



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHES SCIENTIFIQUE
Université KASDI Merbah Ouargla
Faculté de mathématique et des sciences de matière

N° Ordre :
N° Série :

Département de Chimie

Thèse

Présente pour l'obtention du diplôme de Doctorat

Spécialité : Chimie Organique

Présente par : BENZAHI KHEDIDJA

Thème

*Etude physico-chimique et pharmacologiques
des hétérosides existante dans le Chiendent
« CYNODON DACTYLON (L) Pers »*

Soutenu le : Jeudi 06 Juillet 2017

Devant le jury composé de

Mr L. SAKHRI, Professeur U.K.M. Ouargla	Président
Mr M. R. OUAHRANI, Professeur, U. El Oued	Examineur
Mr A.CHERITI, Professeur, U. Bechar	Examineur
Mr L. SEGNI, Professeur, U.K.M. Ouargla	Examineur
Mr B. DADAMOUSA, Professeur, U. Ghardaïa	Rapporteur

Année Universitaire : 2016 - 2017

Dédicace

Je dédie ce modeste travail.

A la mémoire de ma défunte mère

A mon tendre père qui m'a soutenu dans ma vie et durant mes études.

A mes frères et sœurs ainsi que leur petite famille.

A mon mari et mon fils pour leur aide et leur soutien moral.

A toute ma famille

A tous mes ami(e)s

A tous ceux qui m'ont consacré temps, patience et conseils surtout dans les moments difficiles.

Avant-propos

*Avant tout, je remercie **DIEU** le tout puissant de m'avoir accordé la force et le courage pour réaliser ce modeste travail et atteindre mon but.*

*J'exprime ma profonde gratitude au Professeur **B. DADAMOUSA** Recteur de l'Université du Ghardaïa, et de m'avoir permis de réaliser mes travaux de recherche dans les meilleures conditions. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et ses encouragements et pour le soutien qu'il m'a apporté tout au long de cette étude placée sous sa direction.*

*Je remercie Monsieur **L. SAKHRI**, Professeur à l'Université KASDI MERBAH Ouargla, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon Jury de thèse.*

*J'exprime ma reconnaissance à Monsieur **M. R. OUAHRANI** Professeur à l'Université d'El Oued pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.*

*Monsieur **A.CHERITI**, Professeur à l'Université de Béchar à bien voulu accepter de se déplacer pour juger ce travail, je le prie de trouvé ici l'expression de mes vives remerciements.*

*Je tiens également à remercier Monsieur **L. SEGNI**, Professeur à l'Université KASDI MERBAH Ouargla pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de Recherche de Génie des Procédés, et l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de participer au Jury de cette thèse.*

*Mes vifs remerciements sont adressés également à Monsieur **Y. MOUSSAOUI** Maître de Conférences à l'Université KASDI MERBAH Ouargla pour ses conseils judicieux, et son aide efficace tout au long de mon travail, sa patience, ses orientations et ses conseils précieux.*

*J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur **L. BECHKI**, Maître de Conférences à l'Université d'Ouargla et Directeur de l'Ecole Normal Supérieur d'Ouargla pour son soutien et de la compréhension.*

*A Monsieur **M. D. OULD EL HADJ** Professeur à l'Université KASDI MERBAH Ouargla pour m'avoir accueilli dans le Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Aride. Et je tiens exprimer également mes gratitude à Monsieur **Hocine DENDOUGUI** Professeur à l'Université KASDI MERBAH Ouargla pour la correction de mon manuscrit.*

Aux personnels de Laboratoire pédagogiques de Faculté des Mathématiques et des sciences de la Matière et aux personnels de laboratoire des analyses médicales au sein de

l'hôpital de Mohamed Boudiaf pour leurs nombreux services qu'ils m'ont rendus durant l'élaboration de ce manuscrit.

Enfin je m'adresse mes sincères remerciements à tous les enseignants de l'Université KASDI MERBAH Ouargla, ainsi que tout le personnel de la Faculté des Mathématiques et des Sciences de la Matière de l'Université KASDI Merbah Ouargla.

الكيمياء النباتية قد أصبحت في الوقت الحالي مغزى لعديد من الأبحاث الكيميائية، و ذلك من أجل المساهمة في تبيين الموارد الطبيعية بالأخص النباتات الطبية المستعملة منذ القدم إلى وقتنا الحالي في علاج عدة أمراض، وذلك نظرا لقلّة الاثار الجانبية بالمقارنة مع الأدوية الصناعية، من هذه النقطة تطرقنا إلى دراسة إحدى النباتات المعمرة و المتواجدة في أغلب المناطق و هو نبات النجيل أو باللغة العامية القزمير، و يمثل هذا العمل تنمة لدراسة أجريت لنيل شهادة الماجستير، قد ركزنا في هذا الأخير على دراسة قسم معين من الفلافونيدات و المتمثلة في الفلافونيدات السكرية أين وجد أن هذه المركبات تمثل نسبة **1.8912 %** من كتلة النبات في الحالة الجافة، كما تم فصل ثلاثة مركبات فلافونية بإستعمال طرق الفصل المتاحة. بهدف تبيين هذا الدراسة أجرينا دراسة على فاعلية المستخلصات النباتية في كبح الجذور الحرة و كمضادات جراثومية.

الكلمات الدالة: النجيل، الفلافونيدات السكرية، المضادات للأكسدة، المضادات الميكروبات، الجذور الحرة، طرق الفصل.

Résumé :

La Phytochimie est devenu l'objectif d'un grand nombre des recherches chimique, Afin de contribuer au développement des ressources naturelles en particulier plantes médicinales utilisés depuis l'Antiquité jusqu'à nos jours dans le traitement de plusieurs maladies en raison de l'absence d'effets secondaires en comparaison avec les médicaments synthétiques. De ce point de vue, nous avons traité dans cette étude une des plantes vivaces existante dans la plupart des régions, nommé *Chiendent « Cynodon dactylon (L) Pers »*. Ce travail est une continuité d'une étude pour l'obtention de Diplôme de Magister. Nous nous sommes concentrés dans ce travail sur l'étude d'une classe particulière qui sont les « *Hétérosides Flavoniques* » où on a constaté que ces composés représenter **1.9%** de masse de la plante sèche. D'autre part, nous avons séparé trois composés flavoniques par utilisation des techniques de séparation disponible.

Dans le but de valorisation de cette étude, nous avons mené une étude sur l'efficacité des différents extraits de plante « *Cynodon dactylon* » comme des antioxydants et antimicrobienne.

Mots clé : Chiendent, *Cynodon dactylon (L) Pers*, Hétérosides, Antioxydant, Antimicrobienne, Radicaux libres, les Techniques de séparation.

Summary:

The Photochemistry became the target for many recent chemical studies, to contribute to the development of natural resources especially medicinal plants used the ancient since times to the present day in the treatment of several diseases due to the lack of side effects in comparison with the industrial drugs. From this point, we treated in this study perennial plant exists in the most regions, Named « *Cynodon dactylon (L) Pers* ». This work is a continuation of a study for the Magister degree We have focused on this thesis the study of a particular class of flavonoids are the « *Flavonoid glycosides* » where it was found that these compounds represented **1.9%** of dry plant mass. On the other hand, we separated three flavonoid compounds by use of available separation techniques.

In the valuation purpose of this study we had a study on the effectiveness of plant extracts as antioxidants and antimicrobial.

Keywords: *Cynodon dactylon (L) Pers*, Flavonoid glycosides, Antioxidants, Antimicrobial, Free radicals, Separation techniques

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Partie Théorique	3
I.1. Cynodon dactylon (L.)Pers (chiendent)	4
I.1.1. Description.....	4
I.1.2. Classification d'espèce.....	4
I.1.3. Mode de multiplication	5
I.1.4. Usage médicale de Cynodon dactylon.....	5
I.1.5. Composition chimique	5
I.2. Flavonoïdes	7
I.2.1. Découverte des flavonoïdes.....	8
I.2.2. Localisation et Distribution des flavonoïdes.....	8
I.2.3. Propriétés physico-chimiques	9
I.2.4. Structure des flavonoïdes.....	9
I.2.5. Classification chimique.....	9
I.2.6. Biogenèse	11
I.2.7. Dosage.....	13
I.2.8. Propriétés pharmacologiques	13
I.3. Hétérosides naturels.....	18
I.3.1. Propriétés générales.....	18
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	20
CHAPITRE II : Matériels et Méthodes	24
II.1. Matériel.....	25
II.1.1. Région d'étude.....	25
II.1.2. Extraction et dosage des hétérosides flavoniques	25
II.1.3. Calcul des rendements en extraits secs	27
II.2. Techniques de séparation et d'identification	27
II.2.1. Chromatographie sur couche mince	27
II.2.2. Chromatographie d'adsorption sur colonne.....	29
II.2.3. Spectrophotométrie UV-visible.....	30
II.2.4. Chromatographie liquide haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (LC MS/MS).....	36
II.3. Activité anti oxydante des hétérosides flavoniques.....	42
II.3.1. Test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)	42
II.3.2. Teste par la réduction de fer (FRAP).....	43
II.4. Activité antibactérienne	44
II.4.1. Principes actifs antibactériens.....	45
II.4.2. Souches microbiennes utilisés.....	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	54
CHAPITRE III : Résultats et discussions	58
III.1. Rendements en extraits secs.....	59
III.1.1. Interprétation	59
III.1.2. Conclusion	59
III.2. Résultats d'étude chromatographique	60
III.2.1. Résultats de la chromatographie sur couche mince	60
III.2.2. Résultats de la chromatographie sur colonne.....	62
III.3. Identification structurale des molécules présentes dans les fractions F12, F17 et F22 de l'extrait acétate.....	64
III.3.1. Etude par la spectrophotométrie UV-visible à l'existence des réactifs.....	64
III.3.2. Interprétation.....	65

III.3.2.1.	La structure du composé identifie pour la fraction F12.....	65
III.3.2.2.	La structure du composé identifie pour la fraction F17	67
III.3.2.3.	La structure du composé identifie pour la fraction F22.....	70
III.3.3.	Conclusion.....	73
III.4.	Résultats d'étude d'activité anti oxydante des hétérosides flavoniques.....	73
III.4.1.	Teste de α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle (<i>DPPH</i>).....	73
III.4.2.	Teste par la réduction de fer (<i>FRAP</i>).....	75
III.4.3.	Conclusion	77
III.5.	Etude de L'activité antibactérienne	77
III.5.1.	Interprétation	79
III.5.2.	Conclusion	80
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	81
	CONCLUSION GENERALE	82
	ANNEXES	84

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Composent de 100g de la plante <i>Cynodon dactylon</i>	6
Tableau 2 :	Résultats des tests chimiques	6
Tableau 3 :	Teneur des différentes classes flavoniques dans les différentes parties de la plante (<i>feuille, tige et racine</i>).....	7
Tableau 4 :	Solvants d'éluion.....	27
Tableau 5 :	Relation entre le <i>R_f</i> et la Structure des flavonoïdes.	28
Tableau 6 :	Couleurs des flavonoïdes avec ou sans réactifs	29
Tableau 7 :	Proportions des phases mobiles (Toluène/Acétate d'éthyle), (Acétate d'éthyle/Méthanol), (Méthanol), (Méthanol/Eau) et (Méthanol/Eau/Acide formique) pour la chromatographie sur colonne.....	30
Tableau 8 :	Relation entre le maximum d'absorption en UV et les classes flavoniques..	31
Tableau 9 :	Déplacements observé dans les deux bandes (I, II) en présence des réactifs.	35
Tableau 10 :	Souches microbiennes étudiées	46
Tableau 11 :	Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence décrite par NCCLS.....	47
Tableau 12 :	Rendement d'extraction.....	59
Tableau 13 :	Résolution frontale des composés des deux Mélanges.....	61
Tableau 14 :	Fractions de l'extrait d'Acétate d'éthyle.....	63
Tableau 15 :	Fractions de l'extrait Butanolique.....	64
Tableau 16 :	Interprétation des spectres UV/Vis ont été faites selon les recherches de Mabry et al., (1970).....	65
Tableau 17 :	Activité antioxydant de la Quercétine.....	73
Tableau 18 :	Activité antioxydant de l'extrait Acétate d'éthyle.....	73
Tableau 19 :	Activité antioxydant de l'extrait Butanol.....	74
Tableau 20 :	Réduction de fer par la Quercétine.....	75
Tableau 21 :	Réduction de fer par l'extrait Acétate d'éthyle.....	76
Tableau 22 :	Réduction de fer par l'extrait Butanol.....	76
Tableau 23 :	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence en présence des extraits.....	78

LISTE DES FIGURE

Figure 1 :	Cynodon Dactylon (L.) Pers.....	4
Figure 2 :	Teneur des différentes classes flavoniques.....	7
Figure 3 :	Squelette de base des flavonoïdes.....	9
Figure 4 :	Schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes.....	12
Figure 5 :	Piégeage des ROS (Reactive oxygen species) (R) par les flavonoïdes.....	15
Figure 6 :	Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (Men+).	16
Figure 7 :	Comparaison entre deux pentahydroxyphénols.....	16
Figure 8 :	Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols.....	17
Figure 9 :	Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes.....	18
Figure 10 :	Etapas d'extraction et d'identification des hétérosides.....	26
Figure 11 :	Effet de chlorure d'aluminium dans HCl sur les composés ayant un hydroxyle en 3 ou 5 et la fonction carbonyle.....	33
Figure 12 :	L'addition des réactifs.....	34
Figure 13 :	Fragmentations principales des ions de la luteoline $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$	37
Figure 14 :	Fragmentations principales des ions de la kaempférol $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$	38
Figure 15 :	Différentes fragmentations de la lutéoline en mode négatif.....	39
Figure 16 :	Différentes fragmentations de la quercétine en mode négatif.....	40
Figure 17 :	Le radical libre DPPH [•] (2,2- DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle).....	42
Figure 18 :	Escherichia coli : ATCC 25922.....	48
Figure 19 :	Klebsiella pneumoniae.....	48
Figure 20 :	Pseudomonas aeruginosa.....	49
Figure 21 :	Streptococcus.....	51
Figure 22 :	Enterococcus faecalis.....	51
Figure 23 :	Staphylococcus aureus.....	52
Figure 24 :	Rendement d'extraction.....	58
Figure 25 :	Chromatographie sur couche mince CCM des deux extraits Acétate d'éthyl et Butanol.....	60
Figure 26 :	Colonne de fractionnement des deux extraits.....	61
Figure 27 :	Spectre photométrie UV de composé (1).....	65
Figure 28 :	Composé (1).....	65
Figure 29 :	Spectre des ions produit à partir du produit F12 on mode négatif (M-H) ⁻	66
Figure 30 :	Luteoline glycoside.....	66
Figure 31 :	La CCM du la fraction 17.....	67
Figure 32 :	Spectre photométrie UV de composé (2).....	68
Figure 33 :	Composé (2).....	68
Figure 34 :	Spectre des ions produit à partir de produit existe dans la fraction F17 on mode négatif (M-H) ⁻	69
Figure 35 :	Isorhamnetin.....	69
Figure 36 :	Spectre photométrie UV de composé (3).....	70
Figure 37 :	Composé (3).....	71
Figure 38 :	Spectre des ions produit à partir du produit F22 on mode négatif (M-H) ⁻	71
Figure 39 :	5-7-dihydroxy-3'-hydroxy-4'- méthoxyflavone.....	71

Figure 40:	Evolution de l'activité antiradicalaire des extraits de plante et de la Quercétine en fonction de la concentration.....	73
Figure 41:	Réduction du fer par les extraits.....	74
Figure 42:	Pouvoir réducteur de quercétine, de extrait acétate d'éthyle et de l'extrait de butanol.....	75
Figure 43:	Teste d'Escherichia coli.....	78
Figure 44 :	Teste d'Enterococcus faecalis.....	78
Figure 45 :	Test de Klebsiella pneumoniae.....	78
Figure 46 :	Teste de Pseudomonas aeruginosa.....	78
Figure 47 :	Teste de Staphylococcus aureus.....	78
Figure 48 :	Teste de Streptococcus pyogènes.....	78

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>CCM :</i>	Chromatographie sur couche mince
<i>CL :</i>	Chromatographie sur colonne
<i>UV</i>	Ultra-violet
<i>LC MS/MS :</i>	Chromatographie en phase liquide couplé avec la spectroscopie de masse en tandem (LC MS/MS)
<i>Ca :</i>	Calcium
<i>Fe :</i>	Fer
<i>P :</i>	Phosphate
<i>K :</i>	Potassium
<i>P :</i>	Perméabilité
<i>HIV :</i>	Virus de l'immunodéficience humaine
<i>SIDA :</i>	Syndrome d'immunodéficience acquise
<i>ADN :</i>	Acide désoxyribonucléique
<i>ARN :</i>	Acide ribonucléique
<i>DMBA :</i>	7,12-Diméthylbenzo (a) anthracène
<i>NM U:</i>	Nitrosométhylurée
<i>LDL :</i>	Low density lipoprotéin
<i>Fl-OH :</i>	Flavonoïde
<i>Fl-O :</i>	Flavonoxy
<i>ROS :</i>	Réactive oxygen species
<i>R :</i>	Radical
<i>Fe²⁺ :</i>	Ion de fer secondaire
<i>Cu²⁺ :</i>	Ion de Cuivre
<i>Mn⁺ :</i>	Manganèse
<i>TEAC :</i>	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
<i>Rd_t :</i>	Rendement Total
<i>OMe :</i>	Méthoxyl
<i>OH :</i>	Hydroxyl
<i>Rf :</i>	Résolution Frontale
<i>NH₃ :</i>	Ammoniaque
<i>AlCl₃ :</i>	Chlorure d'Aluminium
<i>KOH :</i>	Hydroxyde de potassium
<i>MeOH :</i>	Méthanol
<i>NaOMe :</i>	Méthoxyde de sodium
<i>NaOAc :</i>	Acétate de sodium
<i>HCl :</i>	Acide chlorhydrique
<i>H₃BO₄ :</i>	Acide Borique
<i>M+H :</i>	Molécule Mère plus un proton
<i>M-H :</i>	Molécule Mère moyen un proton
<i>HPLC :</i>	Chromatographie liquide haute performance
<i>DAD :</i>	Détecteur UV à baratte des diodes
<i>DPPH :</i>	Chromatographie liquide haute performance
<i>PhOH :</i>	Phénol
<i>DO :</i>	Densité optique
<i>CI50 :</i>	Concentration responsable
<i>FRAP :</i>	Ferric reducing-antioxidant power
<i>K₃Fe(CN)₆ :</i>	Ferricyanure de potassium
<i>FeCl₃ :</i>	Trichlorure de fer
<i>DMSO :</i>	Diméthyle sulfoxide
<i>ATCC :</i>	American type culture collection
<i>CFU</i>	Colony-forming unit

<i>NCCLS :</i>	National commette for cl inicat
<i>OMS :</i>	Organisation Mondiale de la Santé
<i>ECEH :</i>	Escherichia E. coli entérohémmorragiques
<i>SHU :</i>	syndrome hémolytique et urémique
<i>TSLS :</i>	Toxic shock like syndrom
<i>FIG :</i>	Figure
<i>R.A.A :</i>	Rhumatisme articulaire aigu
<i>TSST :</i>	La toxine super antigénique du syndrome de choc toxique
<i>RDA :</i>	Rétro-Diels-Alder.
<i>ESI :</i>	Ionisation par électrospray
<i>EI :</i>	Ionisation par impact électronique
<i>APCI :</i>	Ionisation chimique à pression atmosphérique
<i>FAB :</i>	Fast Atom Bombardment

Dans le monde, 80% des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne mais aussi parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. Aujourd'hui, le savoir des tradipraticiens est de moins en moins transmis et tend à disparaître. C'est pour cela que l'ethnobotanique et l'ethnopharmacologie s'emploient à recenser, partout dans le monde, des plantes réputées actives et dont il appartient à la recherche moderne de préciser les propriétés et valider les usages [1]. La recherche de nouvelles molécules doit être entreprise au sein de la biodiversité végétale en se servant de données ethnopharmacologiques. Cette approche permet de sélectionner des plantes potentiellement actives et d'augmenter significativement le nombre de découvertes de nouvelles substances actifs.

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique d'une de plante aride appeler chiendent « *Cynodon dactylon* « L » Pers » connue comme une plante vivace que l'on trouve en Asie, en Europe, en Amérique du Nord et en Afrique du Nord [2,3]. Cette plante est bien connue chez les jardiniers qui redoutent sa propagation aussi bien en surface qu'en sous-sol. Très souvent qualifiée de mauvaise herbe, tenace et envahissante par les jardiniers à cause de ses effets dévastateurs sur les sols, le chiendent possède cependant des propriétés thérapeutiques bien utiles à notre organisme.

Malgré sa mauvaise réputation le chiendent est connu depuis très longtemps par les médecins Grecs pour ses effets diurétiques et pour faire disparaître les calculs rénaux dus à la présence des sels de potassium contenus dans sa tige et son rhizome [4], il est également utilisé pour ses effets fébrifuges. Le Chiendent a été signalé comme émollient, combat les problèmes urinaires tels que l'urétrite et les cystites. Il protège les voies urinaires. En décoction, il soulage les inflammations de la prostate [4]. Le chiendent prévient la récurrence des coliques néphrétiques servie en infusion, il lutte contre la cellulite [5]. D'autant plus cette étude n'est qu'une continuité de travail de Magistère.

De ce fait, nous nous sommes intéressés dans ce travail à déterminer le taux des hétérosides flavoniques et définir la structure de quelques composés flavoniques séparés à partir des extraits de la plante *Cynodon dactylon* « L » Pers récoltés à une des exploitations de la région de Ouargla, l'analyse a été effectuée par différentes techniques telle que la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie sur colonne (CL), la spectrophotométrie UV-visible et la chromatographie en phase liquide couplée avec la spectroscopie de masse en tandem (LC MS/MS).

De plus une étude est consacrée à identifier l'activité anti-oxydante et antibactérienne des deux extraits hétérosidiques (l'extrait d'acétate d'éthyle et butanolique).

Le premier chapitre de ce travail porte sur une étude bibliographique en ce que concerne la description, classification, mode de multiplication, l'usage médical et la composition chimique de la plante chiendent « *Cynodon dactylon* « L » Pers ». En outre une étude sur localisation et distribution, structure, dosage, les propriétés physico-chimiques et pharmacologiques des flavonoïdes plus les propriétés générales des hétérosides.

Le deuxième chapitre présente la région d'étude et les travaux antérieurs consacrés pour extraire les hétérosides. Et également les techniques et les méthodes nécessaires à la séparation, la purification et l'établissement des structures des flavonoïdes. En plus d'une étude sur l'activité antioxydante et antimicrobienne des extraits flavoniques.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus qui seront suivis d'une discussion et d'une conclusion générale.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides université d'Ouargla, laboratoire de l'hôpital de Boudiaf Ouargla, l'unité de Recherche de Génie des Procédés université d'Ouargla et au Centre de Recherche scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) Alger

Références Bibliographiques

- 1/ Pelt J.M. (2001) *Les nouveaux actifs naturels*. Marabout. Paris.
- 2/ Singh SK, Rai PK, Mehta S, Gupta RK, Watal G (2009). Curative effect of *Cynodon dactylon* against STZ induced hepatic injury in diabetic rats. *Ind. J. Clin. Biochem.* 24:410-413.
- 3/ Rai PK, Jaiswal D, Rai DK, Sharma B, Watal G (2010). Antioxidant potential of oral feeding of *cynodon dactylon* extract on diabetes-induced oxidative stress. *J. Food Biochem.* 34:78-92.
- 4/ Ahmed S, Reza MS, Jabbar A (1994). Antimicrobial activity of *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia.* 65:463-464.
- 5/ Chellaiah M., Marriappan A., Nagappan R., and Savarimuthu I. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu. India. *J. of Ethanobio and Ethnomed.*, 2(43): 1 – 10. Chellaiah Muthu, Marriappan Ayyanar, Nagappan Raja and Savarimuthu Ignacimuthu. 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu. India. *J. of Ethanobio and Ethnomed.*, 2(43): 1 – 10.

CHAPITRE I :
« PARTIE
THÉORIQUE »

I.1. *Cynodon dactylon* (L.) Pers (*chiendent*) :

Cynodon dactylon (Bermuda grass) (**Fig.1**) est une graminée vivace distribuée partout dans le monde et surtout il est originaire des régions tropicales et tempérées chaudes. La plante est riche en métabolites, notamment protéines, glucides, minéraux, flavonoïdes, caroténoïdes, alcaloïdes, glycosides et triterpénoïdes. La plante du *C. dactylon* conserve plusieurs activités biologiques comme antibactérienne, antimicrobienne, antivirales et elle a d'autres propriétés, elle a été largement utilisée en médecine traditionnelle pour traiter des affections variées tels que la toux, maux de tête, diarrhée, crampes, l'épilepsie, hydropisie, dysenterie, hémorragie, hypertension, hystérie, la rougeole, morsure de serpent, plaies, les tumeurs et les verrues [1].



Figure 1 : *Cynodon Dactylon* (L.) Pers

I.1.1. Description :

C'est une plante vivace à rhizome longuement rampant sur la surface du sol environ le 20m de longueur, elle est très ramifiée portant de nombreuses feuilles dressées à longue gaine entourant la tige et a limbe aplatie 2.5-20cm de longueur. [2].

L'inflorescence composée de 2 à 6 épis digités, droits, purpurins ou verts à rachis villos au mois à la base, disposés sur deux rangs serrés, en épis paraissant dentée 50mm de longueur au plus, la période de la floraison s'étend du mois février jusqu'en [2,3].

I.1.2. Classification d'espèce :

D'après la bibliographie on peut noter la classification suivante [4] :

- Gamme: eucaryotes
- Règne : plante

- Direction: les plantes terrestres
- Section: plantes vasculaires
- Division : Spermatophytes
- Subdivision : Angiospermes
- Classe : Cotylédonées
- Sous-classe : Commelinidées
- Ordre : Glumiflores
- Famille : Graminées
- Gent : Cynodon
- Espèce : Cynodon Dactylon

I.1.3. Mode de multiplication :

Il existe deux types de multiplication :

- par graines.
- par graines et organe végétale.

Pour le premier type il faut signaler que les mauvaises herbes ont un pouvoir de productivité des graines très important, par exemple pour « le folle avoine » produit de 250 à 500 graines par plante.

La multiplication par graines est complétée chez certaines espèces par la reproduction et la dissémination d'organes végétatifs appropriés et le chiendent est parmi les plantes qui se multiplie par les graines plus le bourgeonnement des tiges. [5]

I.1.4. Usage médicale de Cynodon dactylon:

C'est une plante d'origine d'Afrique du l'Est, Asie, Australie et Europe du Sud. Cynodon est une mauvaise herbe et a été trouvé pour quelle possède des diverses propriétés médicinales potentielles. La plante est traditionnellement utilisée comme un agent pour contrôler le diabète en Inde [6]. L'extrait de feuilles de C. Dactylon a été signalé comme anti diabétique [7,8] l'efficacité antioxydant et hypolipémies [6,9,10]. La guérison des blessures mineures [11] et antioxydant hépatique [12].

I.1.5. Composition chimique :

D'après les études de « Miller 1958» on constate que 100 g de la plante séchée à l'abri du soleil contient [2]:

Tableau 1: Composants de 100g de la plante Cynodon Dactylon [2]

Les composés	Masse(g)
Protéine	11,6
Graisse	2,1
Total de carbohydrate	75,9
Fibre	25,9
Cendre	10,4
Ca ²⁺	0,530
Fe ²⁺	0,112
P ³⁻	0,220
K ⁺	1,630
Equivalent du β -carotène	28 ×10 ⁻⁶

Comme elle contient la « cynodine », des acides cyanhydriques et la triticine, en plus des sucres et une essence antibiotique [2, 13].

D'autre part et d'après l'étude effectuée [14] sur le Chiendent qu'est récolté le 02/12/99 dans l'une des exploitations de la région de Ouargla contient plusieurs principes actifs tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, cardenolides, stérols insaturés et terpènes, les tanins et les huiles essentielles dans les trois parties de la plante (les feuilles, les tiges et les racines), sont regroupées dans Tableau 2 :

Tableau 2 : Résultats des tests chimiques effectués [14]:

Parties de la plante Tests chimique	Feuilles	Racines	Tiges
	Flavonoïdes	+	+
Aglycones :	+	+	+
Glycosides :	+	+	+
Alcaloïdes	+	+	+
Saponosides	-	-	-
Cardénolides	+	-	-
Tanins	+	+	+
Stérols insaturés et terpènes	+	+	+
Huiles essentielles	+	+	+

(-) L'absence, (+) L'existence

D'autant plus et d'après le dosage de différentes classes flavoniques effectués sur les trois parties de la plante on constate que les feuilles sont la partie la plus riche des composés flavoniques et que la classe prédominante c'est la classe hétérosidique (les C- glycosides) suivant le Tableau 3 et le Figure2 [2]:

Tableau 3: Teneur des différentes classes flavoniques dans les différentes parties de la plante (feuille, tige et racine) [14]

L'ORGANE \ ECHANTILLON	Feuille (mg/g)			Tige (mg/g)			Racine (mg/g)		
	agly	anth	c-glyco	agly	anth	c-glyco	agly	anth	c-glyco
I	0,21	1,85	9,003	0,078	1,16	7,916	0,195	0,271	7,310
II	0,37	0,79	7,927	0,05	0,56	8,629	0,123	0,24	8,479
III	0,24	1,503	7,244	0,142	1,25	5,853	0,158	0,41	7,058
<i>La moyenne</i>	<i>0,274</i>	<i>1,381</i>	<i>8,058</i>	<i>0,09</i>	<i>0,99</i>	<i>7,466</i>	<i>0,16</i>	<i>0,307</i>	<i>7,61</i>
<i>L'écart type</i>	<i>0,07</i>	<i>0,44</i>	<i>0,724</i>	<i>0,037</i>	<i>0,306</i>	<i>1,177</i>	<i>0,029</i>	<i>0,074</i>	<i>0,62</i>
<i>Coefficient de dispersion</i>	<i>25%</i>	<i>31 %</i>	<i>8%</i>	<i>41 %</i>	<i>30 %</i>	<i>15%</i>	<i>18%</i>	<i>24%</i>	<i>8 %</i>

agly : Aglycones

anth : Anthocyanes

C-glyco : C-glycoflavones

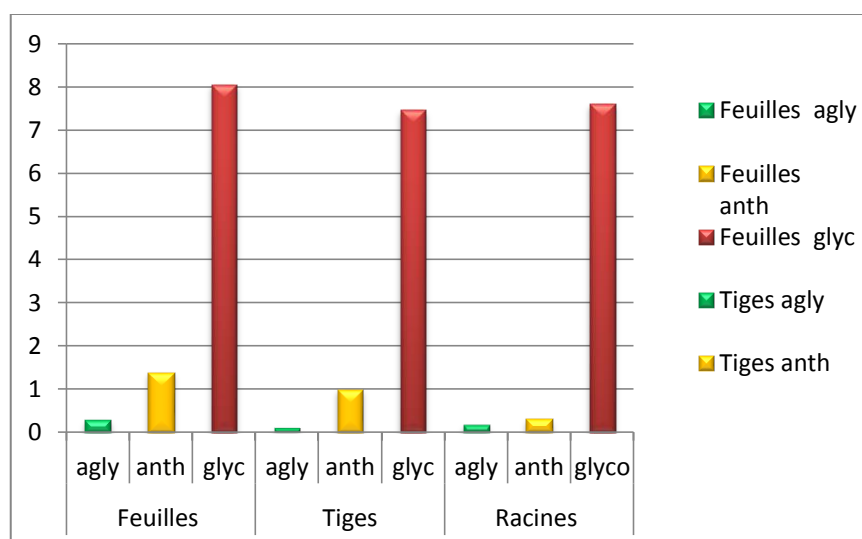


Figure 2: Teneur des différentes classes flavoniques [14]
(Aglycones, anthocyanes et c-glycoflavones)

D'après Delaveu la teneur des flavonoïdes s'accroissent dans le même sens que la masse de matière végétale, en effet la synthèse des flavonoïdes dépend de la photosynthèse et par voie de conséquence est fonction de la surface exposée à la lumière.

I.2. Flavonoïdes :

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique

photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes [15].

L'expression flavonoïde a été introduite en 1952 par Geissman et Hinreiner pour désigner les pigments ayant un squelette (C6-C3-C6), provenant du mot latin flavus qui signifie jaune [16]

I.2.1. Découverte des flavonoïdes :

L'intérêt nutritionnel pour les flavonoïdes date de la découverte de la vitamine C, à la suite des travaux de Szent Gyorgyi en 1938. Le scorbut expérimental cède à l'ingestion de jus d'agrumes mais résiste à la seule administration d'acide ascorbique. Plus pratiquement, les symptômes hémorragiques du scorbut liés à la fragilité des vaisseaux sont guéris par des extraits de Paprika et du jus de citron alors que l'acide ascorbique seul est inefficace. Les analyses chimiques ont montré que la fraction active était de nature flavoniques. Cette action des flavonoïdes sur la perméabilité vasculaire a été appelée propriété vitaminique.

P (P étant la première lettre du mot perméabilité). Cette notion de vitamine P n'existe plus à l'heure actuelle puisqu'elle ne correspond pas à la définition classique des vitamines Les flavonoïdes sont considérés comme des micronutriments importants puisqu'ils peuvent jouer des rôles antioxydants ou posséder des propriétés biologiques diverses [17].

I.2.2. Localisation et Distribution des flavonoïdes:

Les flavonoïdes sont largement rencontrés dans le règne végétal. On signale environ 2% de la proportion du carbone photosynthétique global incorporé dans la biosynthèse flavonique. Ils sont cependant rares chez les végétaux inférieurs. De plus, leur localisation au sein de la plante est caractéristique. En effet, les flavonoïdes sont omniprésents dans les organes aériens jeunes où ils sont localisés dans les tissus superficiels [18].

Au niveau cellulaire, on a observé que les flavonoïdes, sous forme d'hétérosides, sont dissous dans le suc vacuolaire ou localisés dans les chloroplastes et les membranes des végétaux. Lorsque les flavonoïdes sont présents dans la cuticule foliaire, il s'agit presque toujours de génines libres dont la lipophilie est accrue par la méthylation partielle ou totale des groupes hydroxyles [19].

En définitive, les flavonoïdes possèdent une large répartition dans le monde végétal. Ils sont largement abondants dans les légumes feuilles (salade, choux, épinards, etc.), ainsi que dans les téguments externes des fruits. On les trouve principalement dans les agrumes : citrons, orange, pamplemousses et dans une moindre mesure : abricots, cerises, mûres, raisins, papayes, tomates et sarrasin. On en trouve également en quantité importante dans nombreuses plantes

médicinales et très spécifiquement dans les herbes aromatiques comme le thym, le persil, le romarin et le céleri [18].

Donc les flavonoïdes sont des pigments jaunes, généralement polyphénoliques très répandus chez les végétaux. Ils sont responsables de la couleur des fleurs, des fruits et même des feuilles.

I.2.3. Propriétés physico-chimiques :

Ce sont des solides cristallisés dont la teinte varie du blanc ivoire au jaune vif.

- solubles dans l'eau, surtout à chaud
- solubles dans l'alcool, à chaud
- solubles dans les solutions alcalines (la potasse, l'ammoniaque) en donnant une

coloration jaune qui disparaît par addition d'acide.

Selon Saidman, et col (2002) [20], le facteur principal influençant sur la solubilité des flavonoïdes est sa capacité à former des liaisons hydrogènes avec le solvant.

I.2.4. Structure des flavonoïdes :

Les flavonoïdes présentent un squelette de base à 15 atomes de carbone, fait de deux cycles benzéniques C_6 reliés par une chaîne en C_3 . Le pont à 3 carbones entre les deux phényles forme généralement un troisième cycle pyrone, la distinction des sous-classes se fait sur la conformation de cette structure centrale C. On peut distinguer notamment dans les flavonoïdes Figure 3 :

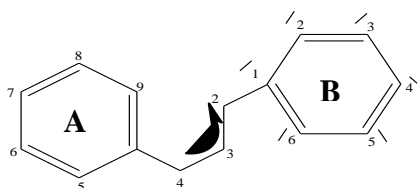


Figure 3 : Squelette de base des flavonoïdes

I.2.5. Classification chimique :

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classe selon le degré d'oxydation de la chaîne C3 [21].

1°/ 2-phényl benzopyriliums, anthocyanes

2°/ phényl chromane

- a) flavones, flavonol, et leur dérivés
- b) flavanones et dihydroflavonole
- c) isoflavanones – isoflavones

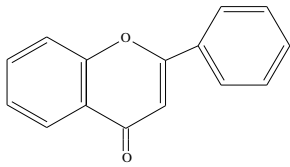
3°/ 2-phenylechromane

a) flavanes

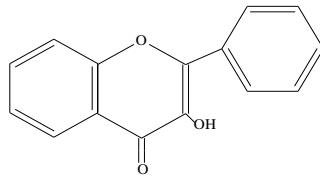
b) flavan- 3-ols, flavan –3,4-diols

4°/ chalcones et dihydrochalcones

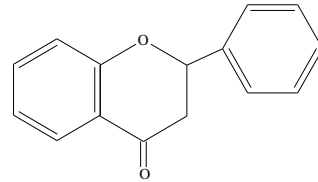
5°/ benzylidène coumaranones (aurones)



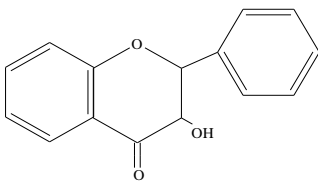
FLAVONE



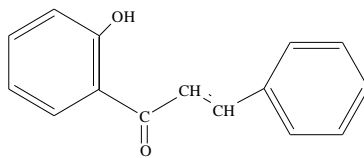
FLAVONOL



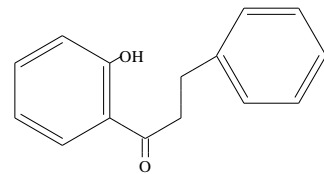
FLAVANONE



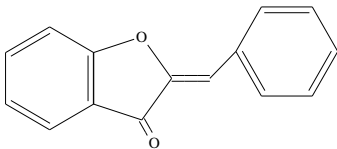
FLAVANONOL



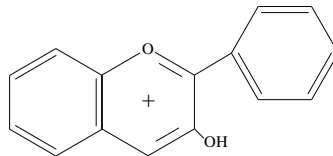
CHALCONE



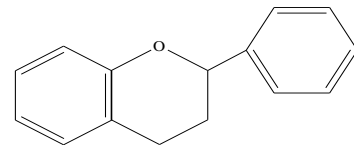
DIHYDRCHLCONE



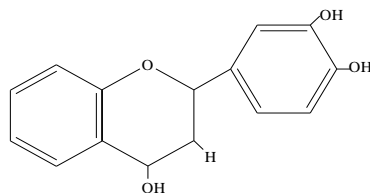
AURONE



ANTHOCYANIDIN



CATECHINE



FLAVAN-3,4-DIOL

Les composées de chaque sous classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autre) sur les deux cycles aromatiques **A** et **B** et la chaîne **C3** intermédiaire. A l'état naturel on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides.

Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées, la partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone.

D'autant plus il existe deux types des flavonoides hétérosidique [22]

- O-hétéroside
- C-hétéroside

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire en règle générale avec les hydroxyles en position « 7 » des flavones et les hydroxyles en « 3 » des flavonols qui sont impliqués, et cela dans le cas de O-glycosile.

Les C-hétérosides : on en connaît plus de 300, la liaison s'établit entre le carbone anomérique du sucre et le carbone en position 6 ou 8 de la génine [23].

I.2.6. Biogenèse :

La biosynthèse se fait à partir d'un précurseur commun la 4,2,6,4'-tétrahydroxy chalcone qui est le résultat de la fixation de 3 chaînons de l'acétate sur l'acide *p*-coumarique [24], et par l'action d'enzymes, cette chalcone de couleur jaune est métabolisée en différentes classes de flavonoides selon le Figure 4.

Partie théorique

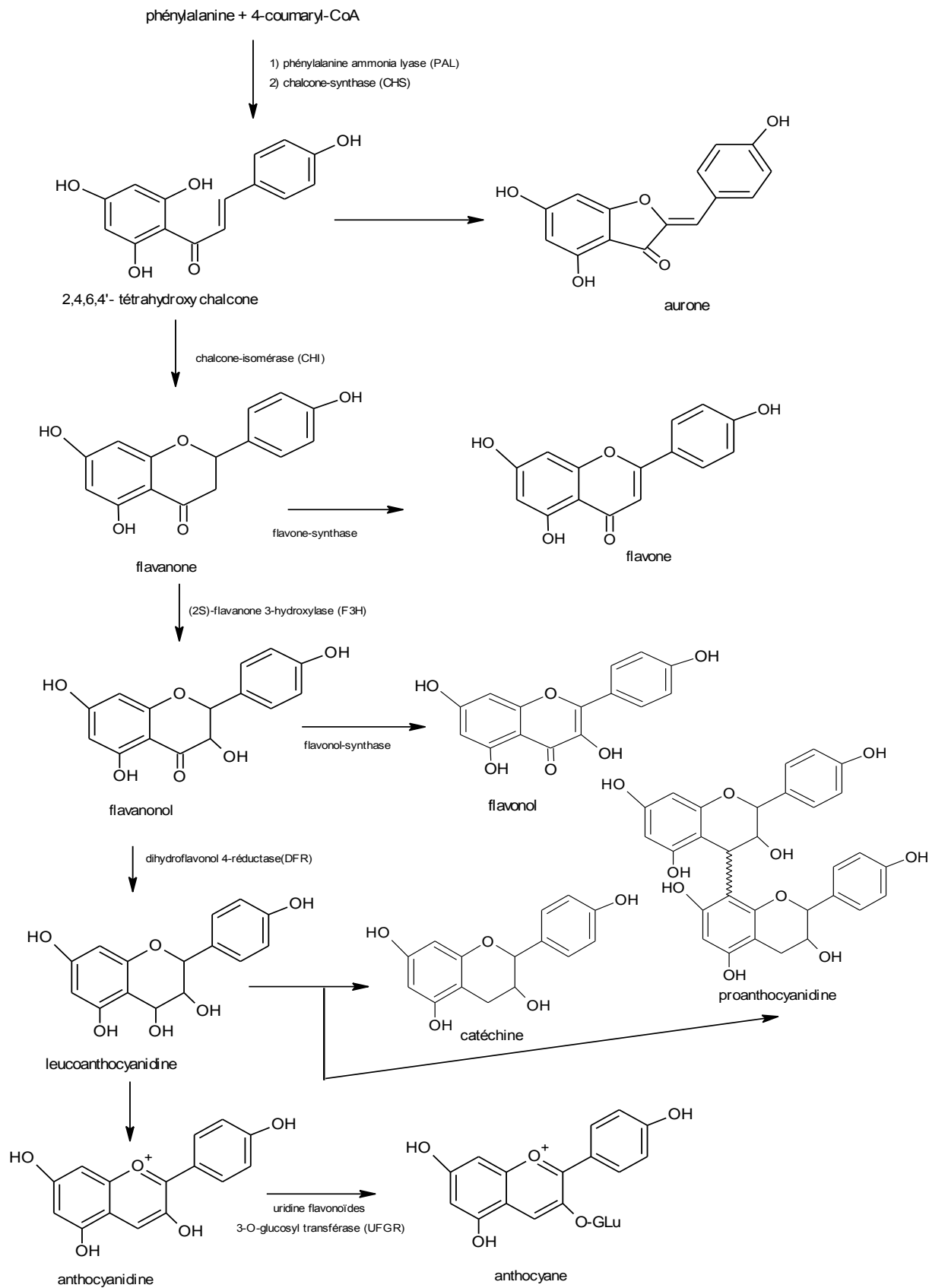


Figure 4 : Différentes réactions enzymatiques conduisant aux principales familles des flavonoïdes [24]

I.2.7. Dosage :

Les méthodes de dosage classiques sont le plus souvent, colorimétriques ou spectrophotométriques. Aujourd'hui la Chromatographie en Phase Liquide à Haute Pression (HPLC), présente la possibilité d'une identification et quantification de manière rapide et précise de toutes les classe des flavonoïdes [25].

I.2.8. Propriétés pharmacologiques :

Les pigments flavoniques sont pratiquement universels dans les feuilles et pétales, on les trouve fréquemment dans d'autres organes « fruits, racines, bois etc. », La principale activité attribuée aux flavonoïdes et incontestablement un rôle d'appel « couleur des fleurs et fruits » afin d'attirer les insectes et d'autres animaux vers les plantes pour la pollinisation et la dispersion des graines [23,26].

Par ailleurs, les pigments flavoniques sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse, leur action se situe au niveau des petites veines ou des capillaires, elles augmentent la résistance des capillaires (l'action vitaminique P).

Les flavonoïdes sont des toniques veineux et des protecteurs capillaires [19,26,27] et ce sont des molécules pratiquement atoxiques biologiquement et bien tolérés chez l'homme, mais leur action est lente [28].

De nos jours, les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités biologiques et pharmaceutiques.

1/ Propriétés anti-inflammatoires et immunologiques

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoire set qu'ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire [29,30,31].

Quelque composés flavoniques tel que la rutine le rutoside et la quercitine ont un rôle dans les pathologies circulatoires comme anti-œdémateux, veinotonique, vasculo protecteur et comme anti-inflammatoire [19,28].

D'autre par l'apigénol, chysine, taxifoline, 8-glycosyl hypolaetine, gosspine sont connu par leurs interactions avec le métabolisme de l'acide arachidonique qui joue un rôle important dans les phénomènes inflammatoires.

2/ Propriétés antivirales et antibiotiques

Les flavonoïdes sont capables d'agir au niveau de la synthèse des protéines virales permettant ainsi une bonne protection des souris vis-à-vis d'une infection virale à la suite d'une administration journalière de 3-O-méthylquercétine à raison de 20 mg/kg pendant 9 jours [32].

Certains travaux ont mis en évidence un impact des flavonoïdes sur le rétrovirus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA).

Ils ont démontré que les flavonoïdes sont de bons inhibiteurs de la reverse transcriptase. Cependant, leur impact semble plus fort sur l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte que sur la reverse transcriptase virale [33,34,35]. Des études ont apporté l'évidence de l'effet bactéricide de différentes flavanones sur l'ADN gyrase d'une bactérie *staphylococcus aureus*. [36].

3/ Propriétés antinéoplasiques

Des études réalisées chez la souris ont mis en évidence les effets protecteurs des flavonoïdes vis-à-vis des promoteurs de tumeurs [37]. La quercétine, par exemple, est l'un de ces phénoliques capables de diminuer, chez le rat, l'incidence des tumeurs mammaires induites par le DMBA (7,12 diméthyl benz(a)anthracène) ou la NMU (Nnitrosométhylurée) [38].

4/ Propriétés antifongiques :

Trois principales familles de flavonoïdes, en l'occurrence : la flavone, flavanone et la flavonol, ces dernière sont été testées contre 4 champignons pathogènes des graine de céréales « *alternaria alternata*, *cladosporium herbarum*, *fusarium oxysporum* et *trichoderma herzianu* » les résultats obtenus ont montrés que la flavone et flavanone sont les plus efficaces.

5/ Propriétés Hépatoprotecteur :

Les composés flavoniques ayant une structure de type catéchine comme « isobitrine, hispiduline, flavanol-ignames inhibent l'action d'inducteurs de toxicité chez des hépatocytes de rat [19,25], de plus ils ont un effet antiallergiques [19].

6/ Propriétés Hypotensions :

La « 6,8-diglucosylapigénine » peut provoquer notamment une baisse de pression artérielle chez le rat [25].

D'autre composés flavoniques peuvent avoir une fonction importante dans les industries agricoles et les industries alimentaires, comme colorants des boissons et antioxydants, ils peuvent être aussi des précurseurs de tanins [9,18,19].

On peut constater d'autre rôle biologique des flavonoïdes comme antispasmodique, antibactériens, hypocholestérolémiants, anti-agregante plaquettaire, anti-tumorales, anti-azotémique, diurétique et anti-ulcère gastrique [28]

7/ Propriétés antioxydants des flavonoïdes

Les polyphénols et surtout les flavonoïdes sont des antioxydants puissants susceptibles d'inhiber la formation des radicaux libres et de s'opposer à l'oxydation des macromolécules [39]. En effet, les flavonoïdes sont des piègeurs efficaces des radicaux libres les plus pro-oxydants, particulièrement impliqués dans la peroxydation lipidique, puisqu'ils la préviennent comme le α -tocophérol. Ils formeraient des espèces radicalaires intermédiaires peu réactives [26,40]. Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de l'oxydation des LDL (Low Density Lipoprotein) [40].

A cause de leurs faibles potentiels redox, les flavonoïdes (Fl-OH) sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants (R^\cdot), comme le super oxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde, par transfert d'hydrogène et le radical flavonoxy (Fl-O \cdot) qui en résulte peut réagir avec un autre radical pour former une structure quinone stable:

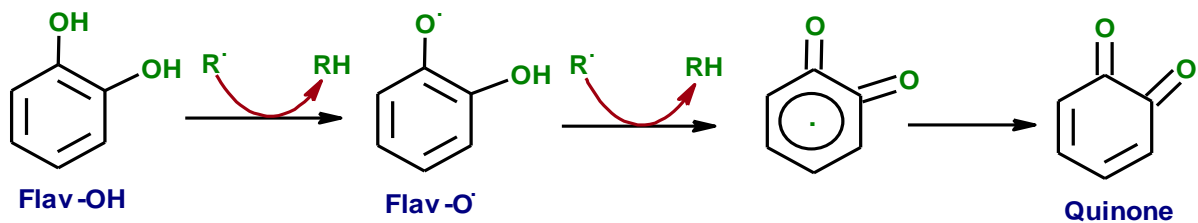
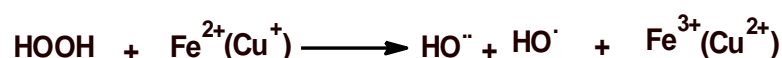


Figure 5 : Piégeage des ROS (Reactive oxygen species) (R^\cdot) par les flavonoïdes.

D'autres études ont montré que les flavonoïdes sont des bons inhibiteurs d'enzymes responsables de la production des radicaux libres comme la xanthine oxydase qui est une source biologique importante du radical superoxyde [41]

Les flavonoïdes sont aussi considérés comme de bons chélateurs d'ions métalliques [26,39], comme les ions du fer (Fe^{2+}) et du cuivre (Cu^+) qui sont essentiels pour certaines fonctions physiologiques, mais ils sont aussi responsables de la production du radical hydroxyle par la réduction du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante:



La quercétine est la plus active des flavonoïdes étudiés. Le Figure 6 résume les sites essentiels pour la chélation des ions métalliques : (a) un noyau catéchol sur le cycle B, (b) les groupes 3- hydroxyle et 4-oxo du cycle C, et (c) les groupes 4-oxo et 5-hydroxyle entre les cycles A et C [39].

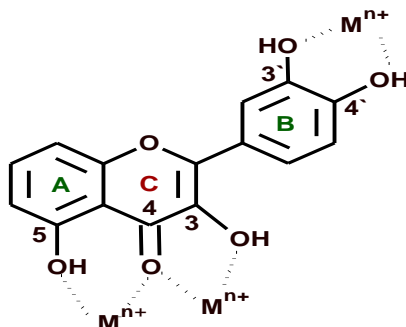


Figure 6 : Flavonoïdes et leurs sites proposés pour la chélation des ions métalliques (M^{n+}) (D' après Van Acker S., and al 1995)

Plusieurs travaux décrivent les relations structures-activités des flavonoïdes [39,42,43,44]. Ces travaux permettent de connaître les activités anti-oxydantes de ces molécules en fonction de leurs caractéristiques structurales. En fait, leur activité anti-radicalaire nécessite:

a- Les molécules possédant une double liaison entre les carbones C2 et C3 et un groupement carbonyle en C4 sont les flavonoïdes dont les activités anti-oxydantes sont les plus marquées, ainsi l'activité de la quercétine (un flavonol) est deux fois plus élevée que celle de la catéchine (un flavan-3-ol). Ceci est dû au fait que la quercétine possède une double liaison C2-C3 et une fonction 4-oxo [39,42].

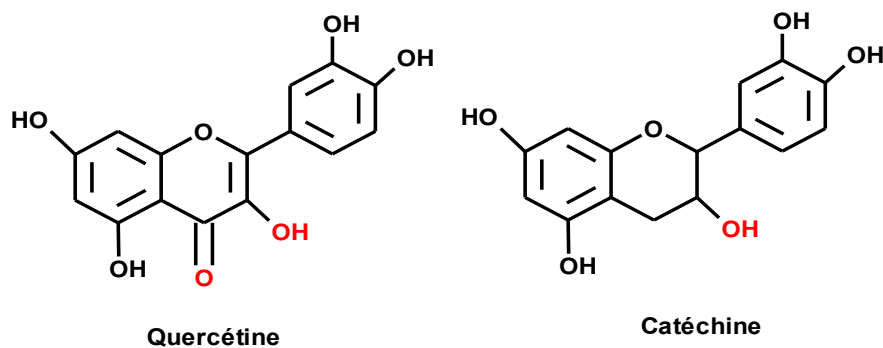


Figure 7 : Comparaison entre deux pentahydroxyphénols [42].

b- La structure ortho-diphénolique du cycle B (les groupements hydroxyles en position C3'- C4') ainsi qu'un nombre important de résidus hydroxyles augmenteraient le potentiel antioxydant des flavonoïdes possédant un hétérocycle saturé [44]. Rice-Evans C.A., and al 1996 ont développé un test basé sur la capacité d'un antioxydant à piéger le radical cation chromophore, l'activité des flavonoïdes est comparée avec celle du Trolox (une forme soluble de α -tocophérol), et exprimée en TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity).

Il est à noter que plus la valeur de TEAC est élevée plus la molécule est active. Les résultats de cette étude ont montré que la Morine avec deux groupements hydroxyles en méta et le kaempférol avec un seul groupement hydroxyle sont moins actifs que la quercétine (deux groupements hydroxyle en ortho). Figure 8

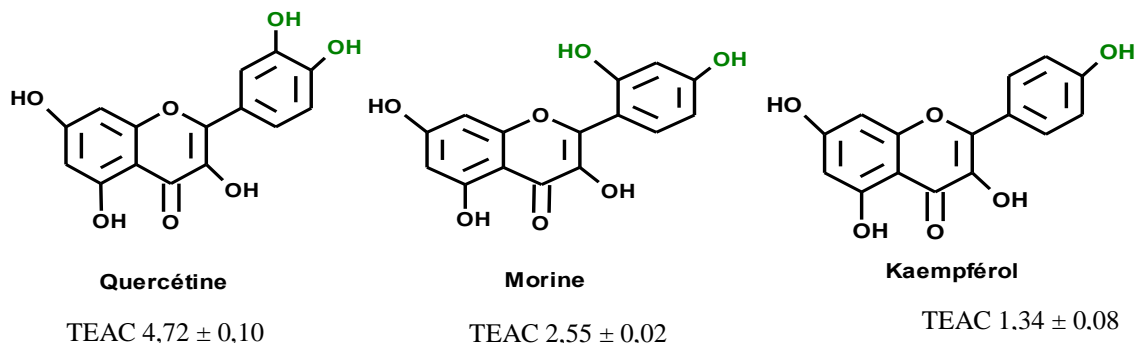


Figure 8 Valeurs de TEAC montrant l'importance du groupement catéchol au niveau du cycle B pour l'activité antioxydante des flavonols [43].

c- Les flavonoïdes inactivent et stabilisent les radicaux libres grâce à leur groupement hydroxyle (C3-OH) fortement réactif. Rice-Evans et ses collaborateurs (1996) ont démontré l'importance ce dernier. En effet, La glycosylation du groupe 3-OH de la quercétine (cas de la rutine) ou sa suppression (cas de la lutéoline) diminue l'activité antioxydante.

En analysant tous ces résultats concernant la capacité des flavonoïdes à piéger les radicaux libres on peut conclure que la quercétine satisfait à tous ces critères, elle dérive du motif flavonol, sa structure particulière lui confère les caractéristiques les plus souvent mises en avant dans l'activité d'un flavonoïde. Elle est le composé le plus actif de la famille des flavonoïdes [43].

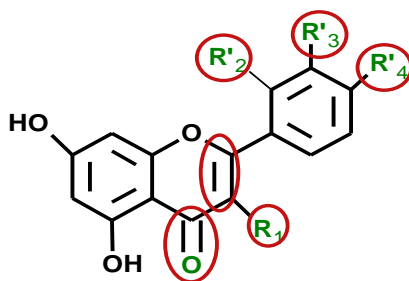


Figure 9 : Eléments essentiels pour l'activité anti-oxydante des flavonoïdes [43].

8/ Propriétés pro-oxydantes :

Nous avons décrit précédemment les propriétés anti-oxydantes des flavonoïdes mais il ne faut pas négliger leurs propriétés pro-oxydantes. Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables de l'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène.

En définitive, certains flavonoïdes pourraient accélérer la survenue de l'atteinte oxydative de l'ADN, des protéines et des glucides *in vitro*. Alors, le potentiel pro-oxydant de ces composés ne doit pas être négligé dans le mécanisme d'action des flavonoïdes [17].

1.3. Hétérosides naturels :

Le terme hétéroside désigne des substances variées qu'on trouve surtout chez les plantes, et résultant de la combinaison du groupe réducteur d'un ose avec une substance non glucidique, l'aglycone. Pour les hétérosides naturels, l'aglycone se combine par l'intermédiaire soit d'un hydroxyle alcoolique ou phénolique (O-hétérosides), soit d'un thiol (S-hétérosides), soit d'un groupe aminé (N-hétérosides).

1.3.1. Propriétés générales :

Le rôle biologique des hétérosides n'est pas clairement établi. On les isole des plantes sous forme de substances solides, en général cristallisées ; la plupart ont un goût amer. Leurs solutions ont un pouvoir rotatoire (lévogyre en général). Sous l'action des acides, ces corps se scindent par hydrolyse en une ou plusieurs molécules d'oses et en une fraction non glucidique. Cette hydrolyse peut être aussi obtenue sous l'action d'enzymes spécifiquement actives sur un hétéroside ou sur une classe d'hétérosides apparentés. Les aglycones ont des structures variées, mais ils contiennent toujours un groupe hydroxyle (OH) qui assure la combinaison avec le glucide. Sur le plan chimique, un hétéroside est un acétal mixte et présente toutes les propriétés de ce genre de combinaison. La plupart des hétérosides naturels ont reçu une dénomination dérivée du nom botanique de la plante dont on les extrait. Ainsi, l'arbutoside ou arbutine

substance amère, incolore et cristallisée, obtenue à partir des feuilles de l'arbuste à feuilles persistantes « *Arbutus uva ursi* » fut retrouvé dans d'autres plantes, telles que le poirier (feuilles, écorce, racines). L'arbutoside est hydrolysé par les acides ou par les enzymes, telle la β -D-glucosidase (émulsine des amandes amères) en D-glucose et hydroquinone, qui représente l'aglycone ; le nom chimique de l'arbutoside est donc *para*-hydroxyphényl β -D-glucopyranoside. Les hétérosides sont habituellement assez solubles dans l'eau. [45]

- 1/ Kaliyaperumal A., Kumarakurubaran S., Saradha D. M., (2013). *Cynodon dactylon* (L.) Pers . Journal of Medicinal Plants Research Vol. 7(48), pp. 3477-3483.
- 2/ Duke J.A., (1983). Handbook of Energy Crops.(unpublished). Purdue University, Center for New Crops and Plants Products, West Lafayette, Indiana 1-5p
- 3/ Buranie D., (1996). Fleurs de méditerranée, éd Bordas colluction L'œil nature 287p
- 4/ Choukri I.S., (1994). Les plantes fleuri leur activités, évolutions et classifications. Egypte pp 207-233
- 5/ Negre R., (1961). Petite flore des regions arides du Maroc occidental, éd Centre national de la recherche scientifique. Paris p 66
- 6/ Karthik D., Ravikumar R., (2011). Proteome and phytochemical analysis of *Cynodon dactylon* leaves extract and its biological activity in diabetic rats. Biomed. Prev. Nutr. 1(1):49-56.
- 7/ Rai DK., Sharma RK., Rai PK., Watal G., Sharma B., (2011). Role of aqueous extract of *Cynodon dactylon* in prevention of carbofuran induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rat brain. Cell. Mol. Biol. 57:135-142.
- 8/ Singh SK, Kesari AN., Gupta RK., Jaiswal D., Watal G., (2007). Assessment of antidiabetic potential of *Cynodon dactylon* extract in streptozotocin diabetic rats. J. Ethnopharmacol. 114(2):174-179.
- 9/ Rabea G. T., (1987). Contribution à l'étude de fusariose du palmier-dattier « *Phoenix dactylifera* » l'identification des flavonoïdes. université des sciences et technologies Houari Boumediene Alger p150
- 10/ Saroja M., Annapoorani S., (2012). Antitumor activity of methanolic extract of *Cynodon dactylon* leaves against Ehrlich ascites induced carcinoma in mice. J. Adv. Sci. Res. 3(1):105-108.
- 11/ Oudhia P., (1999). Medicinal weeds in rice fields of Chhattisgarh (India). Int. Rice Res. 24(1):40-41.
- 12/ Santhi R., Annapoorani S., (2010). Efficacy of *Cynodon dactylon* for immunomodulatory activity. Drug Invent. Today. 2(2):112-114.
- 13/ Baba Aissa F., (1991). Plantes médicinales en Algérie. Ed Bouchène Alger. p48
- 14/ Benzahi K., (2001). Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante *Cynodon Dactylon* (L) Pers. Université Kasdi Merbah, Ouargla, p 113, N° d'ordre : THE.CH.01/31/2.
- 15/ Lhuillier, A. (2007) Contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* Hook.f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de doctorat. Toulouse.
- 16/ Cook, N.; Samman, S. (1996), Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. Nutritional Biochemistry, 7, 66-76.

- 17/ Milane, H., (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de doctorat Strasbourg.
- 18/ Raphael, I., (1969). Natural products : a laboratory guide, Academic Press, London, New York and San Francisco p1-23
- 19/ Bruneton J., (1993). Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales 2 ème édition : Lavoisier, Paris, pp 264-293.
- 20/ Saidman, E.; Yurquina, A.; Rudyk, R.; Molina, M. A. A.; Ferretti, F. H., (2002). A theoretical and experimental study on the solubility, dissolution rate, structure and dipolar moment of flavone in ethanol. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 585, (1-3), 1-13.
- 21/ Javillier M., Polonovski M., Florkin M., Boulanger P., Lemoigne M., Roché J., Wurmser R., (1969). *Traité de biochimie générale*. Tome 3 : Les processus biochimiques et de synthèse et de dégradation. Fascicule 2 : Métabolisme des glucides et des lipides. Masson et Cie Editeurs Paris
- 22/ Harborne, J. B., (1973). *Phytochemical methods.*, ed. Chapman and Hall
- 23/ Harborne J. B., Grayer R. J., (1993). *The Flavonoids, Advances in research since 1986*, éd J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, 617-652p
- 24/ Heller W., Forkmann G., (1993). *The flavonoids, Advances in research since 1986*, éd. J. B. Harborne, Chapman and Hall, London, 499-535p
- 25/ Bruneton J., (1999). *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes médicinales 3^{ème} édition*. Tec and Doc (ed). Paris 575p.
- 26/ Puppo A., (1992). Effect of Flavonoids on Hydroxyl Radical Formation by Fenton-Type reactions; Influence of the Iron Chelator. *Phytochemistry*, 31(1):85-88.
- 27/ Pelt J.M. (2001) *Les nouveaux actifs naturels*. Marabout. Paris.
- 28/ Paris M, Hurabelle M., (1981). *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie)*, vol.1, Masson, Paris, , p.47.
- 29/ Da Silva E.J.A., Oliveira, A. B., Lapa, A.J., (1994). Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46(2) : 118-22.
- 30/ Galati E. M., Monforte M. T., Kirjavainen S., Forestieri A. M., Trovato A., Tripodo M. M., (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmacol* 40(11) : 709-12.
- 31/ Middleton, E. J., (1996). Biological properties of plant flavonoids: an overview. *Int. J. Pharmacol* .34 (5): 344-348.

- 32/ Vrijzen R., Van Hoof L. M., Vlietinck A. J., Vanden Berghe D. A., Boeye A., (1987). The poliovirus induced shut-off of cellular protein synthesis persists in the presence of 3-methylquercetin, a flavonoid which blocks viral protein and RNA synthesis. *Antivir. Res.*7(1): 35-42.
- 33/ Ono K., Nakane H., Fukushima M., Chermann J. C., Barre-Sinoussi F., (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *Eur. J. Biochem.* 190(3) : 469-76.
- 34/ Spedding G., Ratty A., Middleton E. J., (1989). Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antivir. Res.* 12(2) : 99-110.
- 35/ Mahmood N., Pizza C., Aquino R., De Tommasi N., Piacente S., Colman S., Burke A., Hay A. J., (1993). Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antivir. Res.* 46(7): 1257-71.
- 36/ Ohemeng K. A., Schwender C. F., Fu K. P., Barrett J. F., (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3(2): 225-30.
- 37/ Kato R., Nakadate T., Yamamoto S., Sugimura T., (1983). Inhibition of 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin: possible involvement of lipoxygenase inhibition. *Carcinogenesis* 4(10):1301-5.
- 38/ Verma A. K., Johnson J. A., Gould M. N., Tanner M. A., (1988). Inhibition of 7, 12-dimethylbenz (a)anthracene- and N-nitrosomethylurea-induced rat mammary cancer by the dietary flavonol quercetin. *Cancer Res.* 48(20) : 5754-8.
- 39/ Van Acker S., Tromp M., Haenen G. R. M. M., van der Vijgh W., Bast A., (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide Radical. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 214(3) :755-9.
- 40/ Laughton M.J., Halliwell B., Evans P.J., Houlst J., Robin S., (1989). Antioxydant and pro-oxydantactions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. *Biochem. Pharmacol.*38 (17): 2859-2865.
- 41/ Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S., (1994). The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med.* 16, 845–850.
- 42/ Harborne J. B., Williams C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* **55** : 481-504.
- 43/ Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20 : 933-956.
- 44/ Woodman O. L., Meeker W. F., Boujaoude M. (2005). Vasorelaxant and antioxidant activity of flavonols and flavones. *J. Cardiovasc.Pharmacol.* **46** : 302-309.

- 45 Kueny-Stotz M., (2008). Contribution à la chimie des flavonoïdes : élaboration de squelettes flavylum sophistiqués, nouvelle voie d'accès aux flavan-3-ols et aux proanthocyanidines. Thèses de doctorat, Université Louis Pasteur.

CHAPITRE II :
« Matériels et Méthodes »

II.1. Matériels

II.1.1. Lieu d'étude :

La récolte a été effectuée le mois de décembre 2010 dans une des exploitations de la région de Ouargla situé à trois kilomètres Nord-Est de la ville de Ouargla, s'étend sur une superficie de 360 m², elle comprend 60 palmiers plus les rejets des palmiers.

D'après l'étude réalisée en 2001, a montré que les flavonoïdes se trouvent dans toutes les parties de la plante. De ce fait dans ce travail, nous avons étudié la plante entièrement.

II.1.2. Extraction et dosage des hétérosides flavoniques :

La méthode d'extraction utilisée a été décrite par Fougbe et coll., (1976). Cette méthode permet l'extraction des composés poly phénoliques, en particulier des flavonoïdes. Les extraits éthanoliques ont été obtenus par une macérations et agitation de 200g du matériel végétal pendant 24 H dans 2l de mélange éthanol / eau (80 / 20 : V / V). Le rapport solvant / matériel végétal utilisé était de 10 / 1 (ml / g) [1]. L'extrait est filtré puis concentré sous vide à 40°C sous une pression réduite. Le résidu est repris avec de l'eau bouillante (600ml) puis laisser reposer une nuit puis filtré. La phase aqueuse est dégraissée avec l'éther diéthylique (3×200 ml), puis extraite par l'acétate d'éthyle (3×200 ml), par la suite on procède à évaporation de la phase organique à sec à 40°, finalement reprise de résidu par 5 ml de méthanol.

En fin la phase aqueuse est extraite avec du butanol (3×200 ml) puis l'évaporation de la phase butanolique à sec à 40°C et reprise le résidu par 10ml de méthanol.

Les étapes d'extraction sont résumées dans le Figure 10

Remarque: l'extrait d'acétate d'éthyle contient des mono hétérosides et les aglycones et par fois les di hétérosides d'autre part l'extrait butanolique contient des poly hétérosides plus les *C-glycoside*. [2].

Matériels et Méthodes

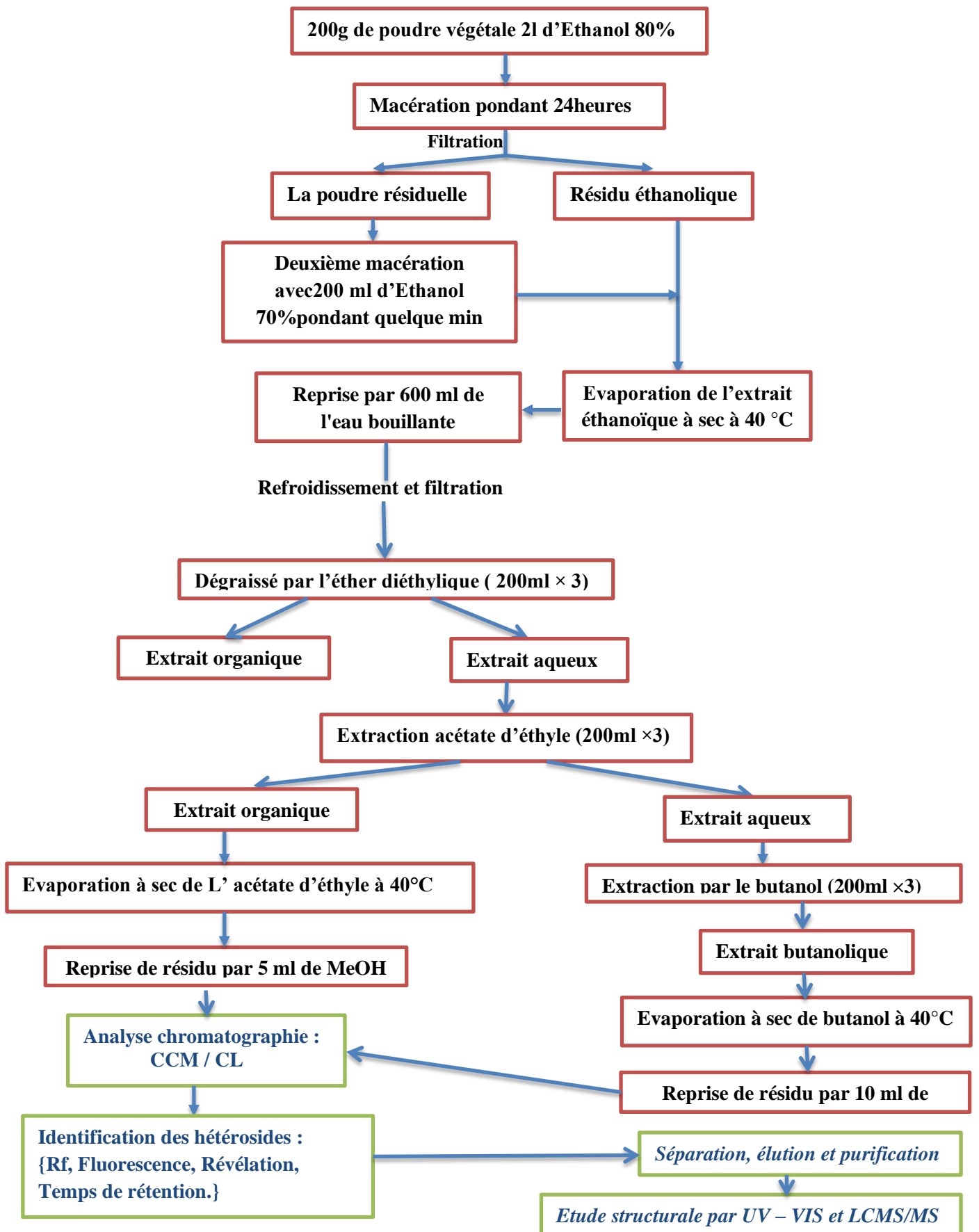


Figure 10 : Etapes d'extraction et d'identification des flavonoïdes hétérosidique [3]

II.1.3. Calcul des rendements en extraits secs :

Nous pouvons déterminer le rendement de la plante en extraits sec (extrait acétate d'éthyle et l'extrait de butanol) en calculant le rapport suivant :

$$Rd_t (\%) = (P1 - P2 / P3) \times 100$$

Rd_t : Rendement total.

P1 : Poids du ballon après évaporation.

P2 : Poids du ballon vide.

P3 : Poids de la matière végétale de départ.

Pour avoir la composition chimique des deux extraits (acétate d'éthyle et butanol) nous avons procédé à une analyse chromatographique sur couche mince (CCM) et pour séparer les composés hétérosidiques on a utilisé une techniques chromatographiques de séparation, en l'occurrence, la chromatographie sur colonne (CC).

II.2. Techniques de séparation et d'identification:

II.2.1. Chromatographie sur couche mince :

La Chromatographie sur Couche Mince ou CCM est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires de phytochimie pour la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné. Cette technique est basée sur la migration des composés d'un extrait déposé sur une phase stationnaire par une phase mobile. Les plaques de CCM utilisées sont des plaques d'aluminium constituées de silica gel de type 60 F254. Les plaques mobiles utilisées sont les solvants suivants :

Tableau 4: Solvants d'élution

<i>Solvants d'élution</i>	<i>Proportions</i>
Acétate d'éthyle ; Ethanol ; Eau	10/1.65/1,35
n Butanol ; Acide acétique ; Eau	4/1/5 (phase supérieur)
Toluène ; Acétate d'éthyle; Acide formique	5/4/1
Toluène ; Acétate d'éthyle; Méтанол	7,5/1,5/1
Toluène ; Acétate d'éthyle; Méтанол/3 goutte d'acide formique	7,5/1,5/1 +3 goutte AF
Toluène ; Acétate d'éthyle; Méтанол	7,5/0,5/2

1/ Résolution frontale : (*Le facteur de rétention*)

Varie avec la variation des conditions de séparation (le solvant d'élution et le support), il est calculé selon la formule suivante :

$$R_f = d \text{ soluté} / d \text{ solvant}$$

d soluté : Distance parcourue par le composé.

d solvant : Distance parcourue par le solvant entre le dépôt et le front de ce solvant.

D'après la bibliographique il a une relation étroite entre les vitesses des composés et le nombre de substitutions (OH, OMe, glycosides) selon le Tableau 5, par exemple l'augmentation du nombre des OH diminue la mobilité des composés flavoniques donc la valeur des R_f diminue et l'augmentation des groupements méthoxyles (OMe) entraîne une augmentation des R_f [4,5], sachant que la polarité des solvants influe sur la séparation des flavonoïdes dans le cas des aglycones des flavonols, les chalcones, et les auronos on peut les séparés par des solvants apolaires mais les flavonol-3-glycosides, flavanones catechins etc.... perd sa mobilité dans les solvants aqueuse [4].

Tableau 5 : Relation entre le R_f et la Structure des flavonoïdes.

Structure des flavonoïdes	R_f
▪ Augmentation des groupes hydroxyls	▪ R_f diminue dans les systèmes des solvants organiques et augmente dans les systèmes des solvants aqueux.
▪ Méthylation des hydroxyles	▪ R_f augmente dans les systèmes des solvants organiques et diminue dans les systèmes des solvants aqueux.
▪ Glycosylation	▪ R_f augmente dans les systèmes de solvants aqueux et diminue dans les systèmes des solvants organiques.
▪ Acylation	▪ R_f augmente dans les solvants organique et diminue dans les solvants aqueux.

2/La fluorescence :

Chaque composé flavoniques ou chaque classe est caractérisé par une couleur spécifique absorbe ou émettre dans le domaine UV ou Visible, le Tableau suivant nous donne les couleurs des différents types flavoniques [4].

Tableau 6: Couleurs des flavonoïdes avec ou sans réactifs

<i>Réactif</i>	<i>La source</i>	<i>La couleur</i>	<i>La classe des flavonoïdes</i>
Aucun réageant	Visible	Orange, mauve	Anthocyanes
		Jaune brillée	Chalcones, aurones
		Jaune clair	Flavones
	UV 253 nm	Une absorption noire	Iso flavones, flavone
	UV 300 nm	Marron faible	Flavonol-3-glycosides, flavones
		Jaune brillée	Flavonol avec groupe 3-OH libre
Jaune vert		Flavonol sans OH à la position (5)	
UV	La couleur bleue	3,5-methoxy flavonols	
	Mauve	l'absence des OH libre on position 3	
Les vapeurs de NH ₃	UV	Changement de couleur	la plupart des flavonoïdes
Borohydrate de sodium - AlCl ₃ éthanolique	Visible	Rouge	flavanones
Acide p-toluène sulfonique	Visible	Rouge ou orange (après le chauffage pendant 10 min à température	flavan-3,4-diol
2,4,6-trinitrophenol dans éthanol ou KOH éthanolique	Visible	105 °C Rouge	Flavan-3-ols (types catechine)

II.2.2. Chromatographie d'adsorption sur colonne :

C'est une technique de séparation liquide-solide dans laquelle la phase stationnaire ou adsorbant est contenue dans une colonne et la phase mobile peut être un solvant unique ou un mélange de solvants.

Les extraits concentrés de l'Acétate d'éthyle (1 g) et de butanol (2 g) ont été fractionné avec cette chromatographie dans une colonne de gel de silice, et élué avec les solvants (Toluène/Acétate d'éthyle) (Acétate d'éthyle/Méthanol) (Méthanol) (Méthanol/Eau) (Méthanol/Eau/Acide formique) selon le tableau suivant :

Tableau 7: Proportions des phases mobiles (Toluène/Acétate d'éthyle), (Acétate d'éthyle/Méthanol), (Méthanol), (Méthanol/Eau) et (Méthanol/Eau/Acide formique) pour la chromatographie sur colonne.

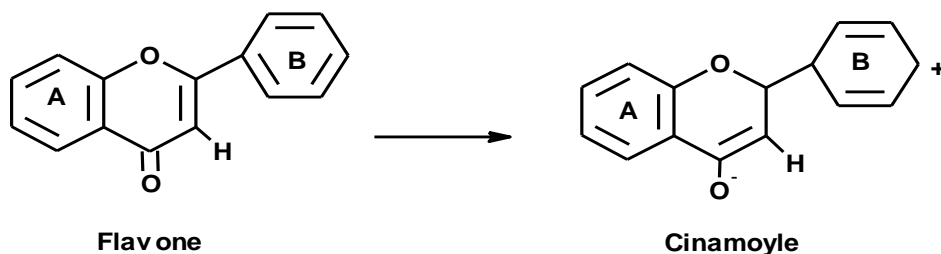
Les solvants d'élutions	Les proportions (%)	Nombre des fractions
Toluène /Acétate d'éthyle	80/20	20
Acétate d'éthyle/ Méthanol	60/40	20
	80/20	20
	60/40	20
	40/60	20
	20/80	20
Méthanol	100	20
Méthanol/ Eau	40/10	6
Méthanol/Eau/Acide formique	7,85/0,7/1,45	6

Le nombre des fractions globales est 140 fractions pour l'extrait d'Acétate d'éthyle et 152 fractions pour l'extrait de butanol chaque 3 min. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM (F1, F2 à F24)

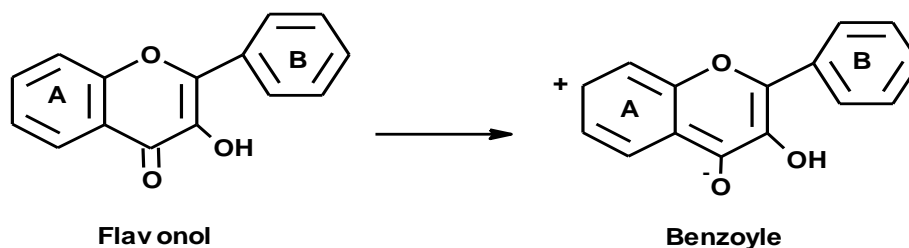
II.2.3. Spectrophotométrie UV-visible :

La spectrophotométrie est une étape déterminante de l'identification structurale d'un composé, qu'il soit natif ou qu'il résulte d'une hydrolyse acide, l'interprétation des spectres dans le méthanol ou en présence des réactifs s'appuie sur les règles décrites par *Jurd (1962)*[6] reprise par *Mabry and al 1970* complétées par *Voirin (1983)* [7].

D'après la bibliographie le spectre d'absorption ultraviolet des flavones et les flavonols dans le méthanol présentent généralement deux bandes d'absorption, la bande I située vers 300 à 400 nm correspondant à la structure de Cinamoyle, et ayant une relation avec noyaux A et B :



La bande II se trouve vers 240 nm à 270 nm, attribuable à la structure Benzoyle suivante :



La bande II présente un seul maximum vers 270 nm dans le cas des flavones et des flavonols substitués en position 4, par contre dans le cas de deux substitutions en 3 et 4 cette bande présente deux maximums (A, B) d'intensité entre 250 et 275 nm [5].

Tableau 8: Relation entre le maximum d'absorption en UV et les classes flavoniques

La classe flavonique	Bande I	Bande II
Flavone	320-350	250-270
flavonol	352-385	250-280
flavanone	300-330	245-275
isoflavone	300-330 ep	245-275
Chalcone	340-390	230-270
Aurone	380-430	230-270
Anthocyanidine	465-560	270-280

La substitution des flavones et les flavonols à un effet sur le déplacement des deux bandes (I et II) (le déplacement de la longueur d'onde λ). En règle générale l'addition d'un hydroxyle libre provoque un effet bathochrome (déplacement vers les grandes longueurs d'onde), d'autre part une méthylation ou glycosylation des groupements 3, 5 et 4' hydroxylés provoque un déplacement hypsochrome est noté pour la bande I [4,5].

Pour cette raison on utilisera des réactifs pour identifier la substitution structurale des composés flavoniques :

1/ le réactif NaOMe ou NaOH (solution méthanolique N/100) :

Ionise tous les hydroxyles libre qu'elle que soit leur position sur la molécule, en provoquant un déplacement bathochrome des bandes I et II de +45 à +65 nm sur la bande I dans le cas d'un hydroxyle libre en position 4' sans diminution de l'intensité.

Les flavonols qui contiennent des groupes OH libres en position 3 et 4 sont instable dans le méthoxyde de sodium NaOMe.

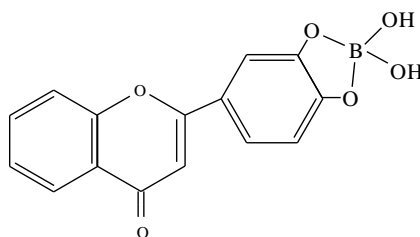
Un OH libre en 7 peut être marque au niveau du spectre dans le méthoxyde de sodium par l'apparition d'une troisième bande comprise entre 320 – 335 nm par rapport au spectre de Méthanol.

2/ Le réactif NaOAc anhydre :

Ionise les hydroxyles les plus acide, c'est-à-dire ceux en positions 3',4' et 7. L'ionisation de l'hydroxyle en position 7 provoque un déplacement bathochrome de la bande II de 5 à 30 nm

3/ Le réactif NaOAc / H₃BO₃ :

Le NaOAc / H₃BO₃ forme un complexe avec les groupes hydroxylés en position ortho (ortho-dihydroxyle) existants sur le noyau flavoniques comme suit :



Les flavones et flavonols possèdent des groupes ortho-dihydroxyles en position 3 et 4 provoque un déplacement bathochrome de bande I entre 12 et 30 nm et un déplacement de 5 à 10 nm en cas de l'existence de des groupes ortho-dihydroxyles sur le cycle A (C-6, C-7 ou C-7, C-8) par la présence de ce réactif,

4/ Le réactif AlCl₃ et AlCl₃ /HCl :

Le chlorure d'aluminium (solution méthanolique 1%) forme un complexe avec les composés ayant un hydroxyle en 3 ou 5 et la fonction carbonyle suivant le figure 11.

Il provoque un dédoublement des bandes (I, II) suivait par un déplacement bathochrome différent, environ de 45 nm pour les 5-hydroxyflavones et de 60 nm pour les flavonols, d'autant plus elle forme un complexe avec les systèmes orthodihydroxyle (3 et 4 dans le cycle B et 6, 7 ou 7, 8 dans le cycle A), mais l'ajout d'HCl à un extrait méthanolique avec le chlorure d'aluminium détruit le complexe formé avec les système orthodihydroxyle,

Ce que nous permet d'identifier la présence des deux hydroxyle en position ortho par une simple comparaison des spectres obtenus d'une part avec le chlorure d'aluminium seul, et d'autre part avec le chlorure d'aluminium acidifié.

L'existence de système '3 et '4 dihydroxyles provoque un déplacement hypsochrome de la bande I entre 30 et 40 nm, mais la présence de système 6-7 ou 7-8dihydroxyle donne un déplacement hypsochrome de 20 à 25 nm.[4, 5]

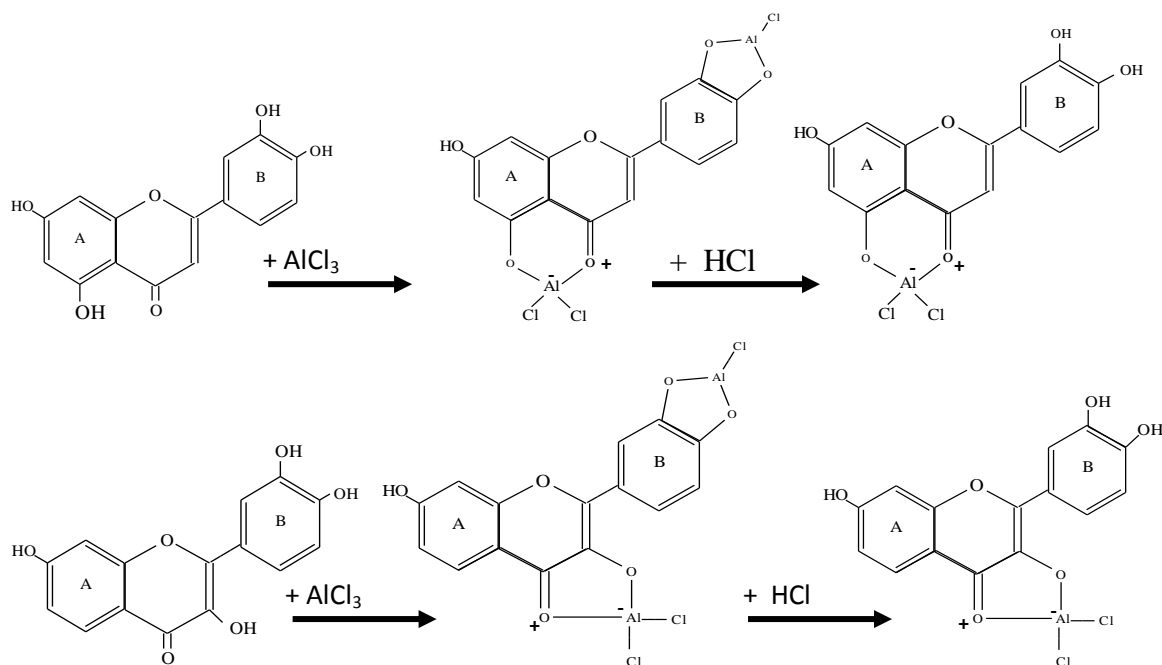


Figure 11 : Effet de chlorure d'aluminium dans HCl sur les composés ayant un hydroxyle en 3 ou 5 et la fonction carbonyle

II.2.3.1. Appareillage :

Nous avons effectué le dosage et l'identification structurale avec le spectrophotomètre U.V fabriqué en France :

- * Type spectro Scan 80 DV (100nm – 800nm) .
- * Lampe UV: VL-4-LC.
- * Puissance: 8w
- * Matériels utilisés: 1/ Une cuve en quartz de 1cm X 4 cm.

2/ Méthanol pour les extraits.

II.2.3.2. Mode opératoire :

Après la séparation des composés flavoniques par les différentes techniques chromatographiques (CCM et CC) les composés isolés sont analysés par mesure de leur spectre d'absorption UV-Vis dans le méthanol, ainsi que leur déplacement bathochromique, hypsochromique, suite à l'addition des réactifs spécifiques comme suit :

- * 1^{er} étape : déterminer le spectre méthanolique de chaque filtrat.

- * 2^{ème} étape : on prend 5ml de chaque extraits plus 1 goutte de hydroxyde de sodium (NaOMe ou NaOH) après 5 min analysé par le spectrophotomètre pour avoir le spectre.
- * 3^{ème} étape : 5 ml de chaque filtras plus 02 pincées de NaOAc déterminé le spectre correspond puis on ajoute 01 pincée de H₃BO₃ réaliser le spectre UV des solutions.
- * 4^{ème} étape : 5 ml des extraits méthanolique des filtras plus 05 gouttes de AlCl₃ identifié le spectre UV des solutions puis ajouté 01 goutte de HCl analysé par le spectrophotomètre pour avoir le spectre.

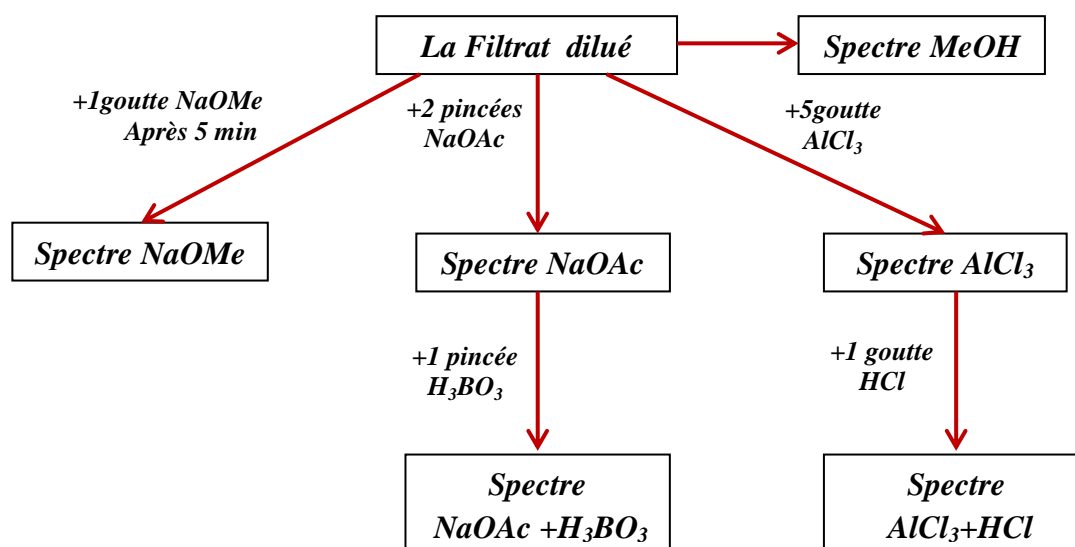


Figure 12: L'addition des réactifs

Tableau 9 : Déplacements observé dans les deux bandes (I, II) en présence des réactifs [7].

<i>les réactifs</i>	<i>Les déplacements de la bande I (nm)</i>	<i>Les déplacements de la bande II (nm)</i>	<i>Interprétation</i>
NaOMe/MeOH	$\Delta\lambda(I) = +45$ à $+65$ *sans diminution de l'intensité *diminution de l'intensité on comparant par le méthanol. *l'intensité diminue avec le temps plus une décomposition.		[OH] en 4' [OR] en 4' ou [OH] en 3 Ortho di [OH] sur A en (6,7) ou (7,8) ou [OH] en 3 et 4'
	Nouvelle bande par apport au méthanol entre (320 et 335)		[OH] en 7
NaOAc/MeOH		$\Delta\lambda(II) = +5$ à $+30$ * déplacement diminué en présence d'un substituant en 6 ou 8 . * Pas de déplacement ou très faible. * Spectre qui se décompose avec le temps.	[OH] en 7 [OR] en 7 tri-OH en 5, 6, 7 ou tri-OH en 5, 7, 8
NaOAc+H₃BO₃/MeOH	$\Delta\lambda(I) = +12$ à $+36$ $\Delta\lambda(I) = +05$ à $+10$		Ortho di-OH sur B Ortho di-OH sur A (6,7) ou (7, 8).
AlCl₃	Une seule bande entre 420-430.		Ortho di-OH sur B avec OH en 5
AlCl₃/MeOH	$\Delta\lambda(I) = +20$ à 45 $\Delta\lambda(I) = +60$		[OH] en 5 flavone [OH] en 3 flavonol
AlCl₃+HCl/MeOH	$\Delta\lambda(I) = +17$ à $+20$ $\Delta\lambda(I) = +35$ à $+55$		[OH] en 5 avec une oxygénation en 6 . [OH] en 5 et [OCH₃] en 3
AlCl₃+HCl/ AlCl₃	$\Delta\lambda(I) = -30$ à -40 avec un sommet ou épaulement entre [350-360]. $\Delta\lambda(I) = -20$ à -25		Ortho di-OH sur B (3', 4') Ortho di-OH sur A (6,7)

(/) = par rapport à.

(-) = hypsochrome.

(+) = bathochrome

II.2.4. Chromatographie liquide haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (LC MS/MS) :

Le couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse est devenu courant dans la chimie analytique. C'est une technique très répandue dans l'étude des extraits des plantes à cause de sa robustesse et la possibilité d'analyse sur une large gamme de masse et de polarité moléculaire.

C'est grâce à la chromatographie que la résolution des composés isomères peuvent être mis en évidence au sein des mélange, la spectrométrie de masse est une technique qui permet la détermination du poids moléculaire des aglycones et les hétérosides ainsi que le nombre et la nature des substituants (hydroxyles ou méthoxyles) [8, 9]. Les ruptures de liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, donnent des ions fragments caractéristiques, ces derniers fournissent des renseignements utiles, notamment sur la substitution des noyaux A et B [9].

La spectrométrie de masse est une technique de caractérisation chimique qui consiste à mesurer les rapports masse/charge (m/z) des différentes fragmentations d'un échantillon afin de déduire la structure chimique d'un composé

La fragmentation des flavonoïdes est explicable par des mécanismes rétro-Diels-Alder (RDA). Les réactions de RDA apparaissent sur des cycles à 6 carbones contenant au moins une double liaison. Un RDA du cycle C entraîne préférentiellement une coupure entre les liaisons 1 et 3 et forme ainsi deux ions fragments, généralement majoritaires, notés $1, 3A^\pm$ et $1, 3B^\pm$. D'autres ruptures de liaisons peuvent intervenir selon le mode d'ionisation et la classe de molécules étudiées [10].

Il existe deux types de fragmentation. Fragmentation en mode positif et en mode négatif.

1/ Le mode négatif est plus communément utilisé pour l'identification structurale par LC MS/MS des flavonoïdes car il est plus sélectif et plus sensible [11, 12]. En mode négatif, la voie principale de fragmentation reste la coupure de la liaison 1/3 du noyau C. Les ions fragments obtenus $^{1,3}A^-$, $^{1,3}B^-$ et $[^{1,3}A^-CO_2]$ sont généralement les ions majoritaires.

Cependant d'autres voies de fragmentation, (1,2), (1,4) et (0,4), peuvent être observées. Il a été remarqué que la rétrocyclisation liée à la coupure (1,2) et qui induit les ions $[^{1,2}A^-H]$, $[^{1,2}B^-H]$, $[^{1,2}A^-CO]$, $[^{1,2}A^-CO-CO_2]$ est spécifique aux molécules substituées par deux hydroxyles sur le noyau B. Ces ions étant très peu observables lorsque le noyau B est non substitué [10, 12].

2/ En mode positif, les voies de fragmentation qui sont majoritairement observées résultent d'un clivage des liaisons (1,3), (0,2), (0,4) ou (1,4) [13,14]. Le schéma de fragmentation obtenu est dépendant du nombre de substitutions et de la classe de flavonoïdes étudiée, ainsi la présence d'un hydroxyle en position 3, comme pour les flavonols, induit plus de possibilités de fragmentation par rapport à des molécules ne portant pas de groupe hydroxyle dans cette position [11]. Parmi les différents fragments, l'ion $^{1,3}A^+$ se retrouve dans toutes les classes de flavonoïdes et est généralement le plus abondant. Par ailleurs, en raison d'hydroxylations biosynthétiques en position 5 et 7 sur le noyau A, l'ion résultant $^{1,3}A^+$ est souvent informatif sur la classe de flavonoïdes étudiée. Il correspond à un rapport m/z de 153 pour les flavones et flavonols, et de 139 dans le cas des flavanes et flavanols qui ne possèdent pas de cétone en position 4 [14, 15].

Plus spécifiquement il a été démontré que les fragmentations RDA des flavonols génèrent majoritairement des coupures (1,3) et (0,2), et que l'ion $^{1,3}B^+$ était remplacé par l'ion [$^{1,3}B^+-2H$] [14].

De plus, l'ion $^{0,2}A^+$, propre aux flavonols, peut être utilisé pour confirmer la présence de cette structure moléculaire [10]. Moins fréquent le clivage (1,4) produit l'ion [$^{1,4}A^+-2H$] comprenant le noyau A et un atome d'oxygène [13, 15].

Les différents mécanismes de fragmentation des flavones et des flavonols sont récapitulés dans les Figure 13,14 pour le quercétine [16] et la luteoline [17] pris comme exemples.

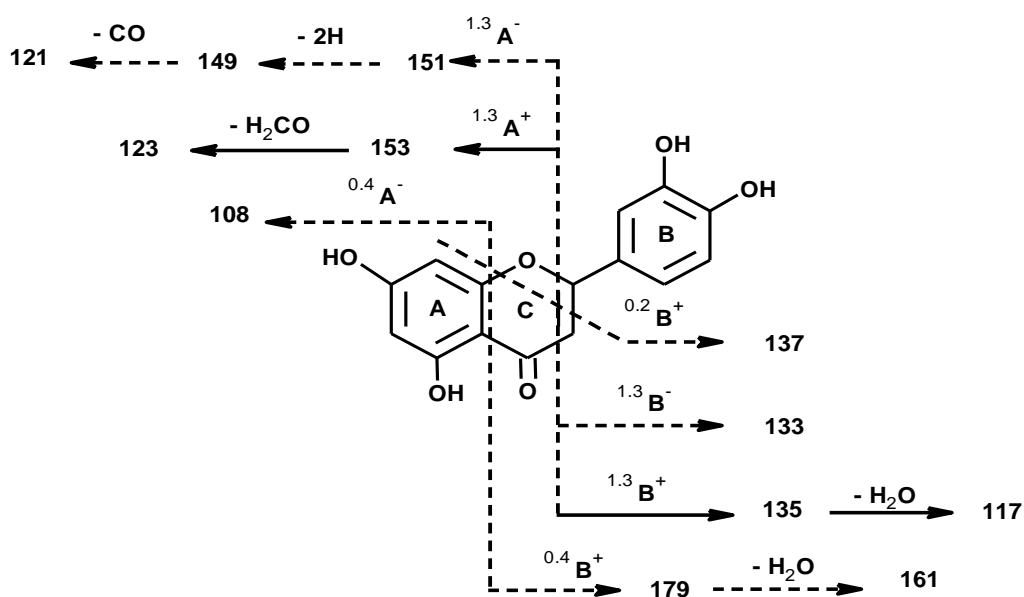


Figure 13 : Fragmentations principales des ions de la luteoline [$M+H$] $^+$ et [$M-H$] $^-$ [17]

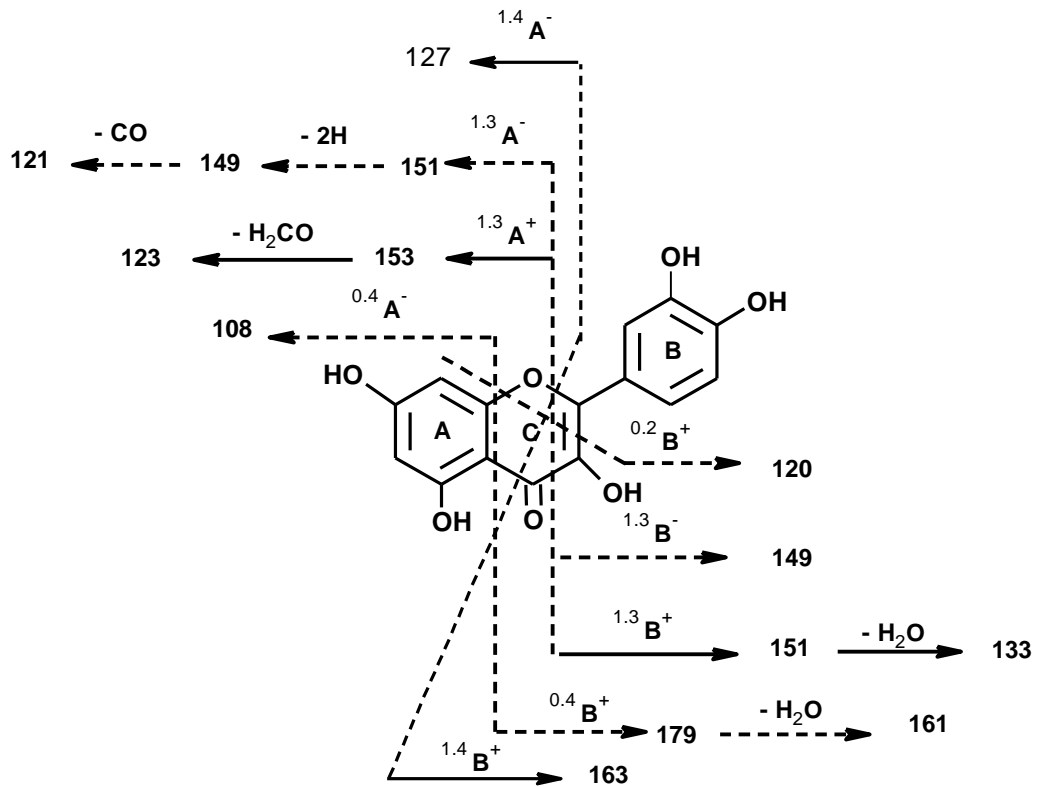


Figure 14: Fragmentations principales des ions de la quercétine $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ [16]

Pour plus de détails sur les fragmentations du quercétine et la lutéoline en mode négatif $[M-H]^-$ les figures nous donnent les différents fragmentations obtenus en mode négatif pour les deux composés selon *Nicolas Fabre and Isabelle Rustan 2001* [18].

La fragmentation tirée dans le schéma des deux composés peut être appliquée aux autres composés.

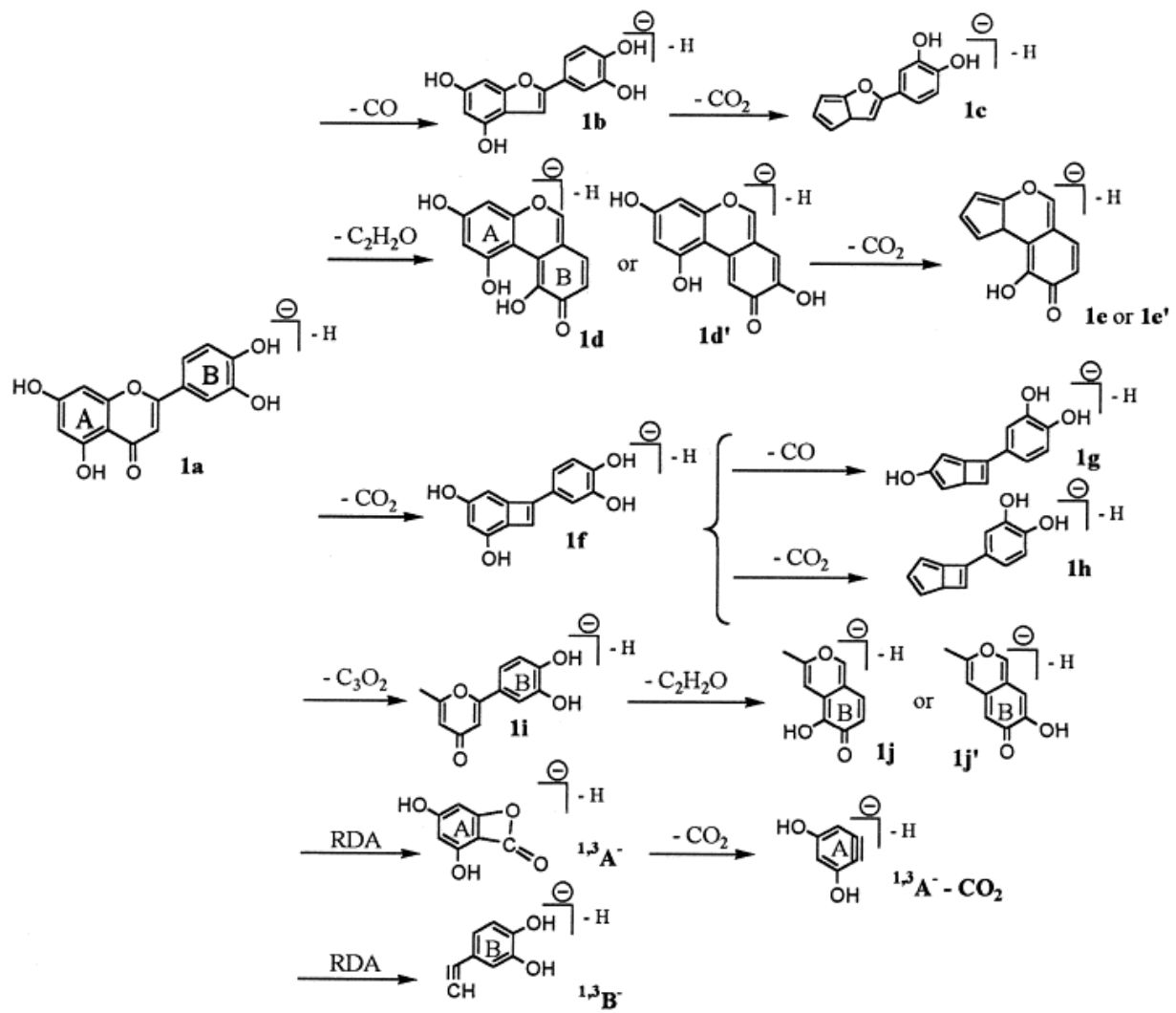


Figure 15 : Différentes fragmentations de la lutéoline en mode négatif [18].

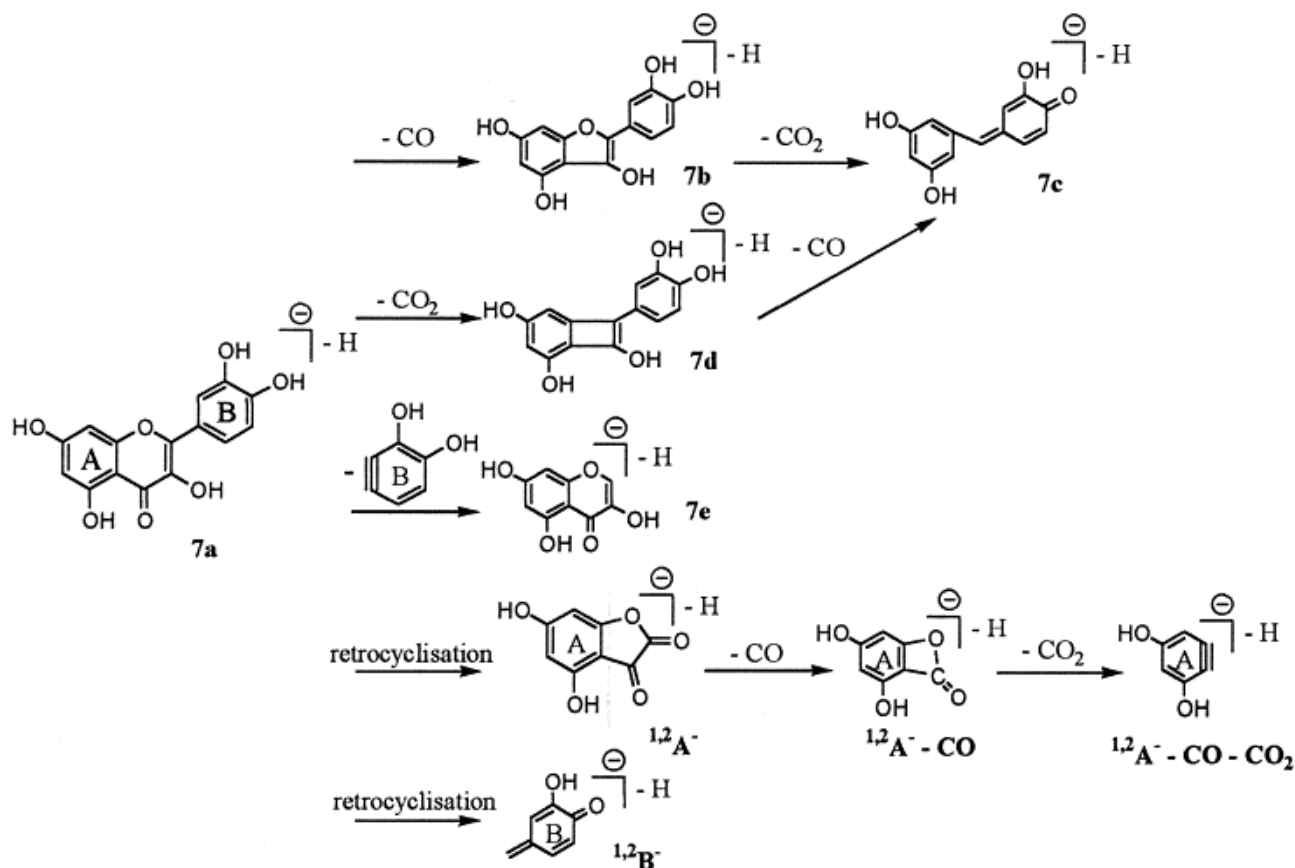


Figure 16: Différentes fragmentations de la quercétine en mode négatif [18].

II.2.4.1. Appareillage :

Toutes les fractions ont été analysées par l'appareil de LC/MS-MS de marque « **Agilent** » qui comprend :

* un système de chromatographie liquide à haute performance « HPLC 1260 infinity LC » qui nous assure une performance basée sur trois critères importants en matière d'analyse de chromatographie en phase liquide :

- plus grande vitesse d'analyse (gain de solvants et de temps)
- plus grande résolution (identification des impuretés)
- plus de productivité qui permet d'interrompre l'analyse en cas de fuite

* Un spectromètre 6420 triple quadripôle à double MS qui est conçu pour répondre à une demande d'analyse à haute productivité, cette technologie de pointe intègre la technique d'ionisation orthogonale, un concept de quadripôle hyperbolique, une cellule de collision hexapolaire à haute pression avec accélération linéaire, et un détecteur de dynode à haute énergie, excentré.

Associé avec l'algorithme Autotune, le logiciel MASS HUNTER fournit les performances quantitatives les plus élevées actuellement disponible.

II.2.4.2. Caractéristiques techniques de l'appareil:

*** HPLC 1260 Infinity LC :**

- Détecteur UV à barrette des diodes (DAD) ultrasensible qui offre la plus basse limite de détection avec une haute stabilité de la ligne de base, une vitesse d'acquisition de 80 Hz et une assimilation de 8 pics en même temps, ce qui est très important dans l'analyse des impuretés réactionnelles ou d'extraction de molécules cibles.
- Détecteur de fuite dans tous les modules qui permet d'interrompre l'analyse en cas de fuite
- Système hydraulique : double pompe à double pistons en série
- Injecteur automatique Infinity 1260 comprenant un bac de 100 positions, réputé pour la précision et la reproductibilité de ses résultats avec des volumes d'injection allant de 0.1 à 100 µL
- Compartiment colonne thermostatée qui offre une parfaite stabilité de température de chauffage ou de refroidissement de la colonne (de 15 à 80°C) pour une optimisation totale de la vitesse et de la sélectivité de la séparation.
- Plage de longueur d'onde varie entre 190 et 950 nm

*** Agilent 6420 triple quadrupole :**

- Limite de détection est de l'ordre de pico-gramme et femto-gramme
- Taux de scan maximal est de 12,500 Da /s
- Système de purge : pompe turbo moléculaire avec une pompe mécanique

II.2.4.3. Les conditions d'analyse :

Il existe plusieurs types de sources d'ionisation sont énumérées ci-dessous :

- * Ionisation par électrospray (ESI)
- * Ionisation par impact électronique (IE) permet d'analyse des Aglycones seulement.
- * Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)
- * bombardement par atomes rapides (FAB. Fast Atom Bombardment). Cette technique

l'ion moléculaire n'est pas toujours observable.

Dans notre étude les échantillons sont ionisé par électrospray (ESI Electropray Ionisation) ce type d'ionisation est repose sur l'introduction d'une solution aqueuse de l'échantillon à analyser dans un capillaire porté à un potentiel élevé (positif ou négatif). L'analyse a été faite par une colonne C18, avec une phase mobile :

A : acide formique /eau (1 : 99 v/v)

B : méthanol

Le gradient utilisé est :

Le gradient	Le temps
De 2 à 90% de B	0 - 35 min
De 90 à 2% de B	35 - 38 min
2% de B	38 - 45 min
La vitesse d'écoulement : 0,9 ml/min, T= 408 °C	

Le gaz appliqué en sortie du capillaire pour évaporer la phase mobile est du diazote. Les expériences de MS/MS ont été réalisées avec de l'argon comme gaz de collision.

II.3. Activité anti oxydante des hétérosides flavoniques :

II.3.1. Test au 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) :

II.3.1.1. Principe

Le composé chimique 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle) (DPPH) fut l'un des premiers radicaux libres utilisé pour étudié la relation structure-activité antioxydant des composés phénoliques [19, 20]. Il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote (Fig.1). Le DPPH est un radical libre de couleur violette qui devient jaune quand il est réduit par un donneur d'un atome H \cdot .

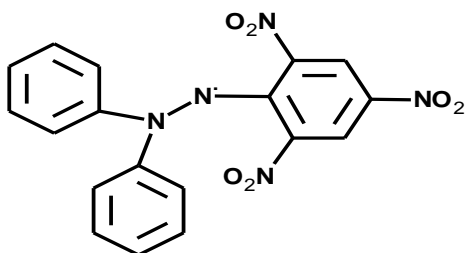


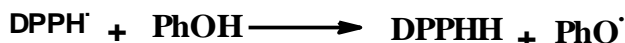
Figure 17 : Le radical libre DPPH \cdot (2,2- DiPhényle-1-Picryl-Hydrazyle)

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes:

a/ la libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certaines acides et dérivées phénoliques).

b/ la libération d'un électron (cinétique lente des dérivées glycolyses et des anthocyanes) [21, 22]

Dans le cas des composés phénoliques (Φ -OH), le mécanisme principal d'action est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH• alors transformé en une molécule stable DPPHH [23, 24]



L'activité des extraits de plantes a été étudiée par le 2, 2'-diphénylpicrylhydrazyle (DPPH) selon la méthode de Parejo *et al.* (2000) [25].

II.3.2.2. Mode opératoire :

Une gamme de concentrations (0-200 $\mu\text{g/mL}$) d'extrait de plantes ou de la Quercétine (antioxydant de référence) est préparée dans le méthanol. Un volume de 2,5mL de cette solution, est mélangé à 2,5mL de DPPH (100 μM) préparé également dans le méthanol. Après homogénéisation, le mélange est incubé à la température ambiante (25 °C) à l'abri de la lumière. Après 30 minutes d'incubation, l'absorbance est lue à 517 nm contre un « blanc » qui ne contient que du méthanol. Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I%) est calculé selon l'équation suivante :

$$I\% = (1 - (\text{DO essai} / \text{DO blanc})) \times 100$$

I% : pourcentage d'inhibition du radical

DO : densité optique.

La CI50 qui est la concentration d'extrait de plante ou de la Quercétine responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits et de la Quercétine.

II.3.2. Teste par la réduction de fer (FRAP) :

II.3. 2.1. Principe :

Le pouvoir réducteur d'un extrait est associé à son pouvoir antioxydant. Cette technique a été développée pour mesurer la capacité des extraits testés à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le complexe $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en fer ferreux (Fe^{2+}). En effet le Fe^{3+} participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm [26]. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [27]

II.3.2.2. Mode opératoire :

Test de la réduction du fer FRAP : Le pouvoir réducteur du fer (Fe^{3+}) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu 1986. Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations (de 0,007 à 2,5 mg/ml) est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 min ensuite, 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. Un aliquote (2,5 ml) de surnageant est combinée avec 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (UV-VIS spectrophotomètre). Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; quercitine dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés [28].

II.4. Activité antibactérienne :

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales récentes suggèrent que les composés flavoniques très abondants dans les plantes médicinales et alimentaires possèdent un pouvoir antioxydant et antibactérien remarquable ; ils pourraient ainsi jouer un rôle dans la prévention des maladies infectieuses, cardiovasculaires et cancéreuses [29, 30].

Selon Kaliyaperumal A., et al (2013) la plante *Cynodon dactylon* « L » Pers a plusieurs propriétés médicinales telle que diurétique, cholagogue, hépatoprotecteur, anti-inflammatoire, antiviral, antibactérien, hypotenseur, hypoglycémiant, hémostatique, dépurative, astringent [31].

elle peut être utilisée notamment [32] :

- lutter contre les infections génito-urinaires (cystites, calculs, lithiases urinaires, urétrites, oliguries, etc.) ;
- améliorer le système respiratoire (asthme, bronchites, etc.) ;
- cicatriser les blessures superficielles ;

Ou encore pour soigner :

- les gripes chez l'enfant.
- les conjonctivites.
- l'hypertension artérielle.
- les coliques néphrétiques.

- les irritations de la peau.
- les migraines.
- les inflammations intestinales.

II.4.1. Principes actifs antibactériens :

* Les composés avec la plus grande efficacité antibactérienne et le plus large spectre sont les phénols (thymol, carvacrol et eugénol). Les phénols entraînent notamment des lésions irréversibles sur les membranes et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quelle que soit leur localisation [33].

* Les alcools avec 10 atomes de carbone (ou monoterpénols) viennent immédiatement après les phénols, en terme d'activité, avec le géranol, linalool, thujanol, myrcénol, terpinéol, menthol et pipéritol pour les plus connus. Molécules à large spectre, elles sont utiles dans de nombreuses infections bactériennes [33].

* Les aldéhydes sont également quelque peu bactéricides. Les plus couramment utilisés sont le néral et le géranial (des citrals), le citronnellal et le cuminal [33].

* Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Des études fondamentales ont également montré que les alcools et les lactones sesquiterpéniques avaient une activité antifongique [33].

L'objectif de notre présente étude consiste à déterminer l'activité antibactérienne des extraits flavonique de la plante vis-à-vis de six souches bactériennes pathogènes pour l'homme.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 10 µl de chaque extrait [34]. Selon les souches nous avons utilisé comme milieux de culture les milieux suivants :

- * Gélose Mueller Hinton pour les bactéries non exigeantes.
- * Gélose Mueller Hinton qui contient 5% sang du cheval pour les bactéries exigeantes.

Les deux extraits (acétate et butanol) ont été solubilisés dans du DMSO pour obtenir des concentrations décroissantes (C, C/2, C/4, C/8 et C/16). A partir d'une solution mère de concentration égale respectivement à 413,5g/l et 1875,975g/l.

II.4.2. Souches bactérienne utilisées:

Tableau 10 : Souches bactérienne étudiées :

Les bactéries utilisées	Caractéristiques des bactéries	
	L'exigence des bactéries	Type de Gram
<i>Escherichia coli</i> : ATCC 25922	Bactéries non exigeantes (souches de références)	Gram -
<i>Enterococcus faecalis</i> : ATCC 29212		Gram +
<i>Klebsiella pneumoniae</i> : ATCC 700603		Gram -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ATCC 27853		Gram -
<i>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 25923		Gram +
<i>Streptococcus pyogènes</i>	Bactéries exigeantes (des prélèvements (pus) de malades)	Gram +

ATCC : American type culture collection

II.4.2.1. Mode opératoire :

Nous avons utilisé la technique de diffusion sur milieu solide. C'est une méthode similaire à celle de l'antibiogramme qui consiste à déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou de plusieurs produits. Un disque stérile de papier filtre (Watman n°1) de 6 mm de diamètre est imprégné des concentrations croissantes d'extraits (les différents concentrations préparé de deux extrait acétate d'éthyle et butanol) à raison de 10µl par disque [35], ce dernier est ensuite placé sur de la gélose non inhibitrice (gélose Mueller Hinton et gélose au sang) coulée dans des boîtes de Pétri standard sur 4 mm d'épaisseur et préalablement inoculées avec les souches bactériennes choisies à l'aide d'un écouvillon trempé dans l'inoculum bactérien. La concentration de l'inoculum utilisée est de l'ordre de 10^6 à 10^8 C.F.U/ml. Les boîtes sont incubées à une température de 37°C pendant 18 à 24 heures.

Si le produit est toxique pour l'espèce de bactéries, il se forme une zone d'inhibition ou un halo transparent autour du disque. Plus grande est cette zone, plus l'espèce est sensible.

Tableau 11: Valeurs limites des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence décrit par NCCLS (national committee for clinical laboratory standards) et pour 10 µl de chaque extrait. [36]

Les bactéries	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (mm)		
	Résistant	Intermédiaire	Sensible
<i>Escherichia coli</i> : ATCC 25922	≤12	13 -14	≥15
<i>Enterococcus faecalis</i> : ATCC 29212	≤10	11 -14	≥15
<i>Klebsiella pneumoniae</i> : ATCC 700603	≤12	13 -15	≥16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> : ATCC 27853	≤12	13 -14	≥15
<i>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 25923	≤10	11 -15	≥16
<i>Streptococcus pyogènes</i>	≤10	11 -13	≥14

II.4.2.2. Les Bacilles Gram négatifs :

Parmi les espèces de bacilles Gram négatif les plus courantes dans les établissements de soins de santé, on compte *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. et *Stenotrophomonas maltophilia*, ainsi que des espèces appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, comme *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* [37]. Certains événements récents indiquent que la résistance des bactéries Gram négatif aux antimicrobiens est de plus en plus fréquente. Les antimicrobiens du groupe des carbapénèmes sont un traitement sécuritaire et généralement efficace contre les infections bactériennes Gram négatif lorsque la résistance aux autres classes d'antimicrobiens est présente. Lorsque les bactéries sont résistantes aux carbapénèmes, il y a souvent peu de traitements de rechange d'offerts CDC. [38]

1. *Escherichia coli* : ATCC 25922 :

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud [39]. La majorité des souches de *E. coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches de *E. coli* dites entérohémorragiques (ECEH). Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'ECEH sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux mal cuits ou consommés crus. Les fruits et les légumes frais, ayant été en contact avec ces souches peuvent

être également à risque. La souche *ATCC 25922* est un contrôle de la qualité couramment utilisé souche, en particulier dans des analyses de sensibilité [40].

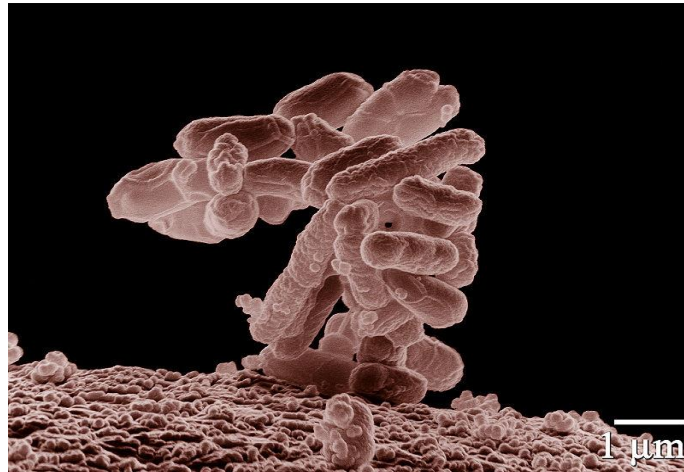


Figure 18 : *Escherichia coli* : *ATCC 25922*
(Castellani et Chalmers 1919)

2. *Klebsiella pneumoniae* :

Le genre *Klebsiella* (*klebsielles*), de la famille des entérobactéries, comporte cinq espèces (ci-contre) dont l'espèce-type *Klebsiella pneumoniae* qui est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50 %). Ces bactéries causent jusqu'à 5 % des infections urinaires communautaires et 9 % des nosocomiales [41].

Ce germe est à l'origine de certaines infections des voies respiratoires, comme celles des poumons et plus spécifiquement des bronches ainsi que des angines, plus spécifiquement chez les sujets fragilisés comme les diabétiques, les personnes âgées ou encore les alcooliques. Récemment, cette bactérie s'est avérée résistante à différents antibiotiques comme les céphalosporines de troisième génération et les aminosides les plus récents. Cette résistance est due au fait que *Klebsiella* est l'hôte privilégié de certains éléments appelés des plasmides. Les plasmides sont des corps formés d'un fragment d'acide désoxyribonucléique (ADN) sans relation avec le chromosome. (*Sante-Médecine. Novembre 2014*)

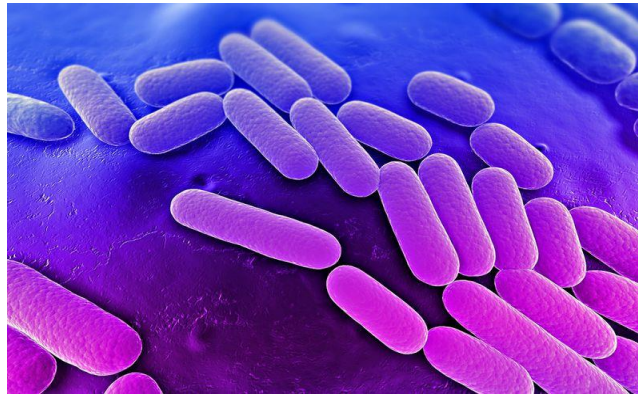


Figure 19: *Klebsiella pneumoniae*
(Podschun and Ullmann 1998)

3. *Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa est responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales. Capable de s'adapter à des environnements très divers en raison de sa très grande plasticité génétique, il est capable d'infecter presque tous les sites anatomiques (ils préfèrent le système respiratoire en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose)

P. aeruginosa est invasif et t'oxygène, en raison de la production de facteurs de virulence de surface (qui lui permettent de s'attacher, de coloniser, et d'envahir les tissus), et sécrétés (qui endommagent les tissus et déclenchent des processus Inflammatoires). Il est souvent difficile de distinguer entre colonisation et invasion pathogène en l'absence d'outil diagnostic adéquat. *P. aeruginosa* infecte rarement les tissus sains, mais envahit aisément tous les tissus où les défenses sont compromises, ce qui explique le caractère essentiellement nosocomial des infections qu'il provoque.

les principales infections causées par *P. aeruginosa* « tractus respiratoire, sang, tractus urinaire, oreille, peau et tissus mous, œil, systèmes nerveux central, cœur, os et articulations et tractus gastro-intestinal ».

Les mortalités les plus élevées sont observées en cas de bactériémie chez les patients neutropéniques (30-50 %) [42], en cas de pneumonie nosocomiale (45-70 %) pour laquelle il est l'agent principal en cas de ventilation assistée [43], et en cas d'infection pulmonaire chez des sujets atteints de mucoviscidose [44].

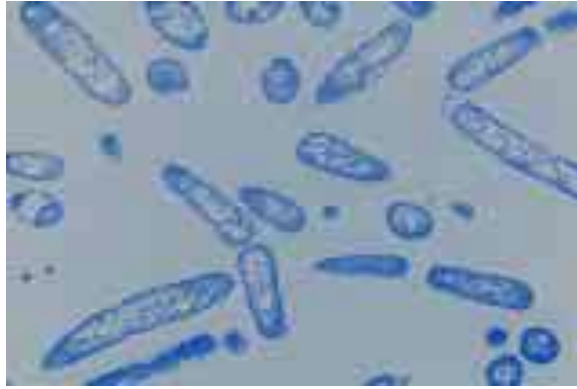


Figure 20 : *Pseudomonas aeruginosa*
(Pieri et Kirkiacharian, 1992)

II.4.2.3. Les Bacilles Gram positif:

1. *Streptococcus*

Les streptocoques regroupent de nombreuses espèces. Certaines sont des parasites de l'espèce humaine (streptocoques des groupes A, C et G de LANCEFIELD), d'autres des commensaux de la muqueuse buccale (streptocoques du groupe B et streptocoques non groupables et non hémolytiques) ou de la muqueuse génitale (groupe B) ou de l'intestin (anciens streptocoques du groupe D ou entérocoques considérés maintenant comme faisant partie d'un genre à part, le genre enterococcus). D'autres encore sont des commensaux des animaux ou des saprophytes.

Les maladies provoquées par les streptocoques des groupes A, C, G qui sont bêta-hémolytiques ont un pouvoir pathogène similaire. Ils sont responsables des affections suivantes :

- * L'angine rouge ou est l'affection streptococcique la plus fréquente. elle s'accompagne classiquement de fièvre à 39-40°C, de dysphagie par inflammation amygdalienne et péri amygdalienne, d'une adénopathie satellite, de céphalées et d'asthénie.

- * D'autres infections aiguës : cutanées, muqueuses ou septicémiques. Les unes sont locales, comme l'impétigo (enfant : lésions au niveau du visage et des mains de type vésiculo-pustulaire, puis crouteuses, de contagiosité l'érysipèle (placard rouge surélevé, limité par un bourrelet + signes généraux), ou encore sur les infections des plaies et brûlures.

- * Les bactériémies sont souvent secondaires à une infection locale. C'est le cas de la fièvre puerpérale qui fait suite à une infection génitale du post-partum. Il faut citer aussi les endocardites aiguës, les méningites.

* La scarlatine associe une angine et la diffusion à partir du foyer angineux d'une toxine érythrogène sécrétée par le streptocoque. La réaction de DICK consiste à tester la sensibilité du sujet à l'inoculation intradermique d'une faible dose de toxine érythrogène.

* Des syndromes de choc toxique avec défaillance viscérale multiple, identique à celui observé parfois avec *S.aureus* [45]. D'où son nom de TSLS (Toxic shock like syndrom).

* Des affections auto-immunes, conséquences d'infections à streptocoque A. C'est le cas du rhumatisme articulaire aigu (R.A.A.).

Les maladies provoquées par les autres streptocoques :

a. Il peut s'agir d'infections aiguës :

* génitales, qui peuvent se compliquer de fièvre puerpérale, provoquées par les streptocoques du groupe B,

* néonatales sévères : septicémies, méningite dûe au streptocoque du groupe B.

* de localisations diverses (abcès du cerveau, cholécystites).

b. Il peut s'agir d'infections subaiguës dont la plus classique et la plus grave est l'endocardite lente d'OSLER. (*Bactériologie DCEM1 2002 – 2003*)



Figure 21 : *Streptococcus pyogenes*
(Rosenbach 1884)

2. *Enterococcus faecalis* :

La bactérie *Enterococcus faecalis*, une des 100 000 bactéries naturellement présentes dans notre flore intestinale, serait d'inflammations chroniques de l'intestin. Cette bactérie lactique, également présente dans la charcuterie et les fromages fermentés, sécrète l'enzyme à l'origine de ces inflammations, la gélatinase [46].

Comme d'autres espèces du genre *Enterococcus*, *E. faecalis* peut causer des infections mortelles chez l'homme et le singe, particulièrement dans un environnement hospitalier :

Le haut niveau de résistance naturelle aux antibiotiques de la bactérie contribue à sa pathogénicité¹ et au risque nosocomial [46].

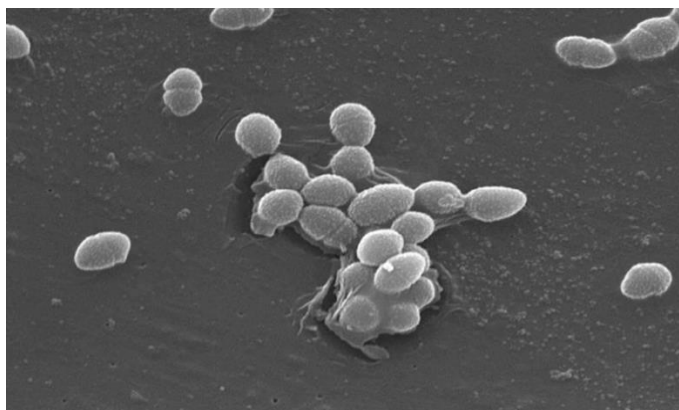


Figure 22: *Enterococcus faecalis*
(Andrewes et Horder 1906)

3. *Staphylococcus aureus* :

Staphylococcus aureus est une Cocco bactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des *Staphylococcaceae*. Il a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 μm , est immobile et facultativement anaérobique; il est habituellement disposé en grappes.

De nombreuses souches produisent des entéro toxines staphylococciques, la toxine super antigénique du syndrome de choc toxique (TSST-1) et des toxines exfoliatives. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau. [47,48,49].

* Les infections liées au staphylocoque doré : *Staphylococcus aureus* est la principale bactérie en cause dans les infections cutanées avec formation de pus notamment dans le cas de furoncles, de panaris, de folliculite, de sycosis, d'impétigo, d'orgelet et de suppurations de plaies et abcès.

Les autres infections localisées liées au staphylocoque doré sont notamment des infections de l'appareil respiratoire (pneumonie et pleurésie), l'endocardite, les infections urinaires, les phlébites, les méningites (*S. aureus* parfois impliqué), les otites et sinusites (*S. aureus* parfois impliqué) et les infections des os (ostéomyélites).

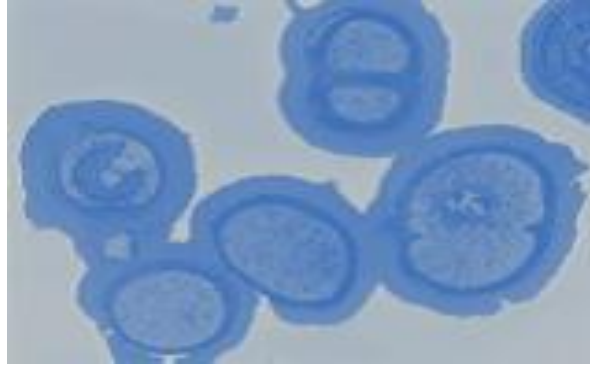


Figure 23: *Staphylococcus aureus*
(Pieri et Kirkiacharian, 1992)

- 1/ Marston A., Hostettmann K., (2006). Separation and quantification of flavonoids. In Oyvind MA, Markham KR. Chemistry, biochemistry and application. Ed. CRC Press Taylor and Francis group, , 2-20.
- 2/ Szent-Gyorgyi A., Rasznyak S., (1936). Nature.138. 27.
- 3/ Fougbe S., Tillequin F., Paris, M., Jacquemin, H. Paris, R.R., (1976). Sur une pipéracée de Guyane, le *Piper marginatum* Jacq. Annal Pharm Fr 34, 339-343.
- 4/ Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B., (1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-verlag Berlin, New York p 313.
- 5/ Rabea G. T., (1987). Contribution à l'étude de fusariose du palmier-dattier «Phoenix dactylifera » l'identification des flavonoïdes. université des sciences et technologies Houari Boumediene Alger p150
- 6/ Jurd L., (1962). Spectral properties of flavonoid compounds. The Chemistry of flavonoid compounds T.A GEISSMANN Ed., Pergamon press, London, 10^e 155p.
- 7/ Voirin B., (1983). UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') or tri-(3',4',5')-substituted B rings. Phytochemistry, 22(10), p 2107-2145.
- 8/ Audier H., (1966). Etude des composés flavoniques par spectrométrie de masse.
- 9/ Nielsen J. G., and Moller J., (1970). *Acta Chem. Scand.*, **24**, 2665.
- 10/ Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. and Brinkman, U.A.T. (2006) Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 31-63.
- 11/ Cuyckens, F. and Claeys, M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(1), 1-15.
- 12/ Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E. and Quetin-Leclercq, J. (2001).Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 12(6), 707-715.
- 13/ Justino, G.C., Borges, C.M. and Florêncio, M.H. (2009) Electrospray ionization tandem mass spectrometry fragmentation of protonated flavone and flavonol aglycones: a reexamination. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(2), 237-248.
- 14/ Ma, Y.L., Li, Q.M., Van den Heuvel, H. and Claeys, M. (1997) Characterization of flavone and flavonol aglycones by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(12), 1357-1364.

- 15/ Wolfender, J.-L., Waridel, P., Ndjoko, K., Hobby, K., R., Major, H., J. and Hostettmann, K. (2000) Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSⁿ for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analisis*, 28(10), 895-906.
- 16/ Es-Safi, N. E., Kerhoas, L., Einhorn, J. and Ducrot, P. H. (2005). *International Journal of Mass Spectrometry* **247**, 93–100
- 17/ March, R. E., Miao, X. S., (2004) *International Journal of Mass Spectrometry* **231** 157–167
- 18/ Nicolas F., Isabelle R., (2001). Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone glycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. *J. American Society for Mass Spectrometry*. 12, 707–715
- 19/ Blois M.S., (1958). Antioxidant determinations by the use of stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- 20/ Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C., (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie*, 28, 25-30
- 21/ Huang D., Ou B., Prior R. L., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- 22/ Nanjo F., Goto K., Seto R., Suzuki M., Sakai M, Hara Y., (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Md.*, 21(6), 895- 902
- 23/ Molyneux P., (2004). The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211-219.
- 24/ Sanchez-Moreno C., Larrauri Jose A ., Saura-Calixto F., (1998). A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.
- 25/ Parejo I., Codina C., Petrakis C. & Kefalas P., (2000). Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH (2,2-diphényl- 1-pycryl-hydrazyl) free radical assay. *J Pharmacol Toxicol Method*, **44** : 507-512.
- 26/ Oyaizu M., (1986). Studies on products of browning reaction- Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44, 307–315.

- 27/ Hubert A.J., (2006). Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja. Etude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaine, Thèse de doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse, école doctorale des Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries, spécialité : qualité et sécurité des aliments, p 174.
- 28/ Singleton V.L., Rossi J.A., (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Technology and Viticulture*. 16, 144-153.
- 29/ Johnson I., (1999). Antioxydants et anticancéreux, *Biofutur*, Vol. 186, 14-17.
- 30/ Nicoli M.C., Anese M. & Parpinel M., (1999). Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables, *J. Trends Food Sci. Technol.*, Vol. 10, 94-100.
- 31/ Kaliyaperumal A., Kumarakurubaran S., Saradha D. M., (2013). *Cynodon dactylon* (L.) Pers . *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 7(48), pp. 3477-3483.
- 32/ Grases F., Ramis M., Costa-Bauza A., March JG., (1994). Effect of *Herniaria hirsuta* and *Agropyron repens* on calcium oxalate urolithiasis risk in rats. *J Ethnopharmacol* .45:211-214
- 33/ Zhiri A., (2006). L'aromathérapie scientifique est une science qui utilise les méthodes et les techniques scientifique de laboratoire pour mettre en évidence la relation entre la structure chimique des molécules actives des huiles essentielles et leurs activité biologiques. *Nutra news* ; Ed: fondation libre choix; p: 9.
- 34/ Sokmen A., Gulluce M., Askin Akpulat H., Daferera D., Tepe B., Polissiou M., Sokmen M., and Sahin F., (2004). The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*; 15: 627-634.
- 35/ Ngameni, B., Kuete, V., Simo I.K., Mbaveng, A.T., Awoussong, P.K., Patnam, R., Roy, R., Ngadjui, B.T., (2009) Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorstenia turbinata* (Moraceae). *South African J Botany*. **75** : 256-261.
- 36/ Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Vétérinaire à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS, 3ème Edition (2005)
- 37/ Sligl W, Taylor G, Brindley PG. (2005). Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility, and outcomes. *Int J Infect Dis*; 10: 320-325.
- 38/ Hernandez, Lopez et al. (2009). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemaseproducing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR*, March;58(10):256-260.

CHAPITRE III :
« Résultats et Discussions »

III.1. Rendements en extraits secs :

Les rendements d'extraction sont regroupés dans le Tableau 11 suivant :

Tableau 12 : Rendement d'extraction

Extrait	Pour 200g de la plante	Le rendement
Extrait d'acétate d'éthyle	519,8 mg	0,2599%
Extrait de butanol	3270,6 mg	1,6353%
Rendement total des hétérosides	18,912g/kg	1,8912 %

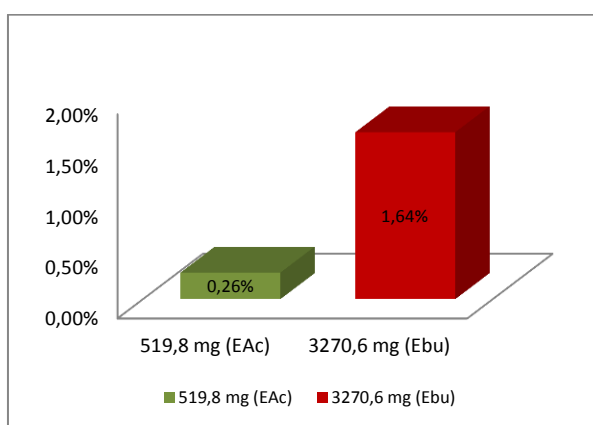


Figure 24 : Rendement d'extraction

III.1.1. Interprétation :

D'après les résultats on constate que la plante contient 2,559 g/kg d'extrait sèche d'acétate d'éthyle plus 16,353 g/kg d'extrait sèche de butanol.

Le rendement total des flavonoïdes hétérosidique dans la plante sèche égale à 18,912 g/kg. On peut dire quelle est riche en comparant avec la plante *Cynodon dactylon* « L » étudié par *Daycem Khlifi en 2013* (la tanisé) [1] ou il a trouvé que le taux des flavonoïdes égale à 5,98 g/kg.

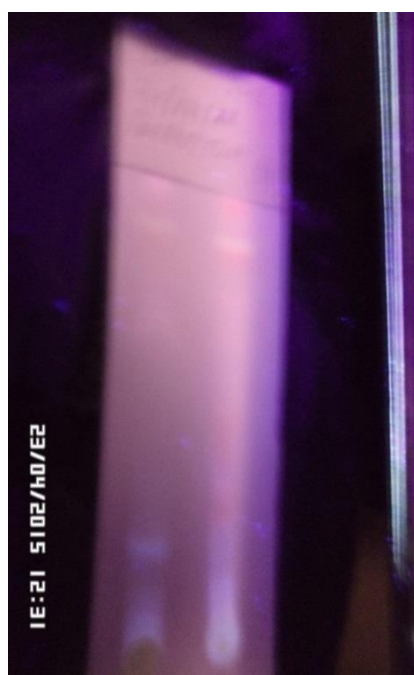
III.1.2. Conclusion :

A la fin de cette étude on peut déduire que les hétérosides représentent 1,8912 % de la plante sèche et on remarque que la fraction butanolique représente le rendement le plus élevé (1,6353%) par rapport au poids de la plante sec.

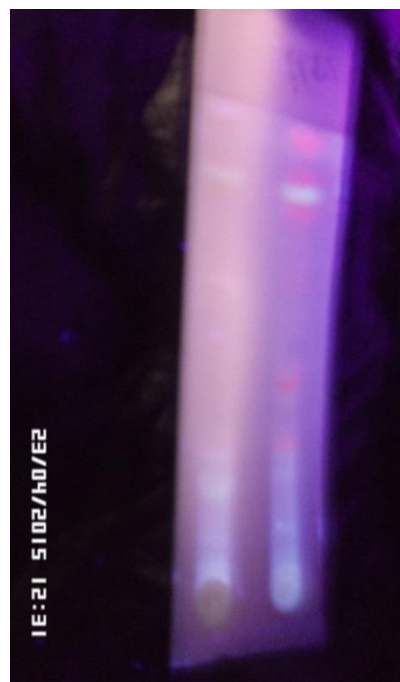
III.2. Résultats d'étude chromatographique :

III.2.1. Résultats de la chromatographie sur couche mince :

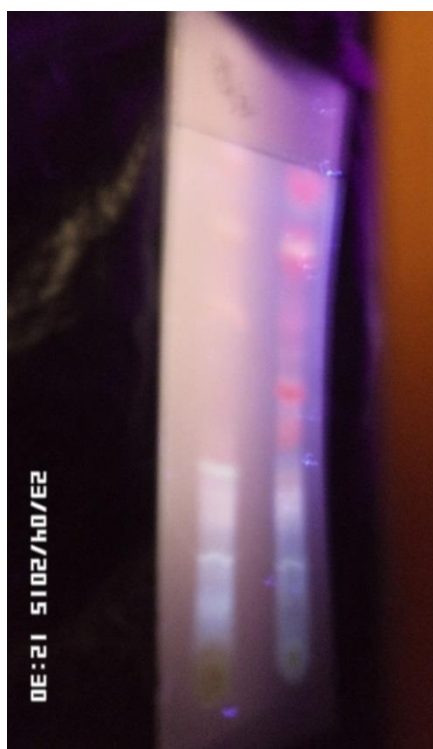
D'après les systèmes des phases mobiles testé pour les deux extrait (Acétate d'éthyle et Butanol) on a déduit que la meilleure séparation a été constaté pour le système Toluène, Acétate d'éthyle et Méthanol (7,5/0,5/2) (v/v/v) d'où nous avons calculé la résolution frontale des composés de deux extraits révélé sous la lampe UV, les résultats sont regroupé dans le Tableau (9) suivant :



Ψ_m : tol / AcEt/MeOH (7,5/1,5/1)



Ψ_m : tol / AcEt/MeOH + 3gouttes Acide formique (7,5/1,5/1)



EBu EAc

Ψ_m : tol / AcEt/MeOH (7,5/0,5/2)

Figure 25: Chromatogramme sur couche mince (CCM) des deux extraits Acétate d'éthyl et Butanol

Ψ_m : la phase mobile

Tableau 13 : Résolution frontale des composés dans les deux mélanges pour la 3^{ème} phase mobile « Ψ_m : tol / AcEt/MeOH (7,5/0,5/2) »

Extrait Acétate d'éthyle		Extrait Butanol	
Les couleurs	Rf	Les couleurs	Rf
Rouge	0,94	jaune clair	0,95
mauve	0,86	Rose	0,89
Jaune	0,83	Jaune	0,84
Purple	0,78	Rose	0,81
Rose	0,69	jaune	0,67
Jaune clair	0,55	Bleu	0,41
orange	0,53	Jaune	0,3
Rouge clair	0,44	Jaune vif	0,2
Jaune	0,31	Bleu	0,13
Jaune vif	0,19		

Le chromatogramme obtenu par la CCM sur gel de silice, présente une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés.

On remarque que l'extrait d'Acétate d'éthyle contient dix (10) composés mais l'extrait de Butanol contient neuf (09) composés

III.2.2. Résultats de la chromatographie sur colonne :

La technique de chromatographie sur colonne de gel de silice est utilisée pour isoler des flavonoïdes hétérosidique du mélange des deux phases acétate d'éthyle et butanol de *Cynodon dactylon* « L » Pers, nous avons collectées 140 fractions pour l'extrait d'Acétate d'éthyle et 152 fractions pour l'extrait de butanol chaque 3 min, le contrôle de ces fractions sur des plaques de silice nous a permis de sélectionner celles qui représentent un seul spot et celle qui contienne la même composition et les regroupé dans une seul fraction l'identification est faite sous la lampe UV à 365 nm .

La colonne utilisée présenté dans la Figure 26 :



Figure 26 : Colonne de fractionnement des deux extraits

Résultats et discussions

Les résultats de cette étude ont été regroupés dans les tableaux 14 et 15 suivants :

Tableau 14 : Fractions de l'extrait d'Acétate d'éthyle

Les fractions initiales	composition	La fraction finale
f1+f2+f3	02 taches	F1
f4+f5	03 taches	F2
f6	02 taches	F3
f7 → f15	01 tache	F4
f6 → f44	?	F5
f45+f46+f47	01 tache	F6
f48	04 taches	F7
f49	02 taches	F8
f50+f51+f52+f53	01 tache	F9
f54+f55+f56	02 taches	F10
f57	01 tache	F11
f58+f59	01 tache	F12
f60+f61	01 tache	F13
f62+f63+f64	02 taches	F14
f65 → f73	01 tache	F15
f74+f75+f76	02 taches	F16
f77+f78+f79+f80	02 taches	F17
f81 → f85	02 taches	F18
f86+f87+f88	03 taches	F19
f89 → f100	02 taches	F20
f101 → f109	02 taches	F21
f110 → f119	01 tache	F22
F120 → f152	?	F23

Tableau 15 Fractions de l'extrait Butanolique

Les fractions initiales	composition	La fraction finale
f1+f2	Plus de 06 taches	F1
f3+f4	03 taches	F2
f5 → f22	?	F3
f23	04 tache	F4
f24 → f28	?	F5
F29+f30	04tache	F6
f31 → f41	?	F7
f42 → f48	?	F8
f49 → f61	?	F9
f62	02 taches	F10
f63+f64+f65	02 tache	F11
F66 → f72	02 tache	F12
f73 → f99	Plus de 02	F13
f100 → f120	02 taches	F14
f121 → f140	?	F15
f141+f142	02 tache	F16
F143+f144+f145+f146	01 taches	F17

Dans nos étude précédente [2] sur la plante *Cynodon dactylon* «L» Pers l'analyse par la Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) a montré l'existence de certains produits dans deux extraits considérés. L'extrait de aglycones contient des produits tels que hesperetin, fisetin, luteolin et l'extrait contient des hétérosides : isorhamnetin and hesperidin.

III.3. Identification structurale des molécules présentes dans les fractions F12, F17 et F22 de l'extrait acétate :

III.3.1. Etude par la spectrophotométrie UV-visible à l'existence des réactifs plus le spectre LC MS/MS :

L'analyse a été effectuée sur 10 fractions entre les deux extraits comme suite :

A/ L'extrait Acétate d'éthyle

F13	→	F1
F14	→	F2
F15	→	F3
F12	→	F4
F17	→	F5
F22	→	F6

B/ L'extrait Butanol

F3	→	F7
F17	→	F8
F15	→	F9
F10	→	F10

Les résultats de la spectrophotométrie UV-visible des fractions dans le méthanol (MeOH) et en présence des différents réactifs (NaOMe, AlCl₃, AlCl₃/HCl, NaOAc et NaOAc/H₃BO₃) sont regroupés dans le tableau 15 suivant :

Tableau 16 : Interprétation des spectres UV/Vis ont été faites selon les recherches de Mabry T.J., et al (1970).

Les fractions Les Réactifs	F12	F17	F22
<i>MeOH</i>	251, 267, 283ép, 349	205, 222ép, 258, 295ép, 375	253, 269, 291ép, 344
<i>NaOMe</i>	260, 328ép, 401	288, 326, 438	272, 364ép, 385
<i>AlCl₃</i>	274, 326ép, 425	275, 296ép, 360ép, 446	273, 300ép, 363, 385
<i>AlCl₃/HCl</i>	276, 295ép, 383	278, 300ép, 428	263ép, 274, 351, 393
<i>NaOAc</i>	252, 318ép ,385	275, 302ép, 396	238ép, 275, 325ép, 352
<i>NaOAc/H₃BO₃</i>	255, 287ép, 370	250ép, 262, 310ép, 378	274, 348

ép : éppaulement

III.3.2. Interprétation :

III.3.2.1. La structure du composé F12

Les spectres de la spectroscopie UV du composé F12 sont présentes dans la figure 27.

* la couleur de composé donné par la chromatographie sur couche mince est purple indique l'existence d'un flavone ou un flavonol substitué en 3

* La longueur d'onde de la bande (I) dans le méthanol (349nm) oriente vers une structure de flavone.

* $\Delta\lambda$ (I) [NaOMe et MeOH]= 52 nm, effet bathochrome sans diminution de l'intensité indique l'existence de « OH » en position « 4' »,

* l'ajoute de AlCl₃ provoque un déplacement bathochrome en comparaison avec le spectre de méthanol sur la bande (I) $\lambda= 425\text{nm}$ avec une seule bande indique l'existence à un system Ortho di-OH sur B avec un OH en position 5.

* $\Delta\lambda$ (I) [AlCl₃/HCl et MeOH] = 34 nm effet bathochrome indique l'existence d'un « OH » en position « 5 ».

* $\Delta\lambda$ (I) [AlCl₃/HCl et AlCl₃] = -42 nm, un effet hypsochrome noté due à l'existence d'un système Ortho di-OH sur B en position « 3' et 4' ».

* $\Delta\lambda$ (II) [NaOAc et MeOH] = 1nm un faible déplacement indique que l'hydroxyle en 7 n'est pas libre (l'existence d'un « OR » en position 7).

* $\Delta\lambda$ (I) [NaOAc/H₃BO₃ et MeOH]= 21nm due à l'existence de système Ortho di-OH sur B en position « 3' et 4' ».

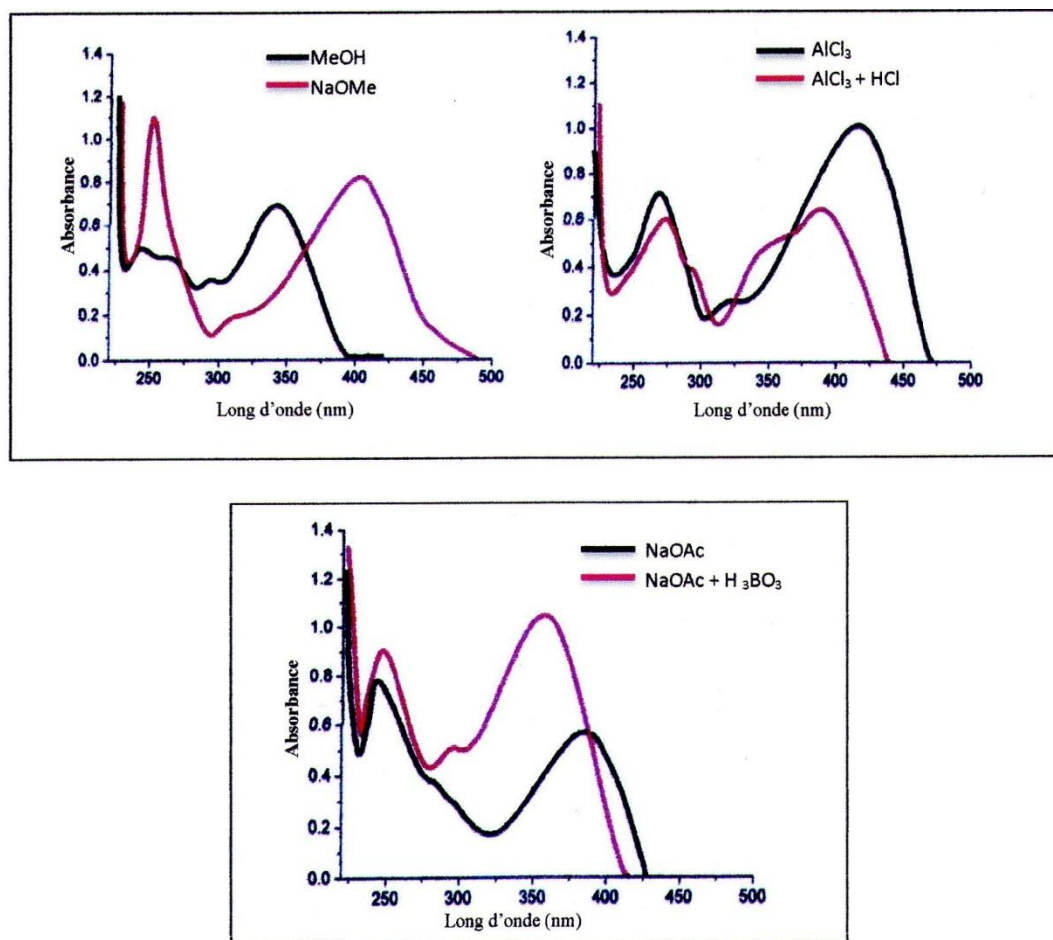
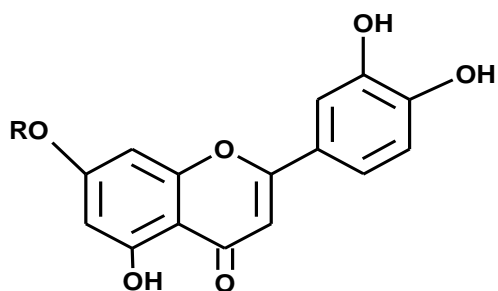


Figure 27 : Spectre photométrie UV de composé (I)

D'après ces données on peut proposer la structure suivante :



R= un glycoside ou un méthyl

Figure 28: Composé (1)

Pour donner la structure finale de cet produit on a effectué une analyse par la chromatographie en phase liquide couplé avec la spectrométrie de masse (LC MS/MS).

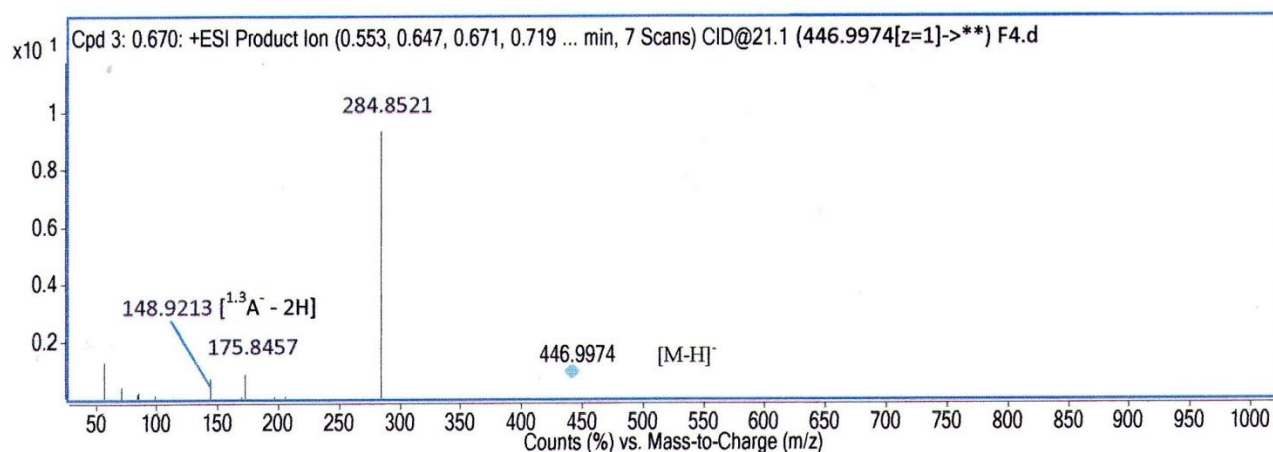


Figure 29: Spectre des ions de produit F12 en mode négatif (M-H)⁻

Le spectre LC MS/MS du composé F12 (Figure 29) confirme son identité en comparant les rapports m/z des fragments obtenus aux valeurs par Rosch et al [3] où on trouve le pic m/z 446.9974 [M-H]⁻ qui correspond à un flavone glycosidé, l'existence de pic m/z 284.8521 [M-H-162] qui appartient à la perte d'un hexose (162) position 7, ce pic caractéristique de la luteoline (Mw=286.24g/mol), le pic m/z 175.8457 [284.8521-C₆H₅O₂]. Le pic m/z 148.9213 correspond à [1,3]A⁻ - 2H m/z 149].

Donc d'après ce spectre on constate que le composé F12 est un luteoline glycosidé en position 7 (donc R= hexose)

La forme finale de ce composé est :

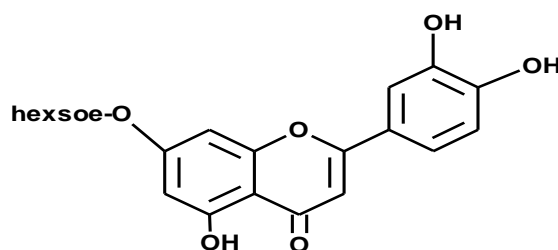


Figure 30 : Luteoline glycosidé

III.3.2.2. La structure du composé identifié dans la fraction F17 :

Les spectres UV du composé identifié pour la fraction F17 dans le méthanol et en présence des réactifs sont présentés dans la figure 11.

* la couleur de composé Jaune vif sur CCM indique la présence d'un flavonol.

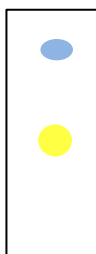


Figure 31 : CCM de la fraction F17 sur gel de silice
Phase mobile Acétate d'éthyle/ Méthanol (60/40)

Le composé a subi une séparation par des plaques CCM préparatifs

* La longueur d'onde de la bande **(I)** dans le méthanol (375nm) correspond à un flavonol, la bande **(II)** présente deux maximums indique l'existence d'une substitution en position 3' et 4' de cycle B.

* $\Delta\lambda$ (I) [NaOMe et MeOH] = 63 nm, effet bathochrome et sans diminution de l'intensité par rapport au méthanol due à l'existence d'un « **OH** » en position 4', plus l'apparition d'une nouvelle bande entre 320 nm et 332nm indique la présence d'un hydroxyle à 7.

* $\Delta\lambda$ (I) [AlCl₃/HCl et MeOH] = 53 nm indique l'existence d'un « **OH** » en position « 5 ».

* $\Delta\lambda$ (I) [AlCl₃/HCl et AlCl₃] = -18 nm, un effet hypsochrome inférieur de -20 nm due à l'absence d'un système Ortho di-**OH** sur **B** et **A**.

* $\Delta\lambda$ (II) [NaOAc et MeOH] = 17nm un déplacement bathochrome confirme l'existence d'un « **OH** » en position 7.

* $\Delta\lambda$ (I) [NaOAc/H₃BO₃ et MeOH] = 3 nm confirme l'absence d'un système Ortho di-**OH** sur **B** et **A**.

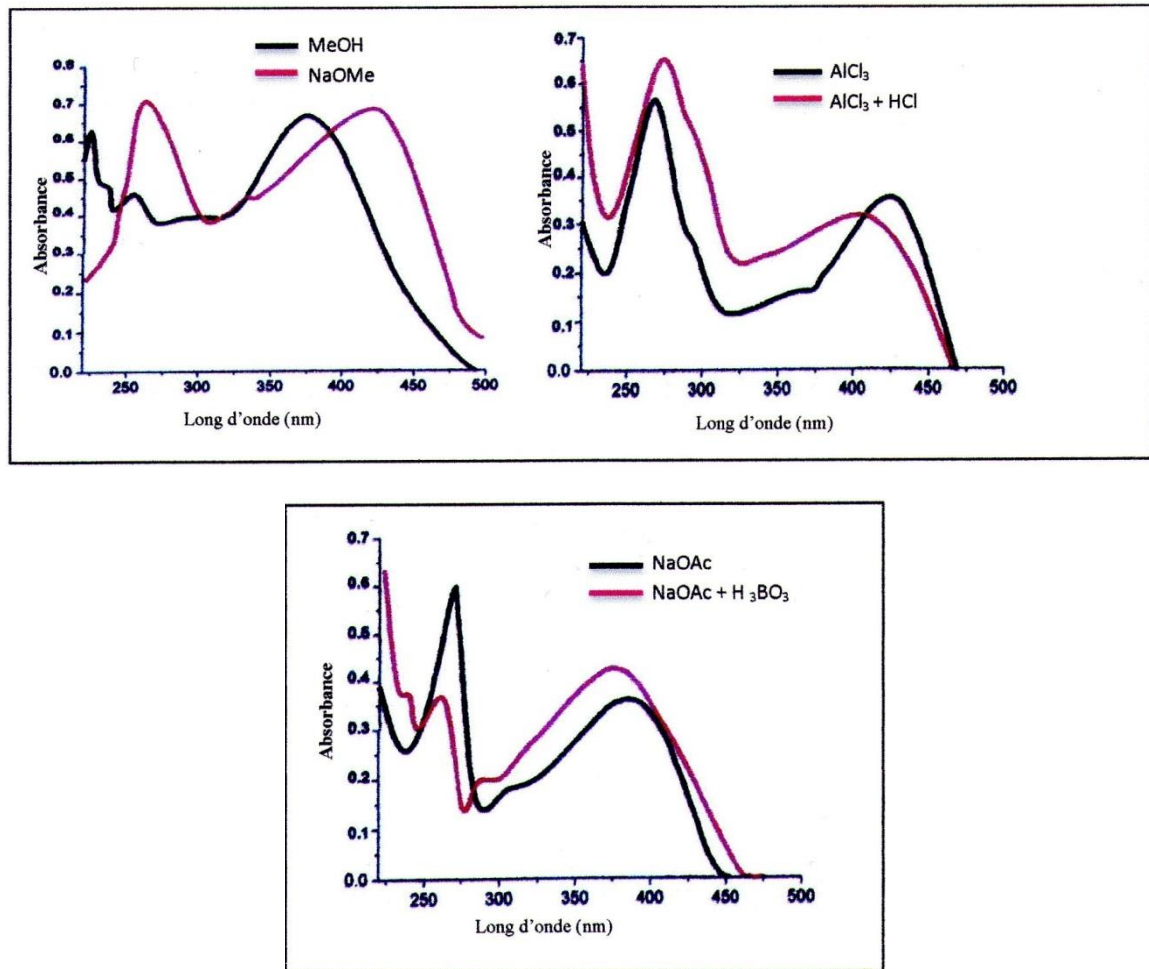
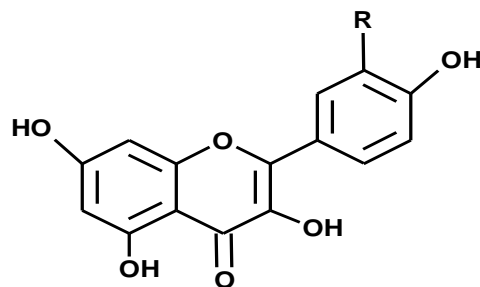


Figure 32: Spectre photométrie UV de composé (2)

Donc la structure proposé pour le composé existe dans la fraction F17 :



R : O-glycoside, ou Méthoxyl (OCH₃)

Figure 33: Composé (2)

Le spectre de LC MS/MS confirme cette structure avec l'apparition de la substitution en 3' qu'est le Méthoxyl (OCH₃):

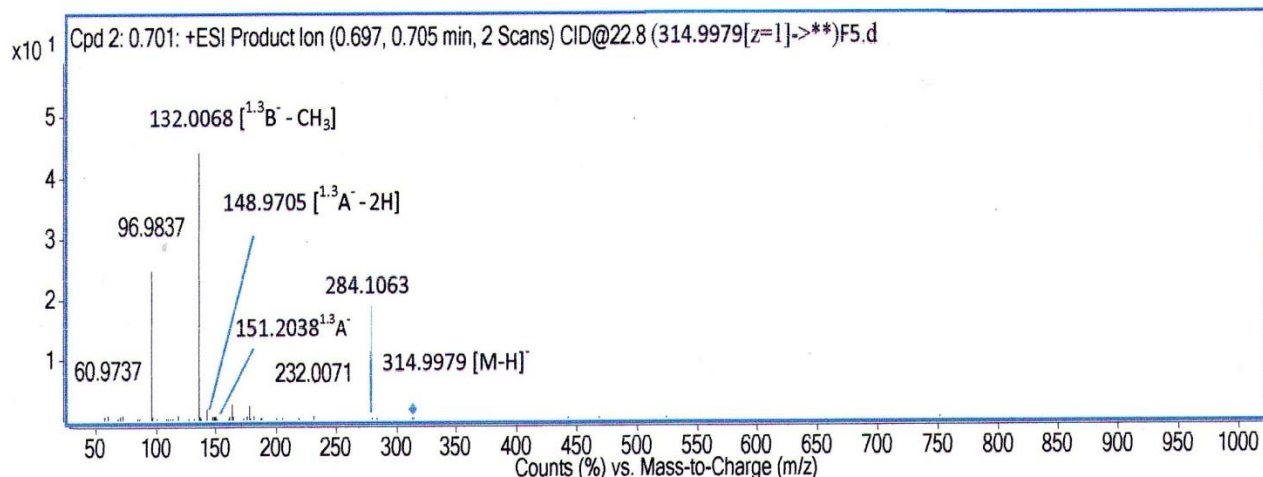


Figure 34: Spectre des ions produit à partir de la fraction F17 on mode négatif (M-H)⁻

On remarque l'existence d'un pic m/z 314,9979 [M-H]⁻ de la molécule mère plus un pic m/z 284.1063 [M-H-31] équivalent à la perte du méthoxyl (OCH₃) en position 3'. La fragmentation de composé (2) de la fraction F17 donne un pic m/z 151.2038 correspond à l'ion [1.3A]⁻ et un pic m/z 148,9705 attribué à l'ion [1.3A⁻ -2H], plus un pic 132.0068 caractéristique de l'ion [1.3B⁻ - OCH₃]. Ainsi les résultats obtenue indique que la structure de composé (2) existe dans la fraction F17 est un flavonol appelé 3'-méthyl quercitine ou Isorhamnetin.

Donc la structure final est :

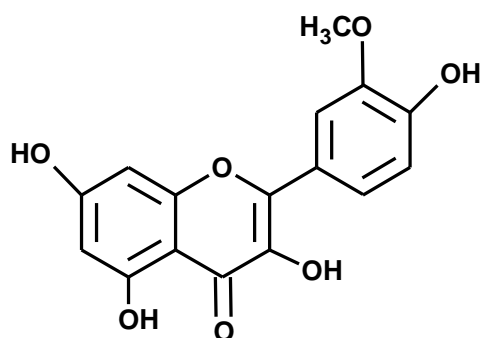


Figure 35: Isorhamnetin

III.3.2.3. La structure du composé F22 :

La figure 12 présente les spectres UV du composé F22 dans le méthanol et en présence des réactifs.

* la couleur du composé Mauve sur CCM indique l'absence des OH liber en position 3

Résultats et discussions

- * La longueur d'onde de la bande (I) dans le méthanol (344nm) nous amène à un flavone, la bande (II) présente deux maximums $\lambda_1=253 \text{ nm}$ et $\lambda_2= 269 \text{ nm}$ indique l'existence d'une substitution en position 3' et 4' de cycle B.
- * $\Delta\lambda$ (I) [NaOMe et MeOH]= 41 nm, plus une diminution de l'intensité par rapport au méthanol due à l'existence d'un « OR » en « 4' ».
- * $\Delta\lambda$ (I) [AlCl₃/HCl et MeOH] = 49 nm due à l'existence d'un « OH » en position « 5 ».
- * $\Delta\lambda$ (I) [AlCl₃/HCl et AlCl₃] = 8 nm, l'absence d'un système Ortho di-OH sur B et A.
- * $\Delta\lambda$ (II) [NaOAc et MeOH] = 6nm due à l'existence d'un « OH » en position 7.
- * $\Delta\lambda$ (I) [NaOAc/H₃BO₃ et MeOH]= 4 nm confirme l'absence de système Ortho di-OH sur B et A.

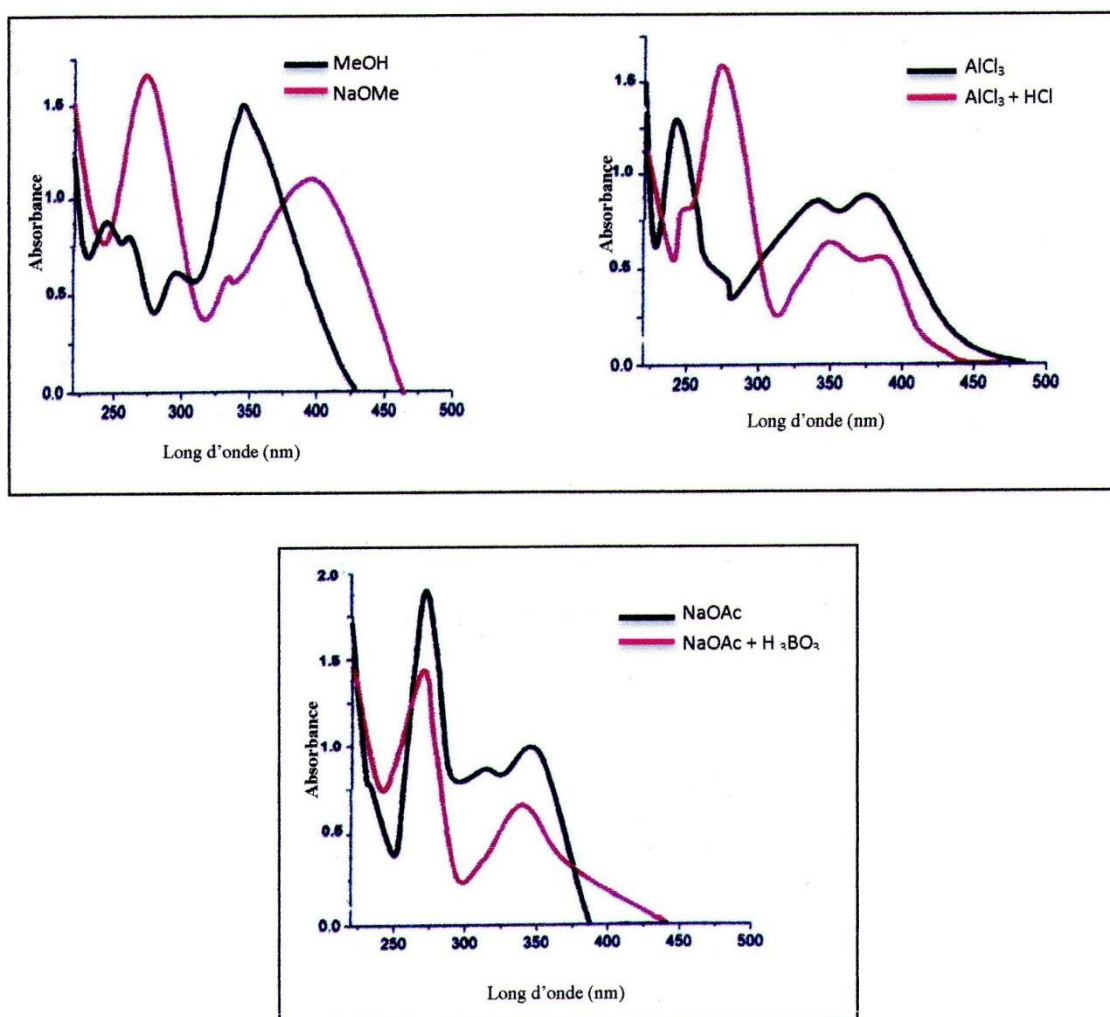
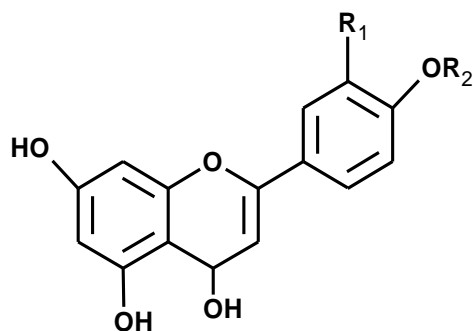


Figure 36: Spectre photométrie UV de composé (3)

Donc la structure proposé pour le composé F22 :



R₁= O-glycoside, OCH₃
R₂=OCH₃, glycoside,

Figure 37: Composé (3)

La structure a été confirmée par le spectre LC MS/MS suivant :

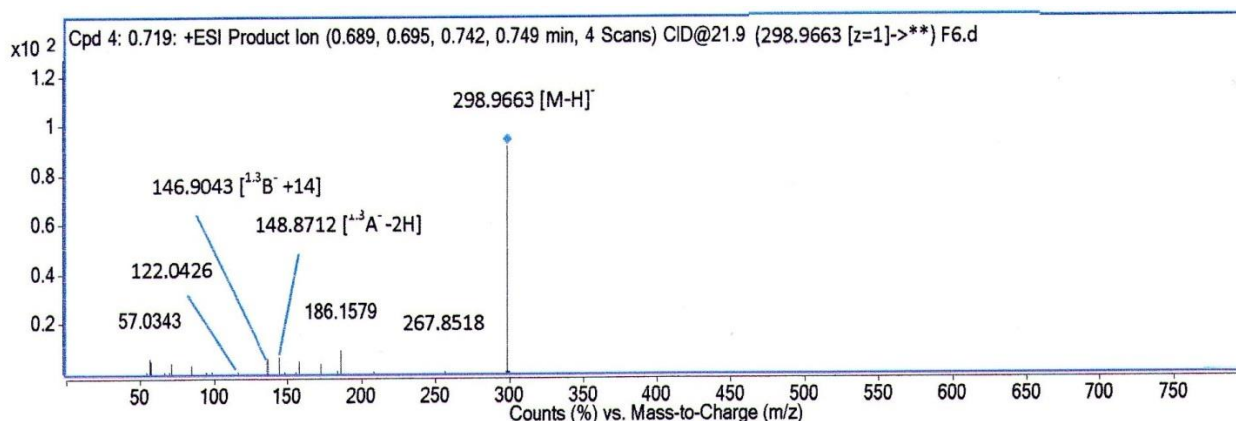


Figure 38: Spectre des ions du produit F22 on mode négatif (M-H)⁻

D'après le spectre on a constaté un pic m/z 298,9663 correspond au pic mère [M-H]⁻ plus un pic m/z 267,8518 appartienne au [M-H-31] résultant de perte d'un méthoxyl (OCH₃) en position 4' et ce pic appartienne à 5-7-dihydroxy-3'-hydroxyflavone (M 269g /mol), comme on remarque un pic m/z 148,8712 [¹³A⁻ -2H] et le pic m/z 146,9043 [¹³B⁻ +14] équivalent de [1'-éthynyl-3'-hydroxy-4'-méthoxybenzène], l'existence de pic 122,0426 correspond à cycle [B⁻ - H].

D'après l'interprétation du spectre plus les résultats de spectrophotométrie UV- visible du composé F22 présente un flavone méthoxylé appelé 5,7,3'- trihydroxy - 4'- méthoxyflavone suivant :

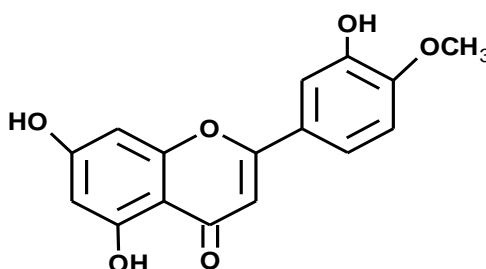


Figure 39 : 5,7, 3'- trihydroxy- 4'- méthoxyflavone

III.3.3. Conclusion :

L'étude structurale effectuée par UV-visible et LC MS/MS nous amène à identifier 3 composés flavoniques les composés F12 et F22 et le composé existe dans la fraction F17 de l'extrait d'acétate d'éthyle de la plante *Cynodon dactylon* « L » Pers dont nous avons détecté la luteoline glycoside, 5,7, 3'-trihydroxy - 4'-méthoxyflavone et Isorhamnetin respectivement.

III.4. Résultats d'étude d'activité anti oxydante des hétérosides flavoniques :

III.4.1. Teste α,α -diphényl- β -picrylhydrazyle (DPPH) :

Les résultats de l'absorbance pour les différentes concentrations des deux extraits et l'étalant la Quercétine

Tableau 17: Activité antioxydante de la Quercétine

<i>Concentration (mg/ml)</i>	<i>I%</i>
0,000	0,00
0,002	52,83
0,013	91,31
0,025	92,87
0,050	93,46
0,075	92,77
0,100	93,85
0,150	94,04
0,200	94,04

Tableau 18: Activité antioxydant de l'extrait Acétate d'éthyle

<i>Concentration (mg/ml)</i>	<i>I%</i>
0,000	0,00
0,002	22,56
0,013	48,83
0,025	52,64
0,050	56,54
0,075	60,94
0,100	62,79
0,150	66,11
0,200	68,36

Tableau 19: Activité antioxydant de l'extrait Butanol

<i>Concentration (mg/ml)</i>	<i>I%</i>
0,000	0,00
0,002	21,38
0,013	47,85
0,025	51,76
0,050	54,59
0,075	58,50
0,100	60,94
0,150	61,72
0,200	62,21

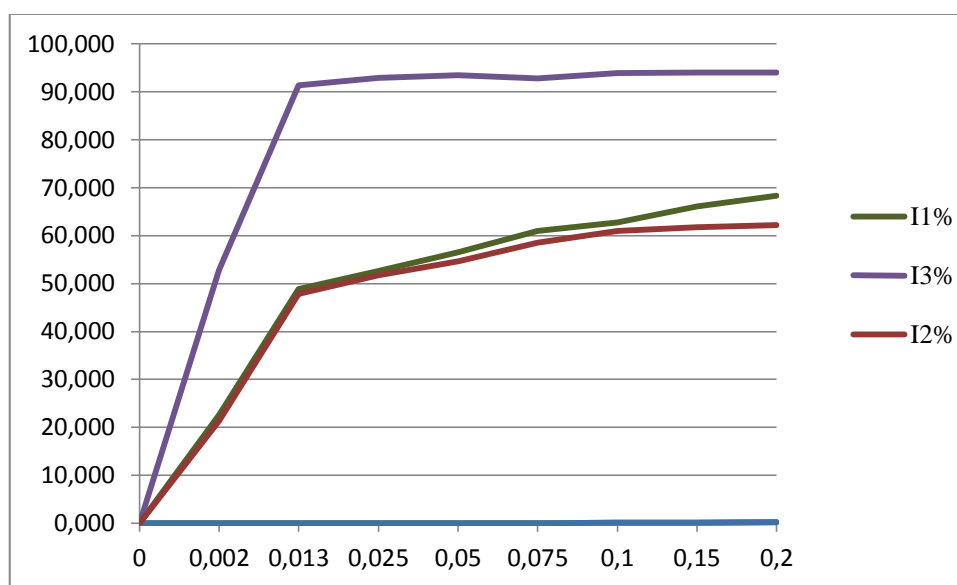


Figure 40: Evolution de l'activité anti radicalaire des extraits de plante et de la Quercétine en fonction de la concentration

I1 : pour l'extrait acétate

I2 : pour l'extrait butanol

I3 : pour la molécule de référence la quercitine

1.1. Interprétation :

La Figure 40 indique que la concentration des extraits à I50 (CI50), pour l'extrait d'Acétate d'Ethyle $CI50 \approx 0,014$ mg/ml, l'extrait de butanol $CI50 \approx 0,019$ mg/ml et pour la molécule de référence le $CI50 \approx 0,0018$ mg/ml ce indique que la plante présente une bonne activité mais inférieur de celle de la quercitine.

On remarque que l'extrait de l'Acétate d'Éthyle a une activité supérieure de celle de l'extrait de Butanol. Mais toujours inférieur de celle de la quercétine.

III.4.2. Teste par la réduction de fer (FRAP)

Test de FRAP examine l'efficacité des antioxydants dans une réaction de réduction coloré.

L'analyse par la méthode de FRAP est rapide un essai simple, et reproductible. Il est universel peut être appliqué aussi bien chez les plantes dans les deux extraits organiques (Acétate d'éthyle et Butanol) et de la Quercétine.

La présence des réducteurs dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe^{3+}/Fe^{2+} complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, Fe^{2+} peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700nm.

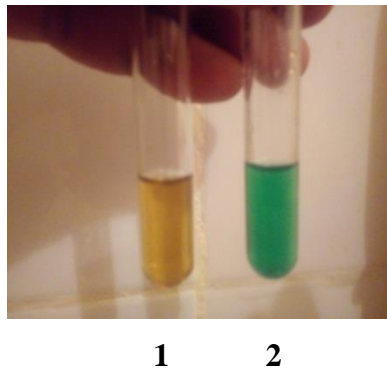


Figure 41: Réduction du fer par les extraits

Tube 1 : avant l'ajout de $FeCl_3$

Tube 2 : après l'ajout de $FeCl_3$

L'étude réalisée est traduite par des résultats regroupés dans les tableaux 15, 16 et 17 et par le figure 14

Tableau 20: Réduction de fer par la Quercétine

la concentration (mg/ml)	Ab Quer (nm)
0,0078	1,234
0,0156	1,243
0,0313	1,332
0,0625	1,427
0,125	1,439
0,25	1,511
0,5	1,727
1	2,296
2,5	3,724

Tableau 21: Réduction de fer par l'extrait Acétate d'éthyle

la concentration (mg/ml)	Ab Acét (nm)
0,0078	1,006
0,0156	1,111
0,0313	1,175
0,0625	1,282
0,125	1,298
0,5	1,308
1	1,352
2	1,373
2,5	1,376

Tableau 22 : Réduction de fer par l'extrait Butanol

la concentration (mg/ml)	Ab But (nm)
0,0078	0,923
0,0156	0,941
0,0313	1,095
0,0625	1,207
0,125	1,242
0,5	1,287
1	1,303
2	1,332
2,5	1,297

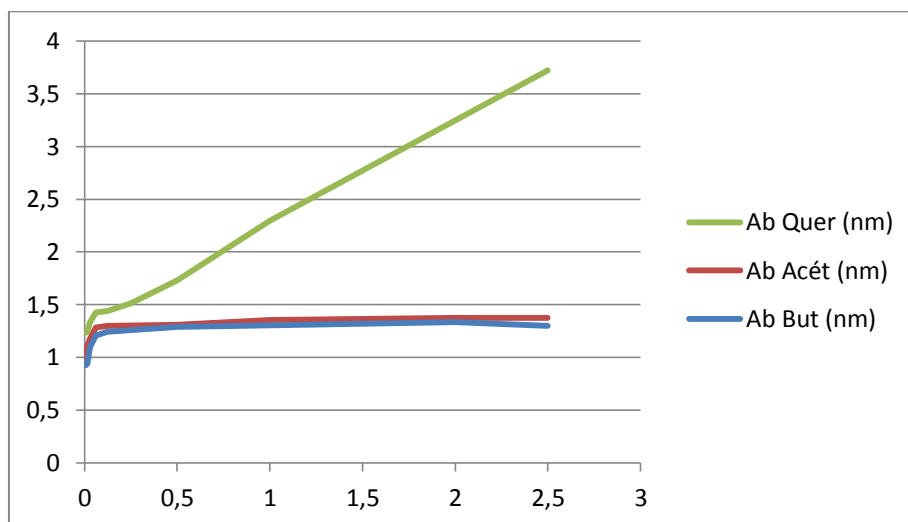


Figure 42 : Pouvoir réducteur de quercétine, de extrait acétate d'éthyle et de l'extrait de butanol

2.1. Interprétation :

D'après La Figure 42 le pouvoir réducteur à la concentration 2,5mg/ml, de l'extrait Acétate d'éthyle de *Cynodon Dactylon* est largement supérieur ($A_b=1,376$ nm) par rapport à l'extrait Butanol ($A_b= 1,297$ nm), mais nettement inférieur à celui de la Quercétine.

Le pouvoir réducteur est dû à la présence des groupes hydroxyle dans les composés hétérosides existante dans les extrait qui sont responsables de réduire les ions de Fe^{+3} parce que sont considéré comme donneur d'électron. Ce qui empêche la réaction d'oxydation des composés oxydante humaine comme l'Oxygène.

III.4.3. Conclusion :

Les résultats obtenu pour les deux techniques d'évaluation de l'activité antioxydant des extraits de la plante de *Cynodon Dactylon* montrent que l'extrait d'Acétate d'éthyle a une activité supérieur de celle de Butanol ce qui nous amène à dire que les flavonoïdes aglyconique et mono hétérosidique ont une bonne activité antioxydant on comparant avec les poly hétérosidiques. Par ailleurs, les études ont montré que les groupements fonctionnels présents dans les composés phénoliques en général peuvent céder facilement un électron ou un proton pour neutraliser les radicaux libres [4].

Le pouvoir réducteur de l'extrait acétate d'éthyle élevé de l'espèce *Cynodon dacylon* « *L* » *Pers* est probablement dû à la présence des groupements hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électron [5].

En comparaison avec les études précédents, la plante *Cynodon Dactylon* étudié elle est plus active, lorsque la même plante en Inde a une $CI_{50} = 0,449$ mg/ml et celle de la Tunisie a une $CI_{50} = 0,20329$ mg/ml [1][6].

III.5. Etude de L'activité anti bactérienne :

La technique de diffusion sur milieu solide consiste à déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne contre les deux extraits de la plante *Cynodon dactylon* (extrait acétate d'éthyle et butanol) les concentrations des deux extraits dans le DMSO sont respectivement 413,5g/l et 1875,975g/l.

Les résultats d'analysé sont regroupés dans le Tableau 22 suivant :

Tableau 23 : Valeurs des diamètres des zones d'inhibition pour les souches de référence en présence des extraits.

Les extraits Les souches	Acétate d'éthyle (mm)	Butanol (mm)
Escherichia coli : ATCC 25922	-	10
Enterococcus faecalis : ATCC 29212	13	-
Klebsiella pneumoniae : ATCC 700603	-	08
Pseudomonas aeruginosa : ATCC 27853	-	09
Staphylococcus aureus : ATCC 25923	-	-
Streptococcus pyogènes	14	08

(-) : Absence de Zone d'inhibition.



Figure 43 : Teste d'Escherichia coli



Figure 44: Teste d'Enterococcus faecalis



Figure 45: Test de Klebsiella pneumoniae



Figure 46 : Teste de Pseudomonas aeruginosa



Figure 47: Teste de Staphylococcus aureus

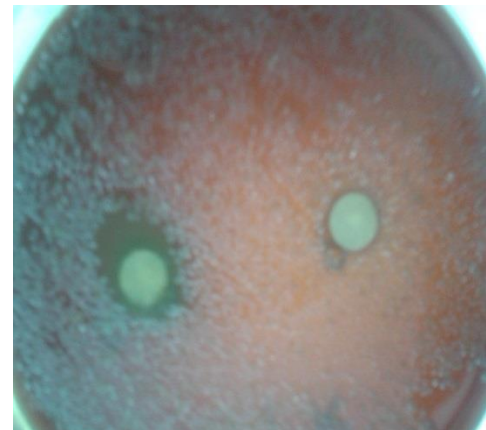


Figure 48 : Teste de Streptococcus pyogènes

III.5.1. Interprétation :

Cette étude permis de montre que l'extrait butanolique a une activité positive sur les germes « *Escherichia coli* », « *Klebsiella pneumoniae* » et « *Pseudomonas aeruginosa* » les zones d'inhibition sont respectivement 10mm, 08mm et 09mm en comparaison avec l'extrait d'acétate d'éthyle qui a un effet négatif sur ces germes, on constate que les trois germes sont considérés comme des souches résistantes vis à vis aux extraits. Par contre l'extrait d'acétate d'éthyle montre une zone d'inhibition de 13 mm sur le germe du « *Enterococcus faecalis* ».

Donc une inhibition moyenne, plus une activité négative pour l'extrait de butanol ce que laisse suggérer que c'est un germe résistant.

Staphylococcus aureus est un germe résistant aux effets des extraits de la plante *Cynodon dactylon*. Ainsi que la souche de la *Streptococcus pyogènes* montre des zones d'inhibitions pour les deux extraits, pour l'acétate d'éthyle elle est de 14mm et pour le butanol égale à 08mm ce que indique que ce germe est sensible à l'extrait d'acétate d'éthyle mais résistant pour l'extrait butanolique.

III.5.2. Conclusion :

Dans notre étude l'extrait butanolique des hétérosides flavoniques exerce une faible activité antimicrobienne contre les six souches de référence. En revanche l'extrait d'acétate d'éthyle des flavonoïdes a donné une activité positive moyenne sur deux souches seulement « *Enterococcus faecalis* et la *Streptococcus pyogènes* ». Et d'après les études effectués à Bangladesh sur la plante *Cynodon dactylon* l'extrait méthanolique a une activité antimicrobienne négative on comparant à l'extrait aqueuse qui a présenté une activité moyenne contre les souches microbiennes [7].

Références Bibliographiques

- 1/ / Daycem Khlifi., El Akrem Hayouni., Alexis Valentin., Sylvie Cazaux., Béatrice Moukarzel., Moktar Hamdi., Jalloul Bouajila., (2013). LC–MS analysis, anticancer, antioxidant and antimalarial activities of *Cynodon dactylon* L. extracts. *Industrial Crops and Products*, France ; 45 240– 247
- 2/ Benzahi K., (2001). Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante *Cynodon Dactylon* (L) Pers. Université Kasdi Merbah, Ouargla, p 113, N° d'ordre : THE.CH.01/31/2.
- 3/ Rösch D., Krumbein A., Mugge C., Kroh L.W., (2004). Structural investigations of flavonol glycosides from sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) pomace by NMR spectroscopy and HPLC-ESI-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(13): 4039-4046.
- 4/ Chen C.W. & Ho C.T., (1995). Antioxidant properties of polyphenols extracted from green tea and black tea. *J Lipids*, 2: 35-46.
- 5/ Siddhuraju P., Becker K., (2007). The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) seed extracts. *Food Chemistry*. 101(1), 10-19.
- 6/ Saroja M., Annapoorani S., (2012). In vitro antioxidant activity of flavonoid fractions of CYNODON DACTYLON and TERMINALLA CATAPPA LEAVES. *International Research Journal of Pharmacy (IRJP)*, 3(8): 209-211
- 7/ Shafaque Rahman., (2014). *Cynodon dactylon*: Antimicrobial potential of crude extract as valuable medicinal plant. BRAC University, Dhaka. p 75

« CONCLUSION GENERALE »

Conclusion Générale

La présente étude a porté sur le espèce *Cynodon dactylon* « L » Pers qui appartiennent à la famille des Graminées. Elle a permis de déduire que les hétérosides flavoniques représentent **1,8912 %** de la plante sèche et cette étude a montré que le rendement élevé est celui de extrait butanolique avec plus de **1,6353%** par rapport à l'extrait d'acétate par **0,2599%**.

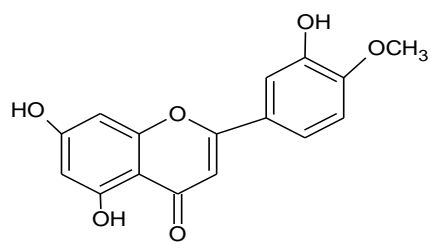
L'identification structurale des composées flavoniques par les méthodes chromatographique et spectrale effectué sur des fractions obtenues par fractionnement des deux extraits (acétate d'éthyle et butanol) nous a permis d'identifié trois composés qui sont **la luteoline glycosidé, l'Isorhamnetin et le 5-7-3'-trihydroxy -4'- méthoxyflavone**.

D'autre part les résultats obtenus par l'étude d'activité antioxydante des extraits de la plante de *Cynodon Dactylon* montrent que l'extrait d'Acétate d'éthyle a une activité supérieure de celle du Butanol ce qui nous amène à dire que les flavonoïdes aglyconiques et mono hétérosides ont une bonne activité antioxydante on comparant avec les poly hétérosides. Donc on constate que l'augmentation de pouvoir réducteur de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Cynodon dactylon* « L » Pers est probablement dû à la présence des groupements hydroxyle sur la structure de base des flavonoïdes qui peuvent servir comme donneur d'électron. Par conséquent, on peut dire que les extraits de la plante sont considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants.

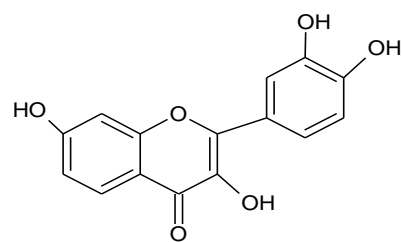
L'étude de l'activité antibactérienne des composés flavoniques existantes dans les deux extraits de plante, nous amène à déduire que l'extrait butanolique exerce une faible activité contre les souches bactériennes référentielle. En revanche l'extrait d'acétate d'éthyle des flavonoïdes a donné une activité moyennement positif sur deux souche seulement qui sont « *Enterococcus faecalis* et la *Streptococcus pyogènes* ».

Par ce modeste travail, nous espérons avoir apporté notre contribution à l'étude des Hétérosides flavoniques à la valorisation de *Cynodon dactylon* « L » Pers comme une plante médicinale traditionnelle très largement utilisée par les populations du nord de l'Afrique et les autres payes.

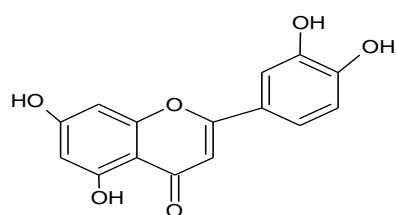
« ANNEXES »



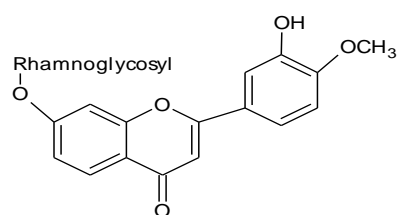
Hesperetin



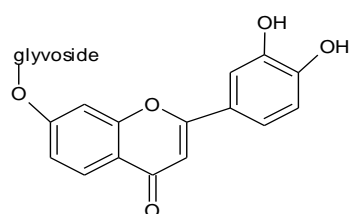
Fisetin



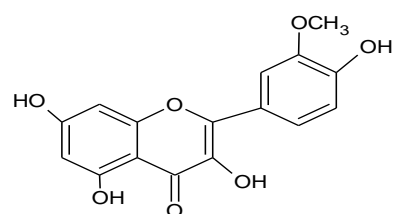
Luteolin



Hesperidin.



Luteolin-7-glycoside



Isorhamnetin

Annexes



Photo n° 1: Extrait éthanolique



Photo n° 2 : les trois extraits (d'éther diéthylique, acétate d'éthyle et extrait botanique)

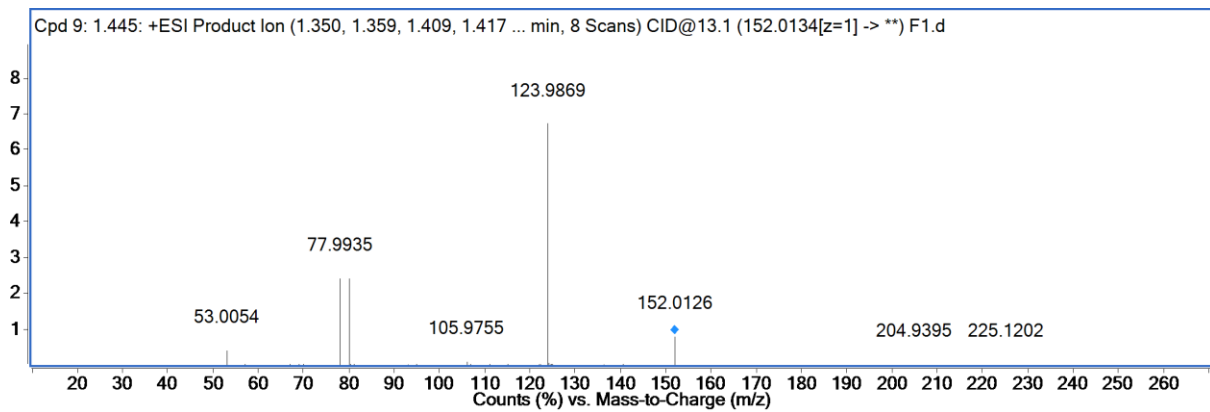
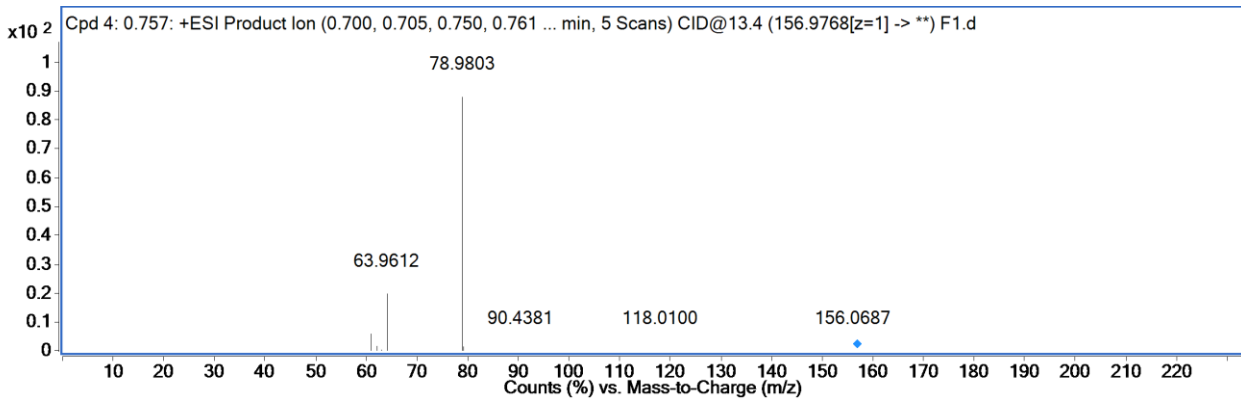
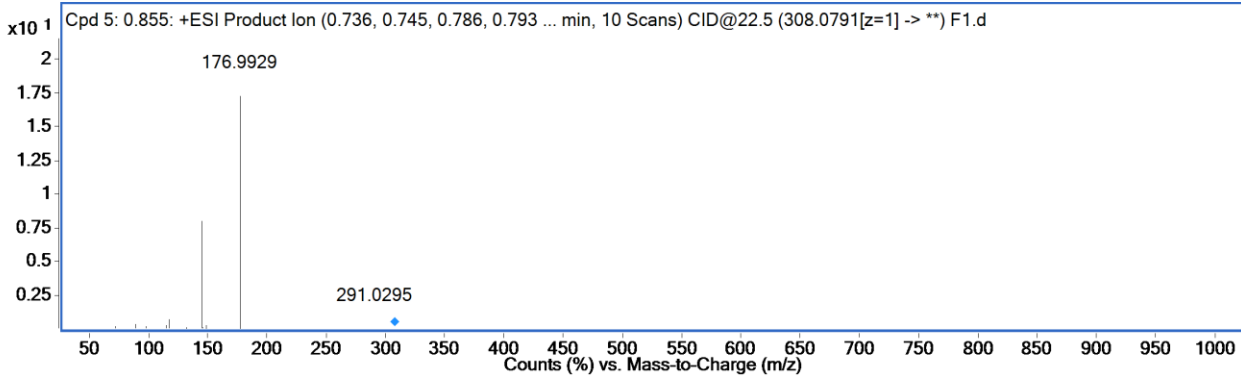


Photo n° 3 : les plaques de CCM d'extrait analysé par trois phases mobile

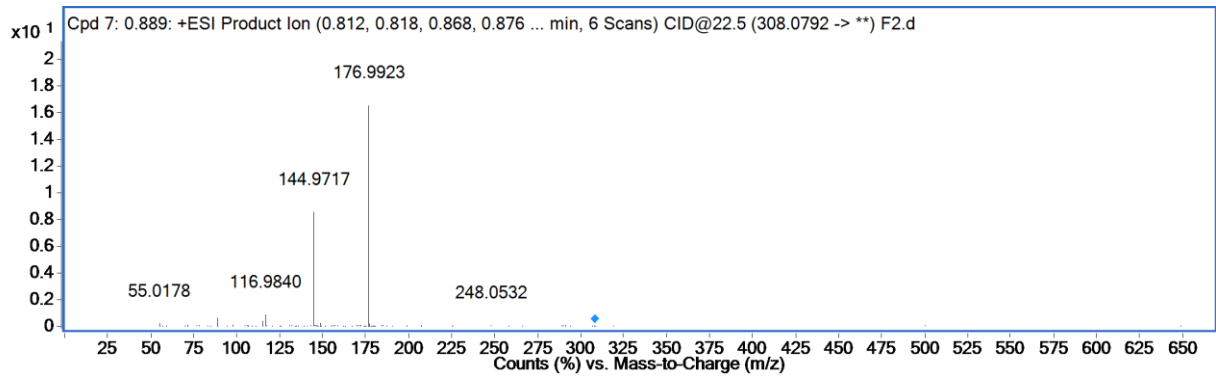
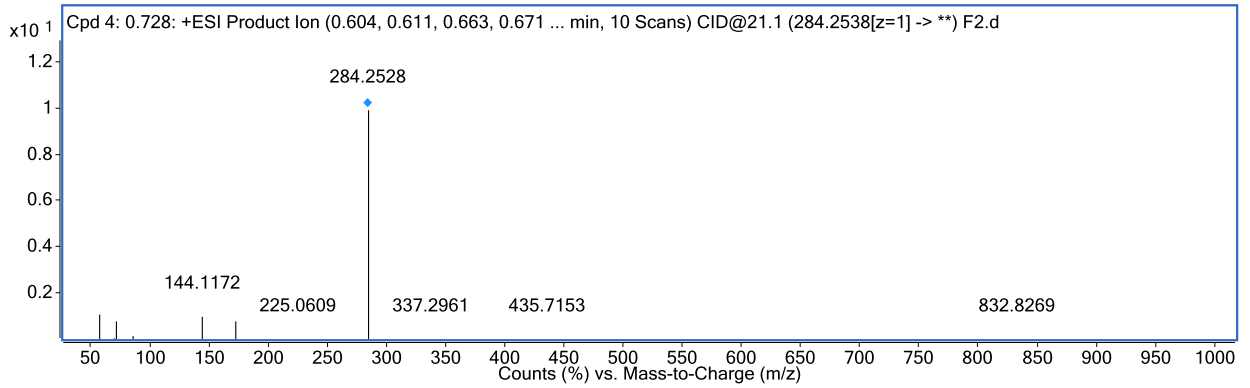


Photo n° 4 : la colonne de fractionnement

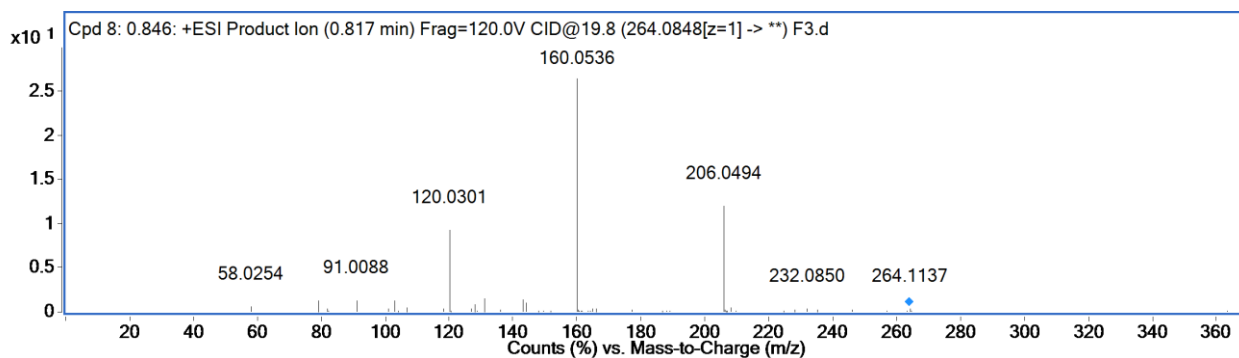
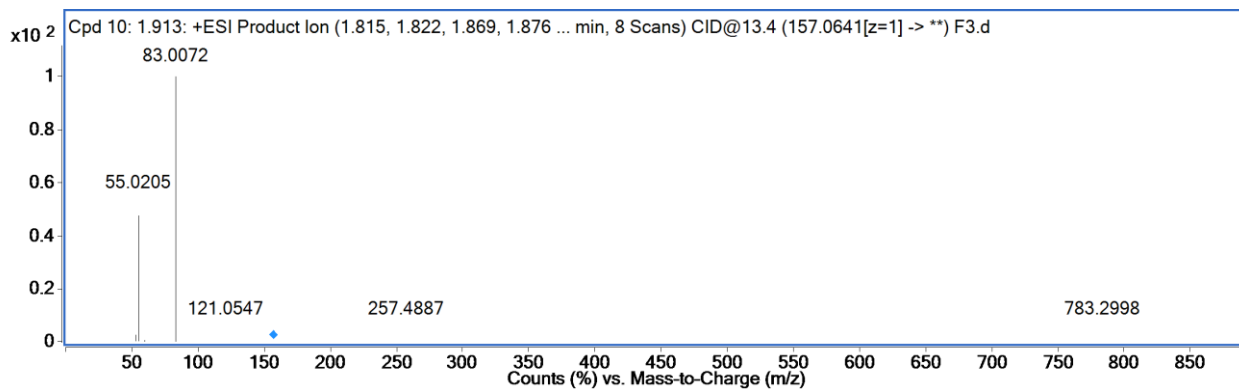
1/ Le spectre LCMS/MS de la fraction F13 Acétate d'éthyle:



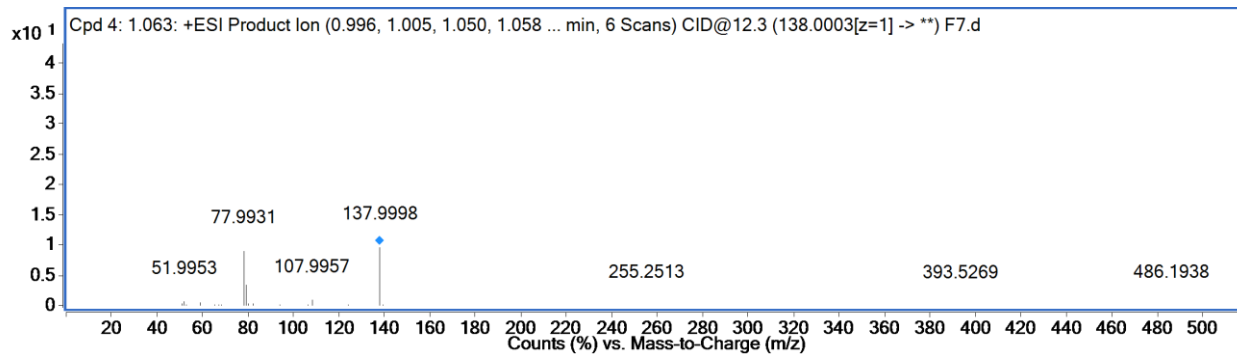
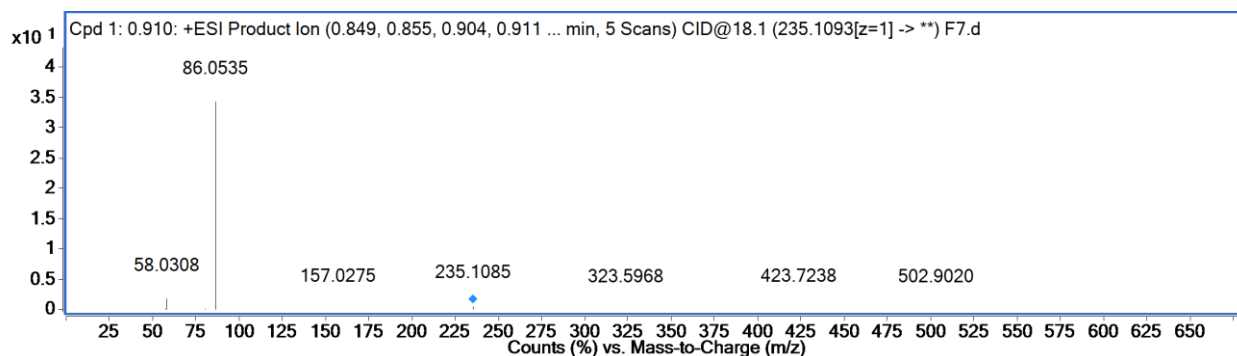
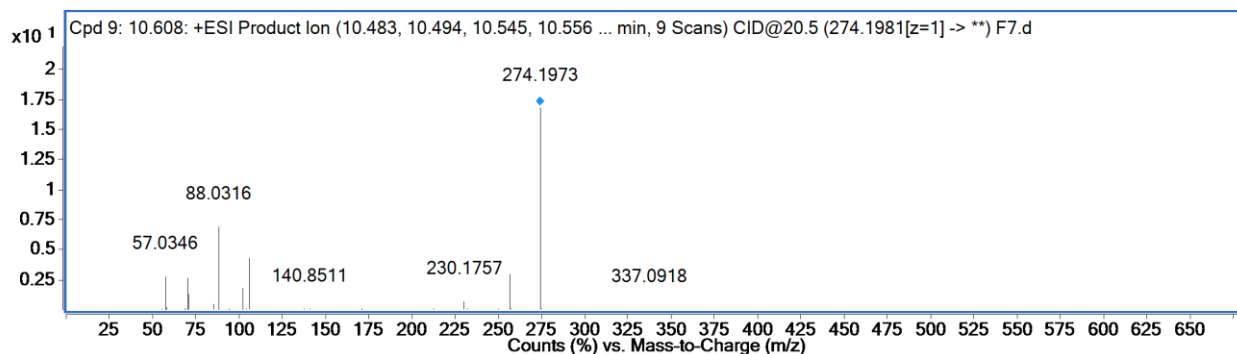
2/ Le spectre LCMS/MS de la fraction F14 Acétate d'éthyle:



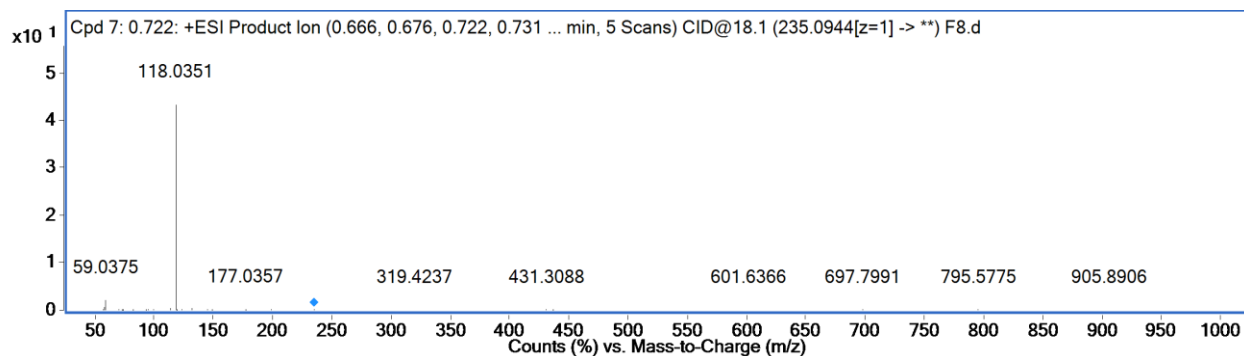
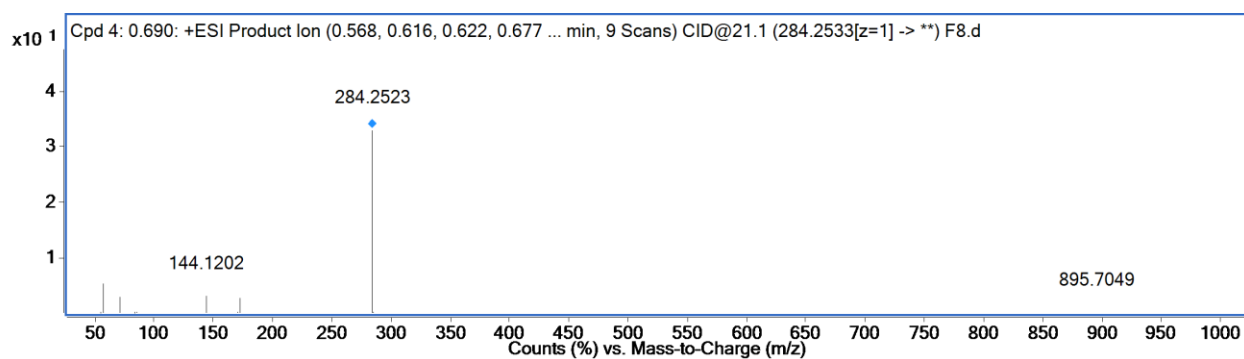
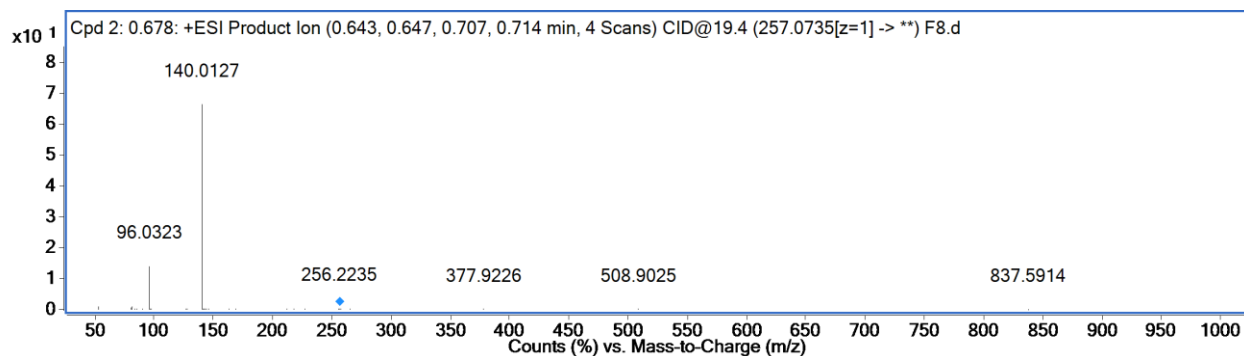
3/ Le spectre LCMS/MS de la fraction F15 Acétate d'éthyle:



4/ Le spectre LCMS/MS de la fraction F3 Butanol :



5/ Le spectre LCMS/MS de la fraction F17 Butanol :



6/ Le spectre LCMS/MS de la fraction F15 Butanol :

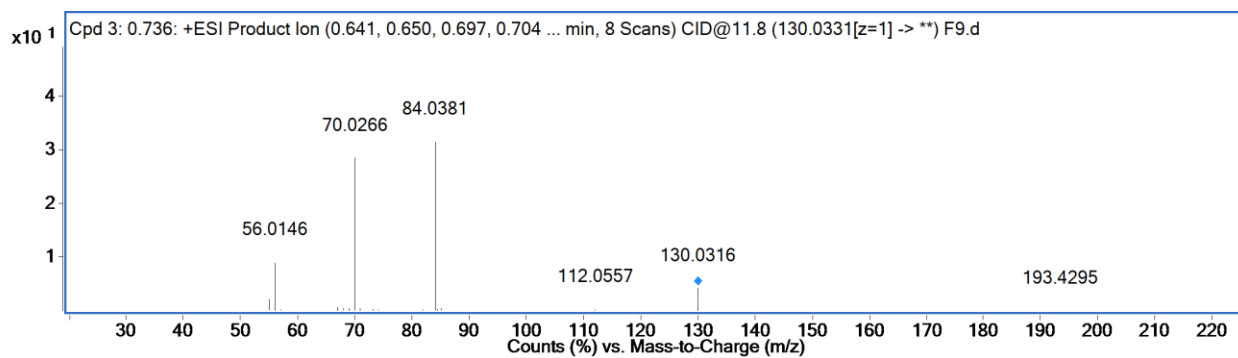
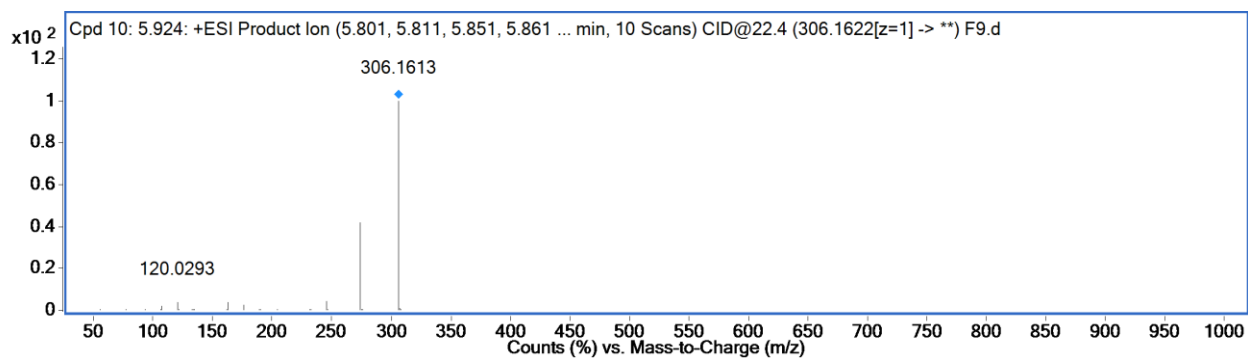




Photo n° 5: plaque de chauffante

Photo n° 6: Centrifugeuse

Photo n° 5 et 6: la réaction de FRAP



Photo n° 7: Spectrophotomètre



Photo n° 8: Etuve



Photo n° 9: Balance analytique



Photo n° 10: Rota vapeur

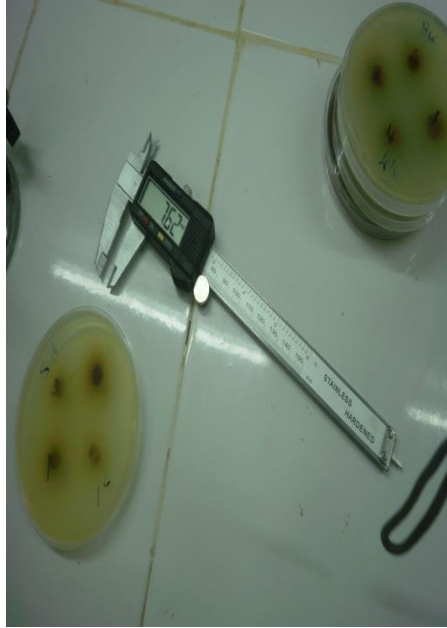


Photo n° 11: Pied à coulisse



Photo n° 12: Dispositif de LCMS/MS