmacologiques en particulier l'évaluation de la dose toxique et létale (Rolland, 1988).

La recherche de nouvelles molécules bioactives plus puissantes, moins toxiques pour l'homme et surtout d'origine naturelle s'est avérée nécessaire et fait actuellement l'objet de plusieurs études.

Avec des produits naturels figurant parmi les produits pharmaceutiques les plus utilisés et les plus vendus aujourd'hui, soit sous leur forme originale, soit en tant que dérivés étroitement apparentés, ils constituent un choix logique en tant que nouveaux médicaments pour l'avenir (Oleszek et Marston, 2013).

De ce faire, la plante choisie est *Chenopodium quinoa* Willd. Une plante très riche en métabolites secondaires, et surtout en saponines qui en font la majorité.

L'objectif majeur de ce travail s'articule autour de la détermination de quelques actions de ces saponines par leur dosage et le test de leurs activités biologiques *-in vitro-*.

Ce présent mémoire est divisé en deux parties :

- La première partie est consacrée pour un aperçu bibliographique abrégé de *Chenopodium quinoa* Willd.
- La deuxième partie rapporte les méthodes suivies, les principaux résultats obtenus et la discussion qui leur est correspondante.

Partie
Bibliographique

- **Chapitre 1**
- ***Chenopodium quinoa* Willd.**

1.1. Famille des *Chenopodiaceae*

Les *Chenopodiaceae* constituent une grande famille qui comprend environ 1500 espèces réparties dans une centaine de genres (FAO, 2015), poussant dans les régions tempérées et subtropicales du monde entier. Il s'agit principalement de plantes herbacées vivaces ou annuelles, plus rarement d'arbres et d'arbustes (Kothe-Hans, 2007), qui sont généralement halophytes (Gomez-Caravaca *et al*, 2012).

Parmi les genres inclus dans cette famille, on mentionne : *Atriplex*, *Cycloloma*, *Suaeda*, *Salicornia* et *Chenopodium* (Oullette, 2004).

Le quinoa appartient au genre *Chenopodium*, qui présente une large distribution mondiale et dont le nombre d'espèces n'a cessé d'évoluer au cours de la domestication des cultures (modifications morphologiques et physiologiques dues à l'environnement, sélection de nouvelles variétés, manipulations génétiques...) (Herbillon, 2015).

1.2. Aperçu historique

Le quinoa a été identifié la première fois en 1778 par le botaniste Willdenow (FAO, 2011). Ses fruits jouaient autrefois un rôle très important en tant que féculent dans l'alimentation des Incas, peuple des Andes sud-américaines. Ils l'appelaient d'ailleurs « chisiya mama » qui signifie en quechua « mère de tous les grains » (Herbillon, 2015).

A l'époque de la découverte de l'Amérique, elle fut également cultivée dans les plaines où l'orge et d'autres céréales l'ont aujourd'hui remplacée (Kothe-Hans, 2007). Les grains étaient fermentés aussi pour produire de la bière ou des breuvages alcoolisés (Bhargava *et al*, 2006 ; Kothe-Hans, 2007 ; FAO, 2011).

Aujourd'hui, certains pays tels que le Pérou, la Bolivie, le Chili, l'Équateur, la Colombie et l'Argentine ont élargi la production de cette pseudo-céréale en mettant l'accent sur le grand intérêt technologique et commercial, non seulement pour la nutrition humaine, mais aussi en raison des rejets de sous-produits offrant de bonnes alternatives nutritionnelles pour l'alimentation animale. Ainsi que des applications dans l'industrie pharmaceutique (Miranda *et al.*, 2011).

1.3. Description botanique et taxonomie

Chenopodium quinoa Willd. (abrégé *C. quinoa*), de la famille des *Chenopodiaceae* (tab 1.) est une plante herbacée annuelle de 1–2 m de haut, avec une inflorescence brillante. Le style à deux ou trois stigmates plumeux. Les graines plates dont la figure 1 montre leur structure

(environ 2,5 mm de long et 1,0 mm de diamètre) sont jaunes, rouges, brunes et noires, tandis que les téguments ont une couleur brune (Kuljanabhagavad et Wink, 2009). Le système racinaire est développé et hautement ramifié (Bhargava *et al.*, 2006).

Tableau 1. Position taxonomique de *Chenopodium quinoa* Willd. (FAO, 2015).

Règne	Plantae
Division	Phanerogams
Classe	Dicotyledonous
Sous-classe	Angiosperms
Ordre	Centrospermae
Famille	Chenopodiaceae
Genre	<i>Chenopodium</i>
Section	<i>Chenopodia</i>
Sous-section	<i>Cellulata</i>
Espèce	<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.

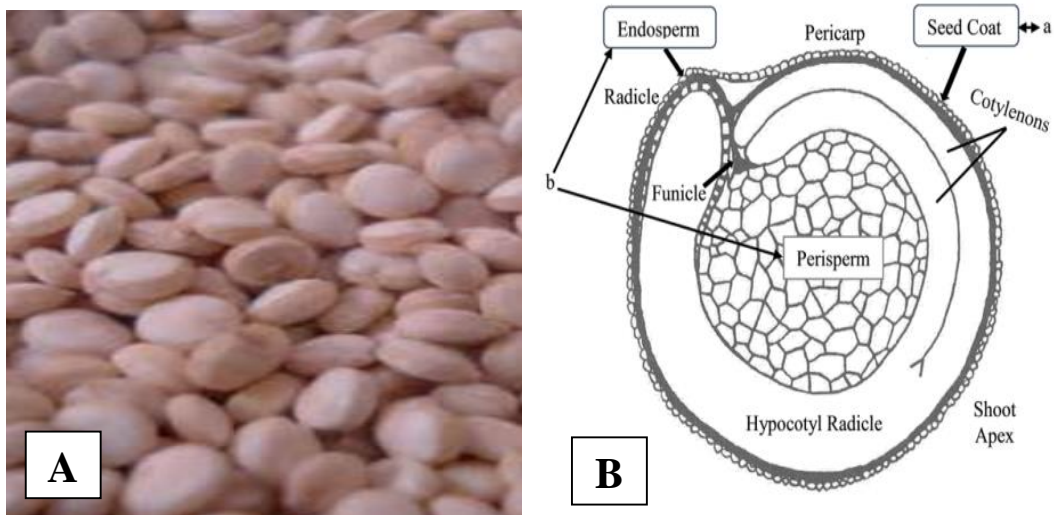


Figure 1. A : Grains de *Chenopodium quinoa* (Tang et Tsao, 2017).

B : Structure la graine de *C. quinoa* (FAO, 2015).

1.1. Distribution géographique

Selon FAO (2012), la répartition géographique du quinoa va de 5° de latitude nord au sud à 43° de latitude sud (Colombie, Équateur, Pérou, Bolivie, Argentine et Chili). A savoir qu'en 2010 l'altiplano, sud Bolivien est devenu le plus grand exportateur de quinoa du monde (Vassas et Vieira Pak, 2010).

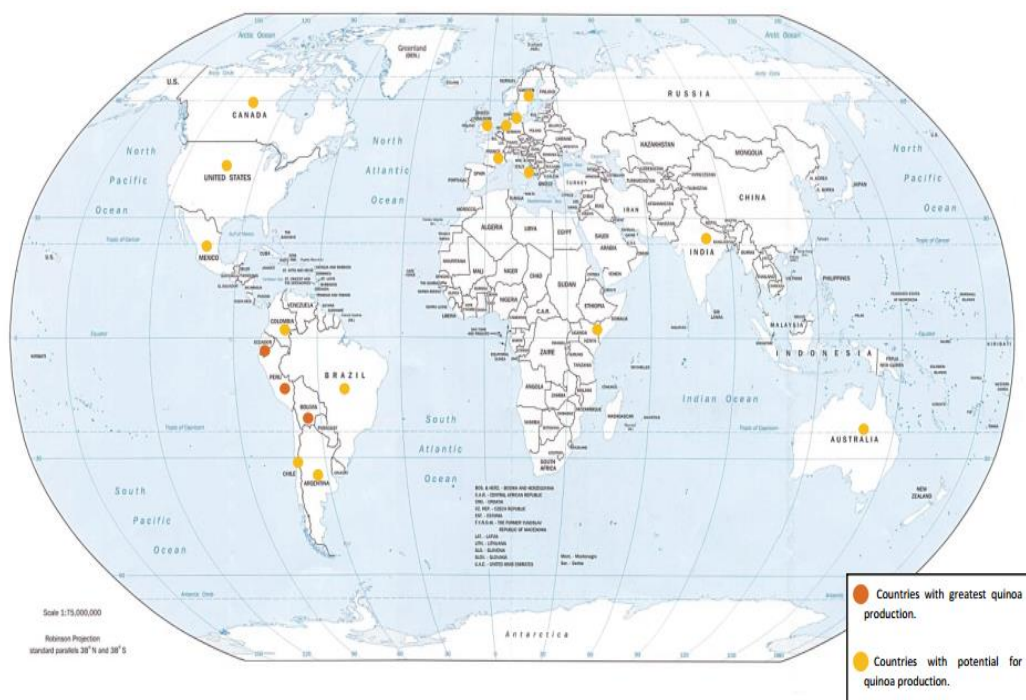


Figure 2. Distribution géographique du quinoa (FAO, 2011).

1.2. Conditions environnementales de culture

Le quinoa est capable de se développer dans des conditions climatiques sévères. C'est une culture tolérante à des conditions stressantes telles que la sécheresse, les sols salés et le froid (Gómez-Caravaca *et al.*, 2012). Il supporte des températures de -4 °C à 38 °C (Villa *et al.*, 2014). Des températures supérieures à 38 °C, conduisent à la dormance du quinoa ou la stérilité du pollen (Oelke *et al.*, 1992).

1.3. Valeur nutritionnelle et utilisation culinaire

Les grains de quinoa contiennent des glucides, des protéines de haute qualité, un spectre équilibré et concentrations raisonnables d'acides aminés essentiels, particulièrement en lysine (Yao *et al.*, 2014 ; Elsohaimy *et al.*, 2015). Une composition importante de vitamines B1, B2, B3 et E (Miranda *et al.*, 2011). Le « chisiya mama » ; en le comparant avec les grains traditionnellement appelés les grains dorés (blé, riz et maïs), contient une teneur en protéines, en graisses et en cendres supérieure à ceux de ces trois grains (FAO, 2012). Bien que cet aliment

soit dépourvu de gluten, il représente le meilleur choix pour les malades de cœliaque et régule le métabolisme énergétique pour prévenir l'obésité (Foucault, 2012 ; Tang et Tsao, 2017 ; Gil-Ramirez *et al.*, 2018).

Les graines sont grillées et transformées en farine pour la préparation de pains. Elles peuvent aussi être cuites, ajoutées aux soupes, cuisinées comme des céréales ou sous forme de pâtes (Bhargava *et al.*, 2006). Alors que les feuilles, sont consommées de la même façon que les épinards, soient cuites ou crues telle une salade (Oelke *et al.*, 1992).

1.6.1. Autres domaines d'application des saponines

Les saponines trouvent également de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et dans l'industrie cosmétique en raison de leur propriété moussante et émulsifiante (Manase, 2013).

Il est également à savoir que l'Algérie a célébré l'événement de la journée mondiale de consommation du quinoa le 7 Juillet 2019 à la ferme pédagogique de Zéralda sous la supervision de l'ITDAS -Biskra- ; en assistance de l'Ambassadeur de Pérou en Algérie et à l'honneur des malades de cœliaques (Saada, 2019).

- Chapitre 2
- Activités biologiques des
saponines

2.1. Rôle pharmacologique des saponines

2.1.1. Activité antimicrobienne

La prescription médicale inappropriée d'antibiotiques mène à l'apparition de bactéries multi-résistantes ce qui rend important d'orienter les recherches à la découverte de nouveaux produits à base de plantes (Cowan, 1999).

Les saponines de *C. quinoa* sont avant tout localisées dans la couche externe de la graine, notamment le péricarpe (Herbillon, 2015). Elles confèrent aux grains un goût amer, ce qui nécessite une réduction par des procédés abrasifs ou un lavage avant la consommation (Laus *et al.*, 2012). Cependant elles ont été reportées pour leur activité antimicrobienne (Kuljanabhagavad et Wink, 2009). Les enquêtes sur les activités biologiques et pharmacologiques des saponines de *C. quinoa* montrent une inhibition de la croissance des champignons et des virus, ses extraits sont utilisés en agriculture pour le contrôle et la prévention des maladies fongiques et virales qui touchent les plantes (Villa *et al.*, 2014), un effet contre *Botrytis cinerea* par exemple, agent causal de la moisissure grise des fruits (Stuardo et San Martín, 2008). On a signalé que le mélange de saponines totales de quinoa avait une activité contre les levures (Woldemichael et Wink, 2001). Des concentrations plus élevées peuvent complètement lyser les champignons et les bactéries (Wink, 2015).

2.1.2. Effet immuno-modulateur et anti-inflammatoire

La consommation des médicaments anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens habituellement utilisés pendant de longues périodes provoque des effets secondaires indésirables ou une toxicité, tels que des risques cardiovasculaires ou des troubles gastro-intestinaux (Ahumada *et al.*, 2016).

Les saponines de quinoa exercent divers effets pharmacologiques, notamment une activité de protection cardiovasculaire, des effets anti-inflammatoires et immuno-régulateurs. De plus, des études récentes ont montré que les saponines présentent une activité anticancéreuse significative, telle que l'anti-prolifération et l'antimétastase (Xu XH *et al.*, 2016). Les propriétés anticancéreuses des saponines d'extraits de feuilles du quinoa ont été récemment étudiées par Gawlik-Dziki *et al.* (2013).

Les saponines de *C. quinoa* pourraient être utilisées pour la prévention et le traitement de l'inflammation. Elles représentent un avantage thérapeutique majeur dans plusieurs maladies provoquées par des taux pathologiques de NO « nitrite oxyde », résultat de la promotion de l'inflammation, la carcinogénèse ou l'athérosclérose (Herbillon, 2015 ; Wink, 2015).

D'après Estrada *et al.* (1998), les saponines du quinoa possèdent aussi un potentiel pour agir comme adjuvants pour les vaccins administrés par voie muqueuse, intra-gastrique ou intranasale chez la souris et l'administration simultanée des saponines avec la toxine cholérique ou de l'ovalbumine a intensifié les réponses d'anticorps spécifiques IgG et IgA contre les antigènes dans le sérum.

2.2. Toxicité des saponines

2.2.1. Pouvoir hémolytique

Les saponines possèdent une activité hémolytique importante. Elles agissent comme des détergents et peuvent lyser les biomembranes (Kuljanabhagavad et Wink, 2009). A des concentrations élevées les érythrocytes sont totalement lysés libérant ainsi l'hémoglobine (Wink, 2015).

2.3. Mode d'action des saponines sur les biomembranes

Quatre aglycones différents des saponines du quinoa ont d'abord été mis en évidence : l'acide oléanolique, majoritaire dans les grains, l'acide phytolaccagénique, l'hédéragénine et l'acide serjanique (Herbillon, 2015).

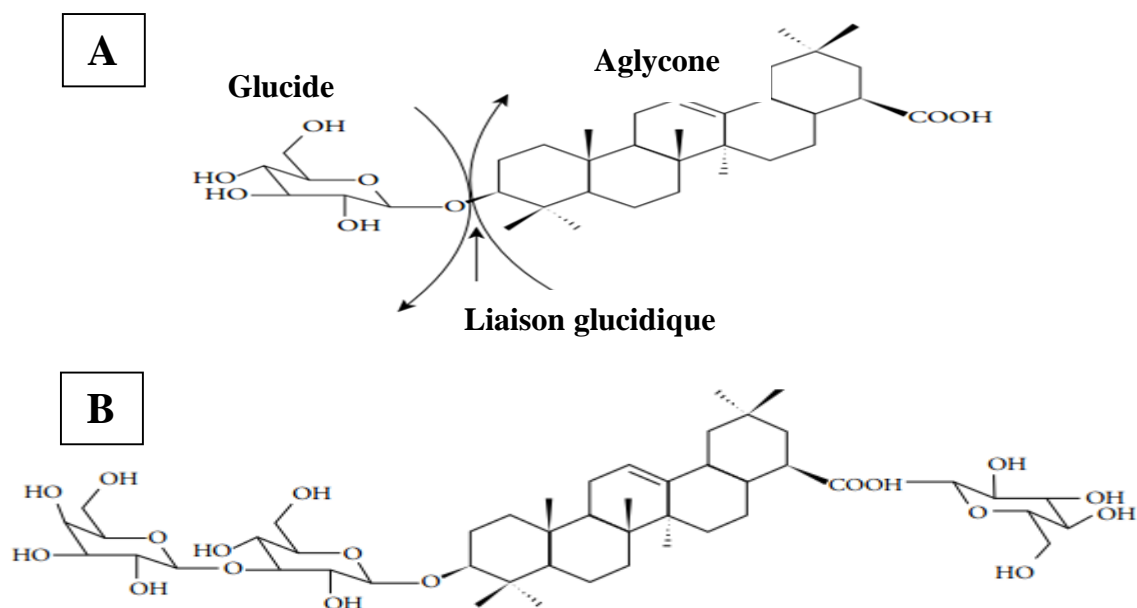


Figure 3. Structure générale d'une saponine.

A : Saponine monodesmosidique ; **B :** Saponine bidesmosidique (Ahumada *et al.*, 2016).

Les saponines monodesmosidiques SM (avec une seule chaîne glucidique) (figure 3 A) peuvent plonger dans la biomembrane avec leur chaîne lipophile complexant le cholestérol, alors que leur chaîne glucidique hydrophile se lie aux glycoprotéines et aux glycolipides

extracellulaires (figure 4), Ce qui en résulte une perturbation de la fluidité et la perméabilité des biomembranes (Francis et *al.*, 2002 ; Patra et Saxena, 2009).

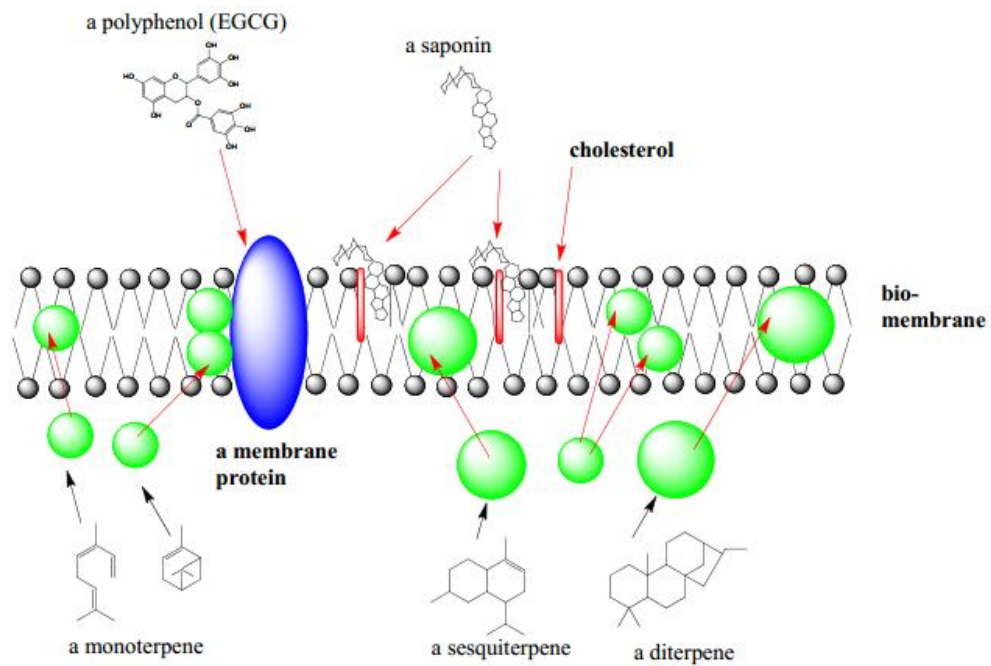


Figure 4. Interaction d'une SM avec les biomembranes (Wink, 2015).

Les saponines bidesmosidiques SB (avec deux chaînes glucidiques) (Figure 3B) ne peuvent pas interagir de la même manière avec la biomembrane et sont donc généralement moins toxiques (Wink, 2015).

Partie Expérimentale

- Chapitre 3
- Matériel et méthodes

3.1. Matériel

3.1.1. Appareillage et réactifs

Les appareils et les réactifs utilisés pour la réalisation de cette partie sont mentionnés dans Annexe 1.

3.1.2. Matériel végétal

La plante *Chenopodium quinoa* étudiée, est bien connue sous le nom quinoa, ses grains utilisés comme aliment remplaçant les céréales, ses feuilles sont mélangées avec les salades ou encore consommées comme tisanes et les panicules de fleurs sont plutôt décoratives (Figure 5). L'étude est bien basée sur les grains.

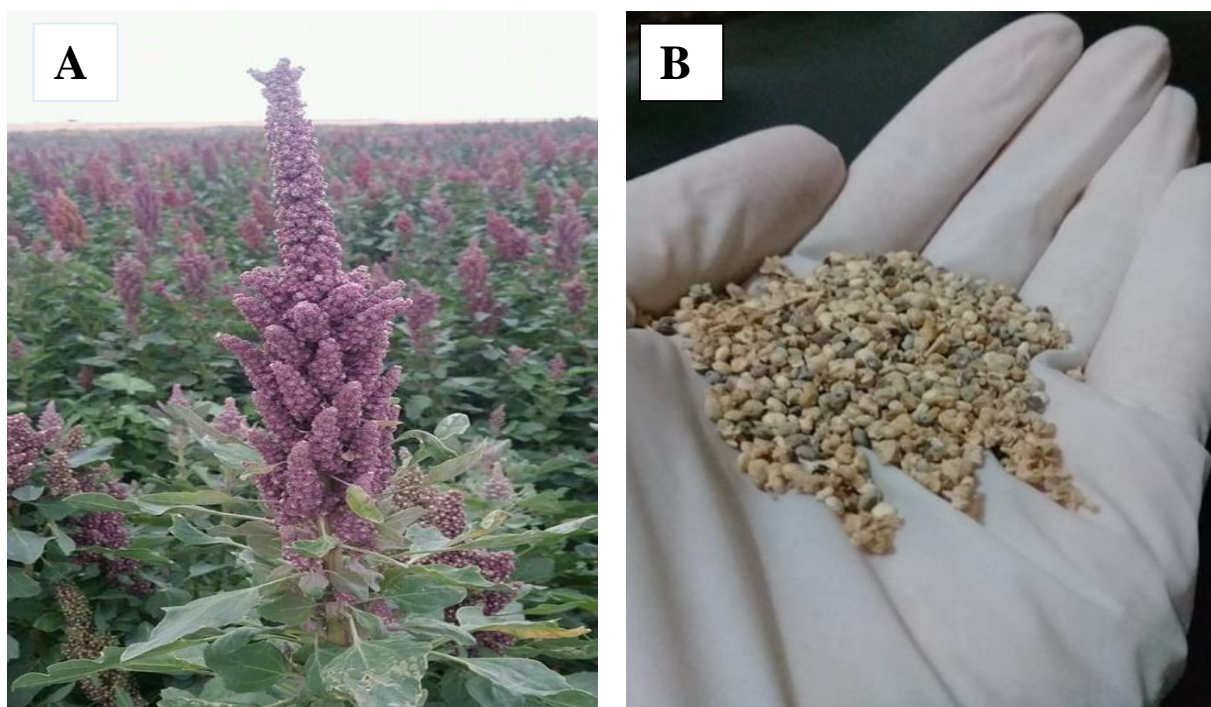


Figure 5. Photographies originales de *Chenopodium quinoa* Willd.
A : plante entière ; B : grains.

3.1.3. Matériel biologique

Les souches bactériennes et fongiques utilisées pour le test de l'activité antimicrobienne, obtenues de l'EPH Hakim Saadan –Biskra- et du CHU Benflis Touhami –Batna- sont énumérées dans le tableau suivant (tab 2.)

Tableau 2. Souches bactériennes et fongiques utilisées.

Souches bactériennes		Souches fongiques
Gram-positives	Gram-négatives	
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>Esherichia coli</i> ATCC 25922	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 5923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Candida albicans</i> clinique

ATCC : American Type Culture Collection

3.2. Méthodes

3.2.1. Extraction des saponines

3.2.1.1. Extraction méthanolique

L'extraction des saponines a été réalisée selon la méthode de Goel *et al.* (2012) avec quelques modifications. A 40 grammes de poudre de grains, 400 ml de mélange méthanol/eau de pourcentage (V/V) (75%/25%), respectivement. L'ensemble est mis sous agitation à température ambiante pendant 72h, cette opération est répétée deux fois, suivie d'une centrifugation à 4500 rpm pendant 10 minutes.

Le surnageant a été filtré en utilisant le papier de wattman, délipidé à l'n-hexane d'un ratio (V/V) trois fois par décantation. La phase méthanolique (aqueuse) est récupérée et évaporée au rotavapeur à 45 °C, l'extrait sec de l'échantillon a été redissout dans de l'eau distillée puis extrait de nouveau avec le n-butanol (trois fois).

3.2.1.2. Extraction aqueuse

L'extrait aqueux a été préparé selon la méthode de Estrada *et al.* (1998). La poudre de *C. quinoa* est mélangée avec de l'eau distillée, mise sous agitation à 60 °C pendant 24h, filtré et évaporé à sec à 45 °C.

Les poudres issues après l'évaporation des solvants et de l'eau sont conservées à 4 °C sont utilisées pour les différents tests.

Le rendement d'extraction est calculé selon la formule suivante :

$$R \% = \frac{\text{Poids d'extrait sec}}{\text{Poids de poudre d'échantillon}} \times 100$$

3.2.1.3. Dosage des saponines totales

La méthode utilisée pour le dosage des saponines totales est celle de Shiao *et al.* (2009). 50 µl de solution aqueuse de chaque extrait (dissout dans l'éthanol) est rajoutée de 250 µl de vanilline à 8%. Les tubes sont placés dans un bain d'eau glacée, rajoutés de 2,5 ml de l'acide sulfurique à 72% délicatement dans la paroi, vortexés, incubés pendant 3 minutes et portés au bain marie à 60 °C pendant 10 minutes puis refroidis. L'absorbance est mesurée à 544 nm contre un blanc de réactifs (éthanol + vanilline 8% + acide sulfurique 72%).

Le calcul des concentrations a été réalisé selon une courbe d'étalonnage réalisée par la Déosgénine (une saponine stéroïdienne) mentionnée dans Annexe 2.

3.3. Tests des activités biologiques *-in vitro-*

3.3.1. Test de l'activité antimicrobienne

3.3.1.1. Sans traitement alcalin des extraits

En appliquant la technique de diffusion en milieu gélosé, on procède aux étapes suivantes :

a). Revivification et pré-culture des souches microbiennes

Les souches bactériennes et fongiques ont été revivifiées dans le BGT pendant 2h puis repiquées :

- Pour les bactéries : sur GN, incubées à 37°C pendant 24h.
- Pour les levures : sur PDA, incubées à 28°C pendant 72h.

b). Préparation et standardisation des inocula

Après incubation, des colonies bien isolées sont prélevées de chaque pré-culture et transmises dans des tubes en verre stériles contenus de l'eau physiologique stérile. Les inocula sont standardisés à 0,5 McFarland (1×10^8 UFC/ml) en utilisant un spectrophotomètre. L'absorbance est située entre 0,08 et 0,13 à 600 nm.

c). Procédure à l'aromatogramme

- Un écouvillon en coton stérile est plongé dans la suspension bactérienne, l'excès de liquide est éliminé en tournant l'écouvillon sur les parois du tube.
- La gélose estensemencée par écouvillonnage sur la totalité de sa surface dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.

- Les disques sont fermement déposés à la surface de la gélose inoculée et séchée. Incubation à 35 ± 2 °C pendant 20 ± 4 h.

Le protocole détaillé de l'aromatogramme selon les recommandations de EUCAST (2018) est mentionné dans Annexe 3.

3.3.1.2. Avec traitement alcalin des extraits

Le traitement alcalin des saponines brutes ou totales a pour objectif d'obtenir plus de dérivés hydrophobes de saponines (conversion des saponines bidesmosidiques SB en SM plus actifs) (San-Martín *et al.*, 2008).

Les extraits à 64 mg/ml de saponines ont été mis en contact avec NaOH 1N d'un ratio 1 / 2,5 pendant 2 h avec agitation, puis rajouté du HCl à 37% pour amener l'extrait à pH 7. Ces conditions permettent de maximiser la formation de dérivés hydrophobes de saponines (Stuardo et San-Martín, 2008).

Cette fois-ci, l'utilisation de la technique en milieu liquide est utilisée, à la fois, pour la mise en évidence de la présence ou l'absence de l'activité antimicrobienne et pour déterminer ainsi la CMI. Cette technique est appliquée selon les recommandations de CLSI (2018) (voir annexe 4) avec quelques modifications.

- Les inocula sont standardisés à $1,5 \times 10^5$ UFC/ml.
- Une série de dilution de l'extrait à tester est réalisée dans des tubes en verre stériles.
- Le même volume de l'inoculum standardisé est rajouté à tous les tubes. Incubation à 35 ± 2 °C pendant 20 ± 4 h.

3.3.2. Effet de l'inhibition de la dénaturation du BSA

La méthode appliquée est celle de Karthik Ikattu *et al.* (2013) dont le principe repose sur l'inhibition de la dénaturation du BSA par les extraits du quinoa sous l'effet de la chaleur (72 °C).

- **Préparation des extraits**

Différentes concentrations d'extraits du quinoa sont préparées à partir d'une solution mère de 800 µg/ml.

- **Préparation des blancs**

a- Pour chaque concentration d'extrait un blanc extrait est préparé ; dans lequel 500 µl d'extrait est ajouté à 500 µl de Tris-HCl pH 6,6 (Ce blanc a pour but de soustraire l'absorbance de l'extrait des résultats obtenus).

b- un blanc BSA contenant 1 ml de la solution de BSA ajouté à 1 ml du solvant Tris-HCl (le résultat obtenu correspond à la dénaturation totale du BSA en absence de substance inhibitrice).

500 µl de chaque concentration d'extrait ou du standard est rajouté de 500 µl de la solution de BSA à 0.2% préparée dans le Tris-HCl suivie d'une incubation à 37 C° pendant 15 min, puis dans un bain marie à 72°C pendant 5 min. L'absorbance est mesurée à 660 nm. Les calculs sont réalisés selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition \%} = A \text{ Blanc BSA} - \frac{(R - A \text{ blanc extrait})}{A \text{ Blanc BSA}} \times 100$$

R : pour Réaction (Extrait + BSA).

3.3.3. Test du pouvoir hémolytique

Ce test repose sur l'évaluation du degré d'hémolyse des érythrocytes humains en présence de différentes concentration d'extraits (Murugesh *et al.*, 1981).

La méthode suivie est celle de Haddouchi *et al.* (2016). Le sang prélevé dans des tubes d'héparine à partir d'un donneur sain (femelle / 24 ans) est utilisé pour préparer la suspension érythrocytaire. Il est centrifugé à 2500 rpm durant dix minutes et, après élimination du plasma, le culot est lavé deux fois par du PBS pH 7,4, puis suspendu à nouveau dans ce même volume de plasma éliminé. La suspension érythrocytaire, ainsi obtenue, est diluée 20 fois par le PBS.

Dans des tubes à hémolyse, 20 µl de chaque extrait à différentes concentrations sont ajoutés à 1980 µl de la suspension érythrocytaire préparée. Ces tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 1 heure. Après l'incubation, les tubes sont mis dans un bain d'eau glacée pour arrêter la réaction, centrifugés à 2500 rpm durant 10 minutes. L'absorbance est mesurée à 548 nm contre un blanc contenant du PBS. Dans les mêmes conditions et les mêmes démarches expérimentales, nous avons préparé :

-un tube d'hémolyse totale contenant 100 µl de la suspension érythrocytaire + 1900 µl de l'eau distillée.

-un tube témoin négatif contenant 250 µl de la suspension érythrocytaire + 750 µl du PBS.

Le taux d'hémolyse est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse \%} = \frac{(A \text{ extrait} - A \text{ témoin négatif})}{A \text{ témoin positif}} \times 100$$

3.4. Analyse statistique

Les tests ont été réalisés en triplicatas et les résultats ont été exprimés sous forme moyenne ± écart type. Le test analyse de variance (ANOVA) a été fait par le logiciel Excel 2013 Microsoft. Les résultats sont considérés comme significatives lorsque (p<0.05).

- Chapitre 4
- Résultats et discussion

4.1. Rendement d'extraction

40 grammes de poudre de grains de *Chenopodium quinoa* a donné (tab. 3) :

Tableau 3. Poids des extraits secs de *Chenopodium quinoa* et rendement d'extraction.

Extrait	Aspect / Couleur	Extrait sec	Rendement
Méthanolique	Pâteux /marron	4,3 g	10,75%
Aqueux	Cristaux /marron	3,8 g	9,5%
Butanolique	Poudre /blanchâtre	0,68 g	1,7%

L'extrait méthanolique (EM) a donné un bon rendement de 10,75%, par rapport à l'extrait aqueux (EA) et butanolique (EB) avec 9,5% et 1,7% respectivement (Tab.1), ce qui prouve que le méthanol est le meilleur solvant d'extraction des saponines en le comparant à l'eau, ceci est mentionné / confirmé dans la littérature de Gee *et al.* (1993) et Yuliana *et al.* (2014). En outre, Ma *et al.* (1989) confirment que le rendement des saponines extraites au n-butanol est très faible.

Ces valeurs sont supérieures de celles de Kuljanabhadgavad et Wink (2009) qui rapportent que la concentration de saponines dans le quinoa varie selon les variétés et les conditions environnementales de 0,01% à 4,65% de la matière sèche. Cela révèle que les conditions environnementales de l'Afrique du Nord, l'Algérie et plus précisément la région de Biskra sont plus sévères que celles de l'Amérique du sud (Bolivie, Pérou, Equateur...etc.) étudiées par Kuljanabhadgavad et Wink (2009), car Soliz Guerrero *et al.* (2002) et Rao et Mohammed Shahid (2012) voyaient que le quinoa peut bien se comporter dans les conditions écologiques extrêmes du désert qui poussent la plante à produire plus de saponines.

Il est également conclu par Gómez-Caravaca *et al.* (2012) que *C. quinoa* est très tolérant à la salinité en matière de production de saponines.

4.2. Résultats du dosage

Les résultats du dosage des saponines totales par la méthode vanilline-acide sulfurique de la figure 6 indiquent une différence significative en matière de teneur des extraits en saponines totales ($p < 0,05$). Ceux-ci montrent que l'extrait méthanolique présente la concentration la plus

élevée ($876,5 \pm 0,064 \mu\text{g eq DG/mg d'extract sec}$), suivi de l'extract aqueux ($728,2 \pm 0,111 \mu\text{g eq DG/mg d'extract}$) et l'extract butanolique avec la plus faible concentration ($150 \pm 0,029 \mu\text{g eq DG/mg d'extract}$).

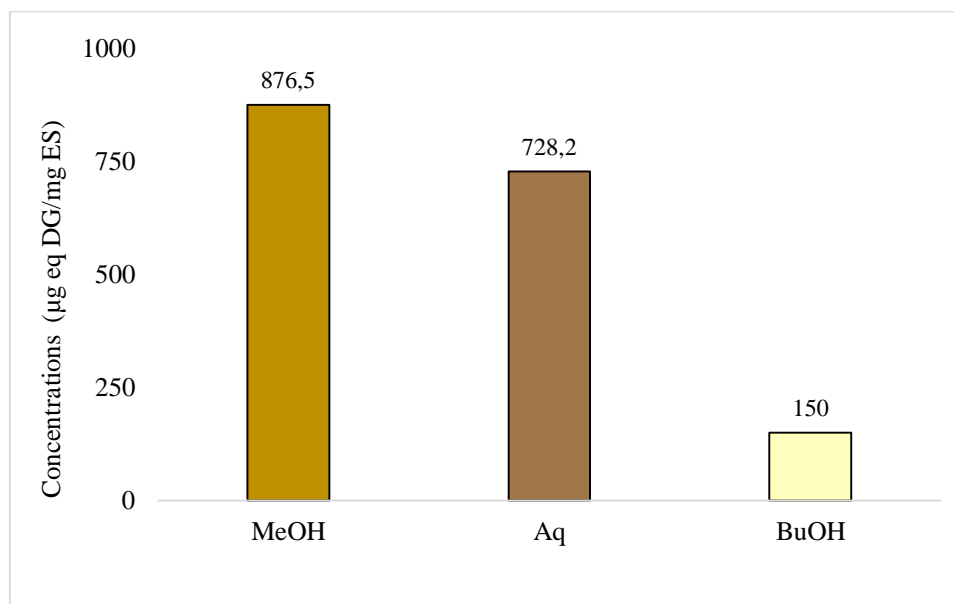


Figure 6. Teneur en saponines totales des extraits de *Chenopodium quinoa*.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Lozano *et al.* (2012) qui indiquent que la concentration des saponines du quinoa est plus élevée dans l'extract hydroalcoolique que l'extract aqueux. C'est ce qui est aussi en relation avec résultats du rendement d'extraction ; plus le solvant est convenable, plus les molécules de saponines sont parfaitement extraites et c'est le cas de l'extract méthanolique avec $876,5 \pm 0,064 \mu\text{g eq DG / mg d'extract sec}$ (Figure 6).

En outre, Soliz Guerrero (2002) et ses collaborateurs, ont remarqué une production élevée des saponines du quinoa et ainsi leur concentration dans la plante dans le stage de « *grain filling* », c'est le cas de notre plante qui est récoltée à la fin de son cycle.

4.3. Résultats du test de l'activité antimicrobienne

4.3.1. Technique de diffusion en milieu gélosé (sans traitement alcalin des extraits)

Le résultat de ce test ne montre aucun effet inhibiteur de la croissance microbienne, il est négatif pour toutes les souches avec tous les extraits. Cela pourrait être dû à plusieurs facteurs, parmi lesquels :

- L'extract diffuse mal dans un milieu gélosé ou ;

- L'extrait de saponines « brutes » n'est pas actif.

Pour ce faire, un traitement alcalin a été réalisé pour que les extraits soient actifs sur les bactéries et les levures.

4.3.2. Technique de dilution en milieu liquide (avec traitement alcalin des extraits)

Le traitement alcalin des extraits a conduit à la conversion des SB en SM bioactives, et le changement de la méthode d'aromatogramme a permis ainsi une bonne diffusion des SM dans le milieu, ce qui s'est traduit par l'inhibition de la croissance microbienne (tab. 4)

Tableau 4. Valeurs des CMI des extraits sur les souches microbiennes testées.

	Bactéries				Levures
	Gram-positives		Gram-négatives		
	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>S. aureus</i> ATCC 5923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	
					<i>C. albicans</i> <i>clinique</i>
Extrait					
MeOH	6,15 mg/ml	6,15 mg/ml	12,30 mg/ml	6,15 mg/ml	12,30 mg/ml
Extrait					
Aq	1,54 mg/ml	0,77 mg/ml	3,08 mg/ml	ND	ND

ND : pour Non Définie, l'expérimentation n'a montré aucun effet antimicrobien aux concentrations testées.

- **Pour l'extrait méthanolique**

Les résultats obtenus dans (tab.4) montrent que l'EA et l'EM présente une activité antimicrobienne significative vis-à-vis les souches testées ($p < 0,05$). L'EM exerce une inhibition de la croissance de *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 5923 et *E. coli* ATCC 25922 à 6,15 mg/ml d'extrait, alors que *P. aeruginosa* ATCC 27853 est inhibée à 12,30 mg/ml. Il est remarqué que l'EM est plus puissant sur les gram-positives.

C. albicans clinique est aussi inhibée à 12,30 mg/ml d'extrait, ce qui n'est pas en accord avec les résultats de Woldemichael et Wink (2001) montrant que l'extrait brut des saponines du quinoa ne possède aucun effet même sur une souche de *C. albicans* de référence. Nos résultats sont beaucoup plus élevés par rapport à ces derniers et cela pourra être dû au fait de la

richesse de l'EM en saponines traitées qui se convertissent en SM le long du traitement alcalin de cet extrait.

- **Pour l'extrait aqueux**

L'EA montre des valeurs de CMI minimales par rapport à l'EM qui sont 3,08 mg/ml, 1,54 mg/ml, 0,77 mg/ml pour *P. aruginosa* ATCC 27853, *L. monocytogenes* ATCC 19115 et *S. aureus* ATCC 5923 respectivement. Tandis que l'effet inhibiteur n'a pas été observé pour *E. coli* ATCC 25922 même à la plus forte concentration. Ces résultats sont en accord avec l'étude d'Arabski *et al.* (2012) prouvant que les saponines n'ont exercé aucun effet d'inhibition sur *E. coli*.

Et selon Sen *et al.* (1998) et Hassan *et al.* (2010), les saponines possèdent un effet prébiotique sur certaines bactéries, qui pourrait être détecté à partir d'une concentration de 0,25 à 0,39 mg/ml de saponines.

Le traitement alcalin des saponines de l'EA a probablement généré l'apparition d'oligosaccharides ou de polysaccharides de courte chaîne, qui est censée être à l'origine de promouvoir la croissance d'*E. coli*, étant donné qu'elle est une bactérie de type pro-biotique.

C. albicans clinique à son rôle, n'a pas été inhibée par l'EA même à la concentration la plus élevée, on suppose deux possibilités :

- Soient, les molécules de saponines ne sont pas assez suffisantes en nombre, car la cellule de cette levure est un peu plus volumineuse, ou encore ;
- La souche est clinique et donc automatiquement plus résistante.

- **Discussion générale de l'absence d'activité antimicrobienne**

Stuardo et San-Martín (2008) ont également testé l'effet inhibiteur des extraits de saponines du quinoa sans et avec traitement alcalin ; ils ont conclu que le traitement alcalin des extraits avant de tester leur effet antimicrobien représente « l'étape clé » ayant pour but de créer plus de SM bioactives et arriver ainsi à inhiber la croissance microbienne.

En addition, l'effet synergique entre les SM et les SB persistants dans le milieu réactionnel après le traitement alcalin des extraits, ne peut être exclu (Ozgun *et al.*, 2016).

Bien que les saponines agissent en tant que détergents en augmentant la perméabilité des cellules, la destruction complète des cellules ne peut parfois être atteinte (Wink, 2015). Théoriquement, cette activité pourrait faciliter l'afflux d'antibiotiques à travers la membrane

de la paroi cellulaire bactérienne et augmenter ainsi l'effet d'antibiotiques synthétiques en présence de saponines (Arabski *et al.*, 2012).

Selon ces résultats, on peut suggérer que le mode d'action des saponines sur les cellules procaryotes se diffère de celui des cellules eucaryotes.

4.4. Résultat de l'inhibition de la dénaturation du BSA

Les résultats de l'inhibition de la dénaturation du BSA sous l'effet de la chaleur sont montrés dans (tab. 5) :

Tableau 5. Résultats de l'inhibition de la dénaturation du BSA par les extraits et le standard.

Extrait	Concentrations ($\mu\text{g/ml}$)	Pourcentage d'inhibition %
MeOH	50	$40,33 \pm 1,15$
	100	$74,83 \pm 0,29$
	200	$76,67 \pm 1,44$
Aq	50	$34,9 \pm 0,17$
	100	$48,67 \pm 1,26$
	200	$70,10 \pm 0,36$
BuOH	50	$72,17 \pm 0,29$
	100	$85,00 \pm 0,00$
	200	$82,5 \pm 0,50$
Diclofénac sodique (standard)	100	$92,25 \pm 0,35$

La dénaturation protéique est bien documentée comme une cause connue d'inflammation (Karthi Ikattu *et al.*, 2013). L'extrait est considéré actif lorsque le BSA garde son intégrité sous l'effet de la chaleur. Les résultats montrés dans (tab. 5) révèlent que l'inhibition de la dénaturation du BSA augmente significativement avec l'augmentation de la concentration pour

tous les extraits ($p < 0,05$). L'inhibition maximale de la dénaturation du BSA sous l'effet de la chaleur 72 °C a été observée avec l'EB avec 85% à 100 µg/ml, suivi de l'EM et l'EA avec 76,67 % et 70,10% d'inhibition respectivement à 200 µg/ml.

En revanche, le Diclofénac sodique, un médicament anti-inflammatoire standard, a donné un pourcentage maximal d'inhibition de 92,25% à 100 µg/ml.

Les résultats de l'EB s'expliquent par la présence d'une corrélation avec sa teneur en saponines monodesmosidiques les plus réactives et bioactives.

Tanaka *et al.* (1995) et Morton et Murray (2001) confirment, par spectrophotométrie, que les saponines monodesmosidiques possèdent un pouvoir d'inhibition de dénaturation protéique très important qui peut être atteint même à 100°C.

Leur structure comprend un aldéhyde, un glucopyranose, un groupement estérifié et plusieurs groupes hydroxyle. N'importe lequel de ces groupes peut réagir avec les protéines (Tanaka *et al.*, 1995).

4.5. Résultat du test du pouvoir hémolytique

L'évaluation de l'effet hémolytique d'une plante médicinale est nécessaire même si cette dernière possède une activité anti-inflammatoire ou antimicrobienne importante, afin de déterminer la dose ; au-delà de laquelle cette plante est toxique. L'hémolyse représente donc un indicateur de cytotoxicité. (Seeman *et al.*, 2014).

Les résultats obtenus dans la figure 7 montrent que l'augmentation du pourcentage d'hémolyse est significativement proportionnelle à l'augmentation des concentrations d'extraits ($p < 0,05$). Les pourcentages d'hémolyse de l'EM et l'EA varient entre 0,23% et 19,35%. Alors que l'EB présente un fort pourcentage d'hémolyse 45,61% à la plus faible concentration qui atteint 50,61% à concentration élevée, malgré sa faible teneur en saponines selon les résultats du dosage.

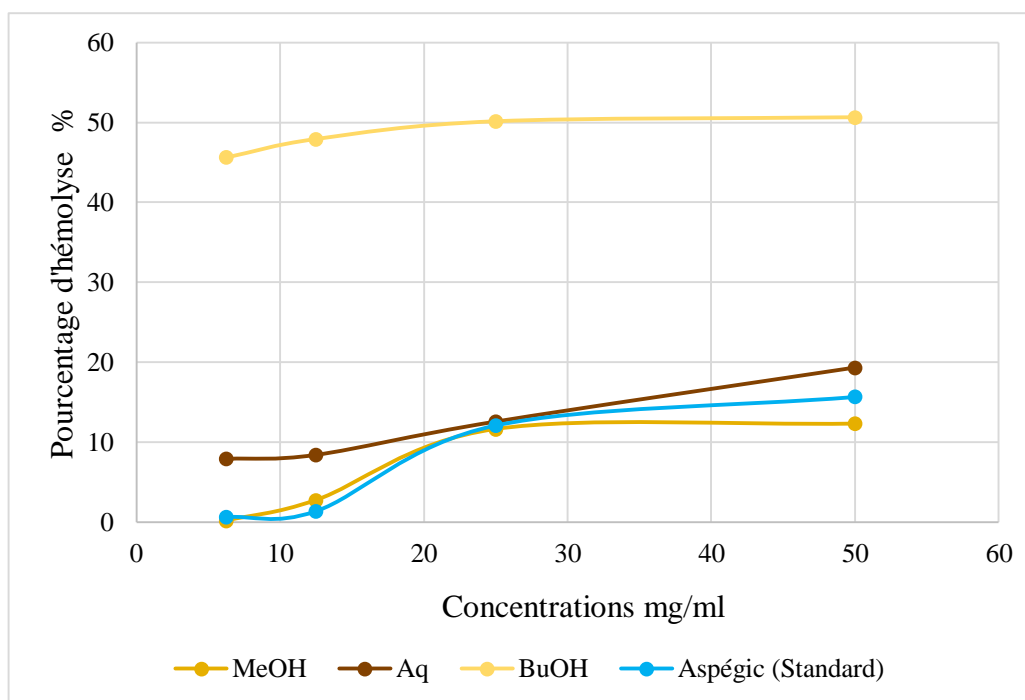


Figure 7. Pourcentage d'hémolyse des extraits de *Chenopodium quinoa*.

En addition, l'EM et l'EA agissent presque en similarité avec le standard ($p > 0,05$) allant de 10 mg/ml jusqu'à 25 mg/ml. Au-delà de 25 mg/ml l'augmentation du taux d'hémolyse par l'EM est très légère et inférieure par rapport au standard Aspégic avec 12,32% et 15,71% respectivement. L'EA à son rôle, ne représente pas une différence significative par rapport au standard Aspégic, à propos du taux d'hémolyse qu'il provoque.

Les résultats obtenus par l'EM (macération pendant 72h à température ambiante) et l'EA (décoction pendant 24h à 60 °C) jouent un rôle important car, selon Reichert *et al.* (1986), le pourcentage d'hémolyse causée par les saponines est en relation avec la température d'extraction et le temps de contact. L'effet hémolytique est considéré comme léger à température d'extraction située entre 5 °C et 60 °C, et qui tend à diminuer à partir d'un temps de contact de 24h entre la poudre et le solvant. Cela est bien le cas de l'EM et l'EA qui sont légèrement hémolytiques ($p > 0,05$) exactement comme le standard Aspégic. (ne sont pas hémolytiques / différence non significative).

Tandis que, l'EB présente une activité hémolytique significative en le comparant au standard Aspégic ($p < 0,05$), malgré sa faible teneur en saponines, cela suggère que l'hémolyse est en relation avec ; non seulement la concentration des saponines mais aussi avec leur structure. D'après Woldemichael et Wink (2001) et Voutquenne *et al.* (2008), les saponines

monodesmosidiques sont plus actives sur la membrane cellulaire que les saponines bidesmosidiques. L'EB est donc probablement, riche en saponines monodesmosidiques.

Conclusion

Les saponines de la plante du quinoa sont classées parmi ses déchets, elles promettent d'être des molécules biologiquement très actives d'origine naturelle. L'exploitation de ces déchets pourra être bien satisfaisante, à la fois, pour l'homme et l'environnement.

Par conséquent, ce travail s'est intéressé par l'étude des activités biologiques de ces molécules. Le quinoa donne des rendements très importants en saponines. L'EM étant le meilleur solvant d'extraction des saponines a donné $876,5 \pm 0,063 \mu\text{g eq DG/mg ES}$, L'EA avec $728,2 \pm 0,111 \mu\text{g eq DG/mg ES}$ et l'EB classé en dernier avec $150 \pm 0,029 \mu\text{g eq DG/mg ES}$.

Selon la définition proposée par ILSI Europe (1998), « un aliment peut être considéré comme fonctionnel s'il a été démontré de façon satisfaisante qu'il exerce un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme, au-delà des effets nutritionnels de base, de manière à améliorer la santé et le bien-être et/ou à réduire le risque de maladie ».

La capacité du quinoa à produire des grains riches en protéines dans des conditions écologiques sévères l'intègre parfaitement dans cette définition et le rend très important pour la diversification des systèmes agricoles futurs, notamment dans les régions arides ou encore les régions de hautes altitudes.

En addition, le quinoa est, selon cette définition, considéré comme un aliment fonctionnel car il a exercé des effets antimicrobiens importants vis-à-vis plusieurs souches, à savoir : 4 souches bactériennes et une souche fongique. L'EA était puissant à faibles concentrations sur la plupart des souches testées, notamment : *Staphylococcus aureus* ATCC 5923 à $0,77 \text{ mg/ml}$, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 à $1,54 \text{ mg/ml}$ et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 à $3,08 \text{ mg/ml}$. Alors que L'EM a montré un effet antibactérien important, particulièrement vis-à-vis les bactéries à Gram-positives, à savoir *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 et *Staphylococcus aureus* ATCC 5923 à $6,15 \text{ mg/ml}$.

Des effets anti-inflammatoires *-in vitro-* ont été également observés. L'EM et l'EA ont montré des pourcentages d'inhibition de dénaturation protéique importants de $70,10\% \pm 1,44$, $76,67\% \pm 0,36$ respectivement. Cependant, l'EB a exercé une inhibition significative de $85\% \pm 0,00$ à $100 \mu\text{g/ml}$ d'extrait grâce à sa teneur en saponines monodesmosidiques bioactives.

La capacité d'inhibition de la dénaturation d'albumine induit par la chaleur *-in vitro-* par les saponines du quinoa pourra promettre d'effets anti-inflammatoires *-in vivo-*. Par conséquent, il est important de déterminer la nature de l'interaction entre les saponines et les protéines, pour mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de la dénaturation protéique.

Bien que l'impact d'une telle ou telle activité d'une plante médicinale sur l'organisme, en particulier sur la prévention ou le traitement des maladies, nécessite des études plus approfondies : telles que l'effet de cytotoxicité, hémolyse, perturbation endocrinienne... etc.

Pour cela, le test d'hémolyse des extraits a été évalué. La plupart des extraits du quinoa, à savoir l'EA et l'EM exerce une hémolyse maximale de 19,35% et 12,32% respectivement, sont considérés comme légèrement hémolytiques donc faiblement cytotoxiques. Tandis que l'EB a montré une forte hémolyse minimale de 45,61%, ce qui permet de prédire –avec réserve- une utilisation saine de cette plante.

En revanche, toutes ces activités biologiques nécessitent des études plus larges et plus approfondies pour développer de nouveaux produits dans plusieurs secteurs : pharmaceutique, industriel, agro-alimentaire, sanitaire et cosmétique. Pour cela, nous proposons les perspectives suivantes :

- Elargissement du domaine d'études *-in vitro-* et *-in vivo-* tels que les activités enzymatiques...
- Identification des saponines les plus bioactives par des méthodes chromatographiques.
- Etudes moléculaires des interactions saponine-protéine.
- Etude pharmacologique et toxicologique des saponines du quinoa.
- Exploitation des saponines du quinoa en biotechnologie (industrie pharmaceutique, agro-alimentaire et cosmétique).
- Utilisation agricole dans la lutte contre les agents pathogènes.

Références bibliographiques

A

Ahumada, A., Ortega A., Chito D., Benítez R. 2016. Saponins of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) : a by-product with high biological potential. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 45(3) : 438-469.

Arabski M., Węgierek-Ciuk A., Czerwonka G., Lankoff A., Kaca W. 2012. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell line. *BioMed Research International*, vol. 2012. 6 p.

B

Bhargava A., Shukla S., Ohri D. 2006. *Chenopodium quinoa*—an Indian perspective. *Industrial crops and products* 23(1) : 73-87.

Bill Etherington M. 2002. Aliments fonctionnels : intérêt du consommateur ou de l'industrie alimentaire ? (Rapport de commission). Commission de l'environnement, de l'agriculture et des questions territoriales. 25 juin 2002, Royaume-Uni.

C

CLSI. 2018. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, vol. 38 (2), 11^{ème} édition. Clinical and Laboratory Standards Institute M07, USA. 112 p. ISBN 1-56238-836-3 1

Cowan M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 12(4) : 564-582.

E

Elsouhaimy S. A., Refaay T. M., Zaytoun, M. A. M. 2015. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences* 60(2) :297-305.

Escribano J., Cabanes J., Jiménez-Atiénzar M., Ibañez-Tremolada M., Gómez-Pando L. R., García-Carmona F., Gandía-Herrero F. 2017. Characterization of betalains, saponins and antioxidant power in differently colored quinoa (*Chenopodium quinoa*) varieties. *Food chemistry* 234, 285-294.

EUCAST. 2018. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie, V.2.0. Ed. Septembre 2018, Société française de microbiologie, Paris, 134 p.

F

FAO. 2011. Quinoa : an ancient crop to contribute to world food security. <http://www.fao.org/docrep/017/aq287e/aq287e.pdf>, consulté le 31 /01 /2019.

FAO. 2012. Master plan for the international year of quinoa : A future sown thousands of years ago. http://www.fao.org/alc/file/media/aiq/pubs/master_plan.pdf, consulté le 30/01/2019

FAO. 2015. Catalogue of commercial varieties of quinoa in peru. Instituto Nacional de Innovacion Agraria. ISBN 978-92-5-108765-7. 86p.

Foucault A. S. 2012. Effets d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone dans un modèle d'obésité nutritionnelle : application clinique. Thèse de doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement AgroParisTech, p. 113.

Francis G., Kerem Z., Makkar H. P., Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British journal of Nutrition* 88(6) :587-605.

G

Gawlik-Dziki U., Świeca M., Sułkowski M., Dziki D., Baraniak B., Czyż J. 2013. Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts—in vitro study. *Food and Chemical Toxicology* 57, 154-160.

Gil-Ramirez A., Salas-Veizaga D. M., Grey, C., Karlsson E. N., Rodriguez-Meizos I., Linares-Pastén J. A. 2018. Integrated process for sequential extraction of saponins, xylan and cellulose from quinoa stalks (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Industrial Crops and Products* 121, 54-65.

Gómez-Caravaca A. M., Iafelice G., Lavini A., Pulvento C., Caboni M. F., Marconi E. 2012. Phenolic compounds and saponins in quinoa samples (*Chenopodium quinoa* Willd.) grown under different saline and nonsaline irrigation regimens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(18) : 4620-4627.

H

Herbillon M. 2015. Le quinoa : intérêt nutritionnel et perspectives pharmaceutiques. Thèse de doctorat : Université de Rouen, Faculté de médecine et pharmacie. 126p.

K

Kandikattu K., Bharath Rathna Kumar P., Venu Priya R., Sunil Kumar K., Ranjith Singh.B. Rathore. 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by *in-vitro* method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 1(5): 729-730.

Kothe-Hans. W. 2007. 100 plantes aromatiques et médicinales. InTexte : Toulouse, 336p.

Kuljanabhadgavad T., Wink M. 2009. Biological activities and chemistry of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. *Phytochemistry reviews* 8(2) : 473-490.

L

Laus M. N., Gagliardi A., Soccio M., Flagella Z., & Pastore D. 2012. Antioxidant activity of free and bound compounds in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seeds in comparison with durum wheat and emmer. *Journal of food science* 77(11) : C1150-C1155.

Lozano M., Ticona E., Carrasco C., Flores Y., Almanza G. R. 2012. Cuantificación de saponinas en residuos de quinua real *Chenopodium quinoa* Willd. *Revista Boliviana de Química* 29(2) : 131-138.

M

Ma W. W., Heinstein P. F., McLaughlin J. L. 1989. Additional toxic, bitter saponins from the seeds of *Chenopodium quinoa*. *Journal of natural products* 52(5) : 1132-1135.

Manase M. J. 2013. Etude chimique et biologique de saponines isolées de trois espèces malgaches appartenant aux familles des Caryophyllaceae, Pittosporaceae et Solanaceae. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne, 221 p.

Miranda M., Vega-Gálvez A., Uribe E., López J., Martínez E., Rodríguez M. J., Di Scala K. 2011. Physico-chemical analysis, antioxidant capacity and vitamins of six ecotypes of chilean quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Procedia Food Science* 1, 1439-1446.

Morton P. A., Murray B. S. 2001. Acid beverage floc : protein–saponin interactions and an unstable emulsion model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 21(1-3) : 101-106.

Muruges N., Vembar S., Damodaran C. 1981. Studies on erythrocyte membrane IV : *in vitro* haemolytic activity of oleander extract. *Toxicology letters* 8(1-2) : 33-38.

N

Nsimba R. Y., Kikuzaki H., Konishi Y. 2008. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus* spp. seeds. *Food chemistry* 106(2) : 760-766.

O

Oelke E. A., Putnam D. H., Teynor T. M., Oplinger E. S. 1992. Quinoa. Alternative field crops manual. University of Wisconsin-Extension : Février, 1992. p. 73.

Ouellette N. 2004. Flore laurentienne. Edition interactive. Ed : Chenelière éducation. p. 193-195-197.

Oleszek W., Marston A. 2013. Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. Springer Science & Business Media (Vol. 45).

P

Patra A. K., Saxena J. 2009. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. Nutrition Research Reviews 22(2) : 204-219.

R

Reichert R. D., Tatarynovich J. T., Tyler R. T. 1986. Abrasive dehulling of quinoa (*Chenopodium quinoa*) : effect on saponin content as determined by an adapted hemolytic assay. Cereal Chem 63(6) : 471-475.

Rolland A. 1988. Etude pharmacologique et contribution à l'étude botanique et chimique d'*Eschscholzia californica* Cham. Thèse de doctorat : Université Paul Verlaine-Metz. 505 p.

S

Saada H. 2019. Algeria to celebrate World Day of Quinoa Consumption, July 7, 2019. DZ Breaking : 26 Juin 2019.

San Martín R., Ndjoko K., Hostettmann K. 2008. Novel molluscicide against *Pomacea canaliculata* based on quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. Crop Protection 27(3-5) : 310-319.

Seeman P., Cheng D., Iles G. H. 1973. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. The Journal of cell biology 56(2) : 519-527.

Stuardo M., San Martín R. 2008. Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. Industrial crops and products 27(3) : 296-302.

T

Tanaka M., Fang L., Ishizaki S., Taguchi T. 1995. Interaction of saponins with salt soluble proteins from walleye pollack meat. Fisheries science 61(2) : 373-374.

Tang Y., Tsao R. 2017. Phytochemicals in quinoa and amaranth grains and their antioxidant, anti-inflammatory, and potential health beneficial effects: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(7) : 1600767.

V

Vassas A., Pak M. V. 2010. La production de quinoa dans l'altiplano sud de la Bolivie : entre crises et innovations. In *ISDA 2010*. Cirad-Inra-SupAgro. p-p. 12-13.

Villa D. Y. G., Russo L., Kerbab K., Landi M., Rastrelli L. 2014. Chemical and nutritional characterization of *Chenopodium pallidicaule* (cañihua) and *Chenopodium quinoa* (quinoa) seeds. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 609-615.

Voutquenne L., Lavaud C., Massiot G., Men-Olivier L. L. 2008. Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharmaceutical Biology* 40(4) : 253-262.

W

Woldemichael G. M., Wink M. 2001. Identification and biological activities of triterpenoid saponins from *Chenopodium quinoa*. *Journal of agricultural and food chemistry* 49(5) : 2327-2332.

Wink M. 2015. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. *Medicines* 2(3) : 251-286.

X

Xu XH Li T., Fong C., Chen X., Chen XJ., Wang Y.T., Huang M.Q., Lu J.J. 2016. Saponins from Chinese medicines as anticancer agents. *Molecules*. Oct 5, 21(10) : 1326.

Y

Yao Y., Shi Z., Ren G. 2014. Antioxidant and immunoregulatory activity of polysaccharides from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *International journal of molecular sciences* 15(10) : 19307-19318.

Yuliana P., Laconi E. B., Wina E., Jayanegara A. 2014. Extraction of tannins and saponins from plant sources and their effects on *in vitro* methanogenesis and rumen fermentation. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture* 39(2) : 91-97.

Annexes

Annexe 1 : Appareillage et réactifs

a). Appareillage

- Autoclave.
- Agitateurs magnétiques (FALC).
- Etuve MEMMERT.
- Bain-Marie MEMMERT.
- Balance de précision (KERN, ABT 220-5DM).
- pH mètre WTW pH 3110).
- Vortex (VELP Scientifica).
- Plaque chauffante/Agitateur (Stuart).

b). Réactifs

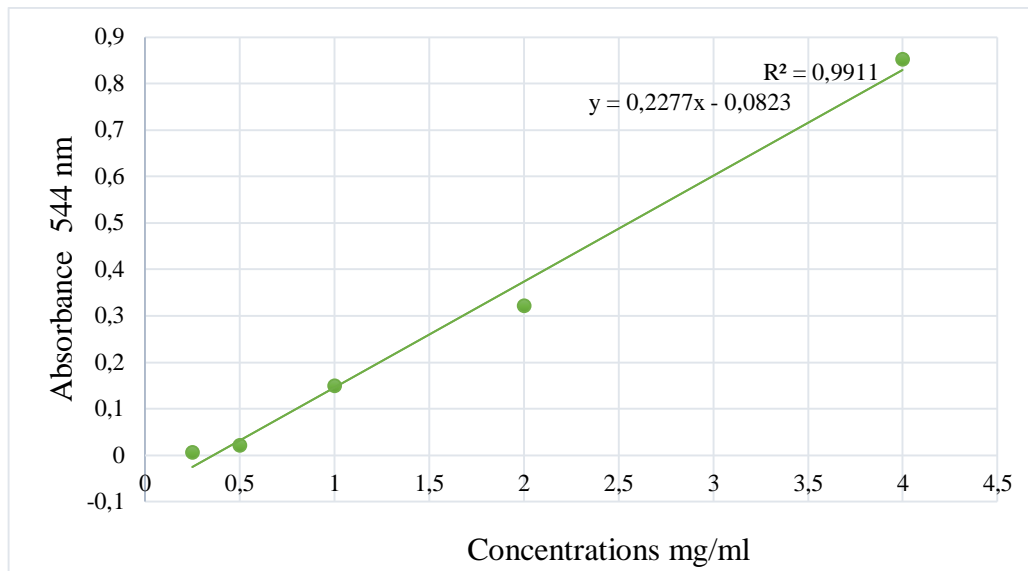
- Diclofénac sodique injectable : 800 µg préparé dans l'eau distillée.
- Vanilline 8% : préparée dans l'éthanol.
- Acide sulfurique 72% : préparé dans l'eau distillée.
- BSA 0,2% : préparé dans le Tris-HCl.
- Aspégic : préparé dans le Tris-HCl.
- NaOH 1N.
- HCl 37%.
- Déosgénine.

c). Solvants

- Tris-HCl : tris (hydroxyméthyl) aminométhane : 1,2144g dans 200 ml d'eau distillée.
- Méthanol (CH₃OH) 75%.
- Hexane (C₆H₁₄).
- n-Butanol (C₄H₁₀O).
- DMSO (C₂H₆OS) 2%.

- Ethanol absolu (C₂H₆O).
- Eau physiologique.

Annexe 2 : Courbe d'étalonnage (dosage des saponines totales)



Annexe 3 : Réalisation de l'aromatogramme selon les recommandations de EUCAST

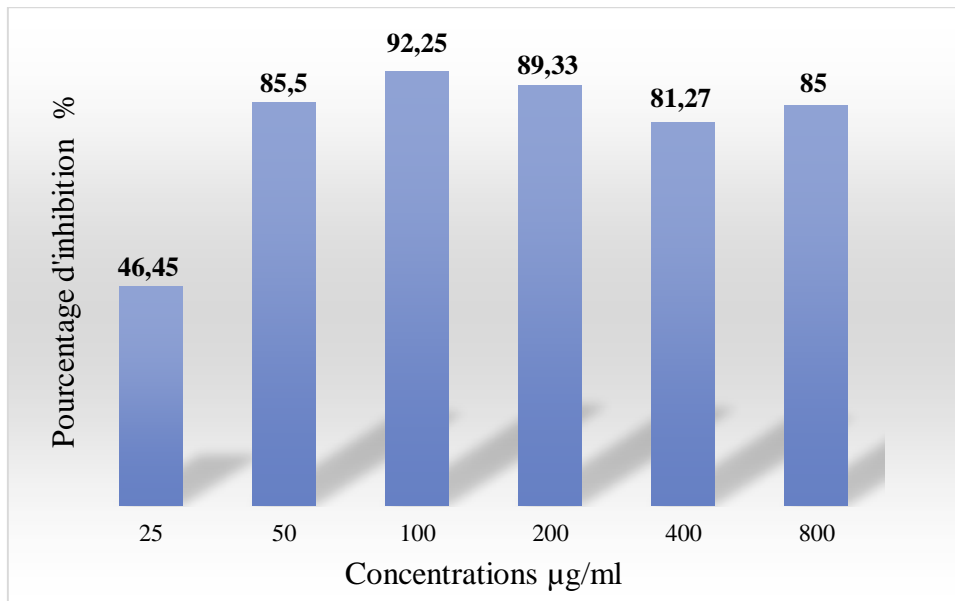
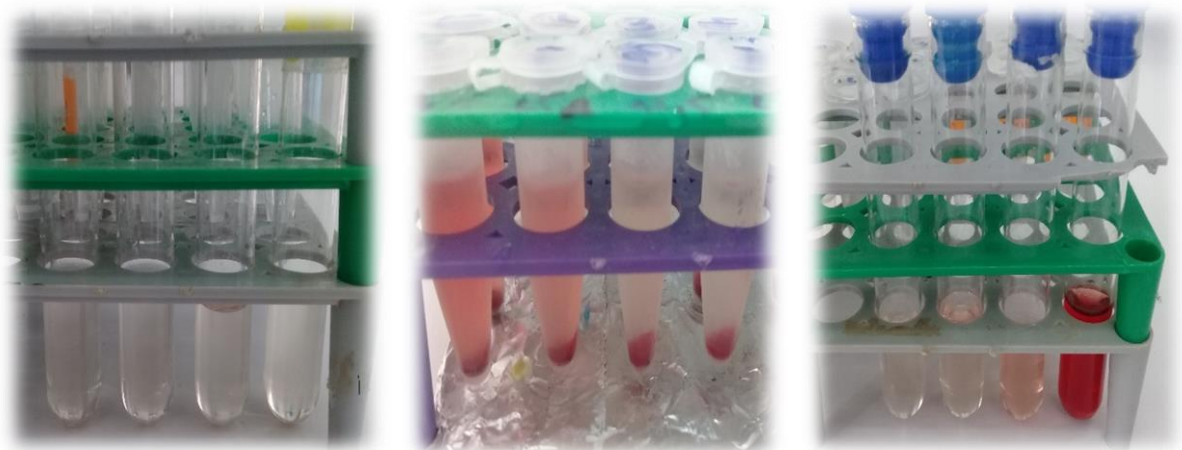
- Préparation de l'inoculum : prélever une colonie isolée dans de l'eau physiologique.
- Standardisation de l'inoculum à 0,5 McFarland correspond à 1 ou 2×10^8 UFC/ml. Il est recommandé d'utiliser un spectrophotomètre (Absorbance mesurée au spectrophotomètre entre 0,08 et 0,13 à 625 nm).
- Inoculation des géloses MH : plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif.
- Dépôt des disques imprégnés d'extraits : Déposer les disques fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée.
- Incubation des boîtes de Pétri : les incuber idéalement dans les 15 min. qui suivent le dépôt des disques, sans dépasser 30 min. à 37 °C pendant 24h.

- Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique : mesurer les diamètres des zones d'inhibition en millimètre le plus proche avec une règle, un pied à coulisse ou un système de lecture automatisé.
- Comparer les diamètres des zones d'inhibition avec les témoins.

Annexe 4 : Technique de macro-dilution en milieu liquide (CMI) selon les recommandations de CLSI

- Préparer l'inoculum dans le BMH, le-standardiser à 5×10^5 UFC/ml.
- Faire une série de dilution des antibiotiques ou antifongiques (extraits) à tester dans des tubes en verre stériles.
- Rajouter le même volume de la suspension standardisée à tous les tubes. Incuber à 35 ± 2 °C pendant 20 ± 4 h.
- La lecture se fait à l'œil nu, la CMI présente la concentration du médicament (extrait) la plus faible produisant une inhibition complète de la croissance microbienne (absence du trouble dans le tube correspondant).
- Comparer aux témoins.

Souche	Bouillon	Inoculum	Incubation	Durée
<i>Escherichia coli</i>	BMH	5×10^5 UFC/ml	Atmosphère normale 35 ± 2 °C	20 ± 4 H
<i>Pseudomonas</i> spp.				
<i>Staphylococcus</i> spp.				
<i>Listeria monocytogenes</i>	MH + 5% de sang de cheval défibriné et 20 mg/L β -NAD (MH-F)			
<i>Candida</i> spp.	BMH	2.5×10^3 UFC/ml	28–35°C	40 ± 8 H

Annexe 5 : Résultats de l'inhibition de la dénaturation du BSA par le standard**Annexe 6 : Fuite d'hémoglobine observée à l'œil nu par les extraits**

Extrait méthanolique

Extrait aqueux

Extrait butanolique

Annexe 7 : Composition des milieux de culture**a). Bouillon glucosé tamponné**

- Tryptone 20 g
- Chlorure de sodium 5 g
- Dihydrogénophosphate de sodium 2,5 g
- Glucose 2,0 g
- pH = 7,3

b). Gélose nutritive

- Extrait de viande : 1,0g/L
- Extrait de levure : 2,5g/L
- Peptone : 5,0g/L
- Chlorure de sodium : 5,0 g/L
- Agar : 15,0 g/L
- pH : 7,0

c). Mueller Hinton

- Infusion de viande
- viande de bœuf : 300 ml
- Peptone de caséine : 17,5 g
- Amidon de maïs : 1,5 g
- Agar : 17 g
- pH = 7,4

d). Potato Dextrose Agar (pour 1 L d'eau distillée)

- Infusion de pomme de terre 200 g
- Dextrose 20 g
- Agar 15 g

الغرض من هذا العمل هو التركيز على الخصائص الطبية لصابونينات الكينوا، نبات عشبي سنوي تم إدخاله مؤخرًا إلى الجزائر، تم إجراء الاستخلاص بواسطة طريقتين: بالكحول (MeOH / BuOH) والماء، ثم تحديد مجموع الصابونينات بواسطة طريقة الفانيلين و حامض الكبريت، متبوعة باختبارات الأنشطة البيولوجية -في المختبر- (نشاط مضاد للميكروبات، تثبيط تمسخ البروتين واختبار الانحلال الدموي). يظهر الاختبار أعلى محتوى صابونين في مستخلص MeOH 0.063 ± 876.5 ميكروغرام مكافئ د.ج/مغ، يليه المستخلص AQ 0.111 ± 728.2 ميكروغرام مكافئ د.ج/مغ وأخيرًا مستخلص BuOH 0.029 ± 150 ميكروغرام مكافئ د.ج/مغ. يُظهر النشاط المضاد للميكروبات بعد العلاج القلوي للمستخلصات وباستخدام تقنية التخفيف في وسط سائل؛ يُظهر مستخلص MeOH نشاطًا ضد جميع السلالات، وخاصة السلالات الإيجابية الجرام، ويمارس مستخلص AQ نشاطًا فيما يتعلق بثلاث سلالات من أصل 5 تم اختبارها. تم تصنيف نتيجة تثبيط تمسخ البروتين بالترتيب التنازلي: مستخلص BuOH 85 ± 0.00 ، مستخلص MeOH 76.67 ± 1.44 ، مستخلص AQ 70.10 ± 0.36 . و تكشف نتيجة اختبار الانحلال الدموي عن انحلال دم قوي بنسبة 45.61% عند أدنى تركيز بالنسبة لمستخلص BuOH، في حين أن مستخلص MeOH ومستخلص AQ يحدثان انحلالًا قليلًا بنسبة 19.35% و 12.32% على التوالي.

الكلمات المفتاحية: الكينوا، صابونين كامل، صابونين خام، نشاط مضاد للميكروبات، تمسخ البروتين، الانحلال الدموي.

Résumé

L'objectif de ce travail est de mettre l'accent sur les propriétés médicales des saponines des grains de *Chenopodium quinoa* Willd, une plante herbacée annuelle récemment introduite en Algérie. Leur extraction a été réalisée par deux méthodes : alcoolique (MeOH / BuOH) et aqueuse, puis le dosage des saponines totales par la méthode vanilline-acide sulfurique, suivi des tests d'activités biologiques -*in vitro*- (activité antimicrobienne, inhibition de la dénaturation protéique et le test du pouvoir hémolytique). Le dosage montre la plus grande teneur en saponines dans l'extrait MeOH $876,5 \pm 0,063 \mu\text{g eq DG/mg ES}$, suivi de l'extrait AQ $728,2 \pm 0,111 \mu\text{g eq DG/mg ES}$ et l'extrait BuOH $150 \pm 0,029 \mu\text{g eq DG/mg ES}$. L'activité antimicrobienne par la technique de dilution en milieu liquide après le traitement alcalin des extraits où l'extrait MeOH montre une activité vis-à-vis toutes les souches particulièrement les Gram-positives, l'extrait AQ exerce une activité vis-à-vis 3 souches sur 5 testées. Tant dis que, le résultat de l'inhibition de la dénaturation protéique est classé par ordre décroissant : l'extrait BuOH $85\% \pm 0,00$, l'extrait MeOH $76,67\% \pm 1,44$, l'extrait AQ $70,10\% \pm 0,36$. Le résultat du test du pouvoir hémolytique révèle une forte hémolyse $45,61\%$ à la plus faible concentration pour l'extrait BuOH, tandis que, l'extrait MeOH et l'extrait AQ sont légèrement hémolytiques avec $19,35\%$ et $12,32\%$ respectivement. Les saponines des grains de *Chenopodium quinoa* Willd pourraient être exploités pour des fins thérapeutiques notamment dans le domaine de lutter contre l'infection microbienne.

Mots clés : *Chenopodium quinoa* Willd, saponines totales, saponines brutes, activité antimicrobienne, dénaturation protéique, hémolyse.

Abstract

The aim of this work is to focus on the medicinal properties of saponins from *Chenopodium quinoa* Willd seeds, an annual herbaceous plant recently introduced to Algeria. Their extraction was carried out by two methods: alcoholic (MeOH / BuOH) and aqueous, then the determination of total saponin content by the vanillin-sulfuric acid method, followed by biological activity tests -*in vitro*- (antimicrobial activity, inhibition of protein denaturation and hemolytic test). The assay shows the highest saponin content in the MeOH extract $876.5 \pm 0.063 \mu\text{g eq DG / mg DE}$, followed by the extract AQ $728.2 \pm 0.111 \mu\text{g eq DG / mg DE}$ and BuOH extract $150 \pm 0.029 \mu\text{g eq DG/mg DE}$. The antimicrobial activity by the broth macro-dilution method after the alkaline treatment of the extracts in which the MeOH extract shows an activity against all the strains, particularly the Gram-positive ones, the AQ extract exerts an activity against 3 strains out of 5 tested. Whereas, the result of inhibition of protein denaturation is ranked in descending order: BuOH extract $85\% \pm 0.00\%$, MeOH extract $76.67\% \pm 1.44$, AQ extract $70,10\% \pm 0.36$. The result of the haemolytic test reveals a strong hemolysis 45.61% at the lowest concentration for the BuOH extract, while the MeOH extract and the AQ extract are slightly haemolytic with 19.35% and 12.32% respectively. The saponins of *Chenopodium quinoa* Willd seeds could be exploited for therapeutic purposes, particularly in the field of combating microbial infection.

Key words: *Chenopodium quinoa* Willd, total saponins, crude saponins, antimicrobial activity, protein denaturation, hemolysis.