

N° Ordre :

N° Série :

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

**Département Chimie**



## **Thèse**

**Présenté pour l'obtention du diplôme de doctorat**

Spécialité : chimie organique appliquée

Présenté par : **BENZAHI RABIA**

**Thème**

**Contribution à l'étude chimique des aglycones  
et des anthocyanes flavoniques existants dans  
la plante**

**« *Cynodon dactylon (L) Pers* »  
et leur activités antioxydantes et  
antibactériennes**

Soutenu devant le jury composé de

Mr	H. DENDOUGUI, Professeur U.K.M. Ouargla	Président
Mr	M.R. OUAHRANI, Professeur, U. El oued	Examineur
Mr	L. BECHKI, Professeur, U. Ghardaïa	Examineur
Mr	T. MEKHELFI, Maitre de Conférences, U.K.M. Ouargla	Examineur
Mme	O. SMARA, Maitre de Conférences, U.K.M. Ouargla	Examineur
Mr	B. DADAMOUSA, Professeur, U. Ghardaïa	Rapporteur

**Année Universitaire : 2020 - 2021**

## **Dédicace**

*Je remercie le Dieu tout puissant de m'offrir tout ce que j'ai aujourd'hui  
et je dédie ce travail*

*A la mémoire de ma mère*

*A mon père, qui est toujours derrière moi et qui me poussé et encouragé pour  
réaliser mes travaux de recherche .*

*A mes frères et sœurs et leur famille*

*A mon cher mari et mes filles Yasmin et Lina et mon fils Mahdi*

*Je dédie ce modeste travail à tous mes amis et les personnes qui m'ont aidé à  
le réaliser.*

## **Remerciements**

Tout d'abord je tiens à adresser mes vif remerciement à mon directeur de thèse le Professeur **B. DADAMOUSA**, qui m'a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, pour sa grande patience, pour sa disponibilité et ses conseils judicieux.

J'ai très l'honneur de remercier les membres du jury de thèse:

Monsieur **H. DENDOUGUI** Professeur à l'Université KASDI MERBAH Ouargla, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Monsieur **M. R. OUAHRANI** Professeur à l'Université d'El Oued, pour l'honneur qu'il m'a fait pour sa participation à mon jury de thèse, pour le temps consacré à la lecture de cette thèse.

Monsieur **L. BECHKI** Professeur à l'Université de Ghardaïa pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'être membre de mon jury de thèse.

Monsieur **T. MEKHELFI** Maitre de Conférences à l'université KASDI MERBAH Ouargla pour sa participation à mon jury de thèse.

Madame **O. SMARA** Maitre de Conférences à l'université KASDI MERBAH Ouargla pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à exprimer également mes sincères remerciements aux personnels de laboratoire pédagogiques de l'école normal supérieur de Ouargla, aux personnels de laboratoire pédagogiques de Faculté des Mathématiques et des sciences de la matière Université Kasdi Merbah Ouargla et aux personnel 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 manuscri, aux personnel de laboratoire des analyses physico- chimique Alger

Un grand merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à ce travail.

## الملخص :

نبات النجيل « *Cynodon dactylon (L) Pers* » هو عشب معمر وهو مصدر لنواتج الايض مثل البروتينات, الكربوهيدرات, المركبات المعدنية B-سيتوستيرول, الفلافونيدات, القلويدات و التربينات الثلاثية. وقد استخدمت هذه النبتة مند القدم في الطب التقليدي لعلاج العديد من الأمراض مثل السرطانات, التشنجات والتقلصات, الإسهال... الخ. لان لهذه العشبة خصائص مضادة للفيروسات والميكروبات. في دراستنا هذه قمنا بإستخلاص الغليكونات و الانتوسيانيدات المتواجدة في نبات النجيل كما قمنا بعملية فصل للمركبات المستخلصة بالإضافة إلى تحديد صيغتها و أخيرا دراسنا الفعالية البيولوجية لهذه المركبات ( مضادات الأكسدة و مضادات الميكروبات).  
**الكلمات الدالة :** النجيل, الغليكونات, الانتوسيانيدات, فصل المركبات, تحديد صيغه المركبات, مضادات الأكسدة, مضادات الميكروبات.

## Résumés :

Le chiendent « *Cynodont dactylon (L) Pers* » est un herbe vivace. La plante est une source de métabolites tels que les protéines, les carbohydrates, les composés minéraux, le B-sitostérol, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les glycosides et les tri terpènes . Elle a été longtemps utilisé dans la médecine traditionnelle pour traiter plusieurs maladies tels que les cancers, les convulsions, les crampes, la diarrhée,.....etc, car cette plante a des propriétés antiviraux et antimicrobiennes. Dans notre étude nous avons effectué une extraction des aglycones et des anthocyanes existantes dans la plante chiendent « *Cynodont dactylon (L) pers* ». De plus nous avons essayé d'identifier les structures des composés extraits et son activité biologiques (l'activité antioxydant et antibactérienne).

**Mots clé :** Chiendent, *Cynodon dactylon (L) Pers*, Aglycones, Anthocyanes ,séparation des produits, identification structurale, antioxydant, antibactérienne.

## Abstract :

*Cynodon dactylon (L) Pers* is a perennial grass. This plant is a rich source of metabolites such as proteins, carbohydrates, mineral constituents, B-sitosterol, flavonoids, alkaloids, glycosides and triterpenoids. It has been long used in the traditional medicines to treat many diseases such as cancer, convulsion, cramps diarrhea... because this plant has the biological activities as antiviral and antimicrobial properties.

In our research, we have extracted the aglycons and anthocyanes existing in the plant *Cynodon dactylon (L) Pers*. Then we have separated the extracted compounds, and identified its chemical structures. Finally, the biological activity of these compounds is studied (antioxidant and antibacterial activity).

**Keywords:** *Cynodon dactylon(L) Pers*, aglycons, anthocyanes, antioxidant, antimicrobial, separation and identification of structure.

## ***SOMMAIRE***

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I : Partie théorique</b>	
I.1. Généralités sur les polyphénols.....	4
I.1.1. Définition des polyphénols.....	4
I.1.2. Classification des polyphénols.....	5
I.1.2.1. Les acides phénols.....	5
I.1.2.2. Les flavonoïdes.....	6
I.1.2.3. Les anthocyanes.....	6
I.1.2.4. Les flavanes.....	7
I.1.2.5. Les tannins.....	7
I.1.3. Biosynthèse des polyphénols.....	8
I.1.3.1. La voie de l'acide shikimique.....	8
I.1.3.2. La voie de l'acide malonique.....	8
I.1.4. Intérêts thérapeutiques des polyphénols.....	8
I.1.4.1. Activité anticancéreuse.....	9
I.1.4.2. Prévention contre les maladies cardiovasculaires.....	9
I.1.4.3. Prévention contre les maladies hormona- dépendantes.....	10
I.1.4.4. Action gastro-protectrice des polyphénols.....	10
I.1.5. Dosage des polyphénols totaux.....	10
I.2. Généralités sur les flavonoïdes.....	12
I.2.1. Définition et généralités.....	12
I.2.2. Classification chimique.....	12
I.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes .....	14
I.2.4. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes.....	16
I.2.4.1. Activité antioxydante.....	17
I.2.4.2. Activité antimicrobienne des flavonoides.....	18
I.2.4.2.1. Activité antibactérienne des flavonoides.....	18
I.2.4.2.2. Activité antifongique des flavonoïdes.....	22
I.2.4.2.3. Activité antivirale des flavonoides.....	23
I.2.4.3. Activité des flavonoïdes contre la cardiotoxicité, la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique.....	23
I.2.4.4. Activité cardioprotectrice des flavonoïdes.....	24

I.2.4.5.	Intérêt des flavonoïdes contre l'obésité.....	24
I.2.4.6.	Intérêt des flavonoïdes contre les inflammations.....	25
I.2.4.7.	Rôle des flavonoïdes dans la protection des neurones.....	26
I.2.4.8.	Rôle des flavonoïdes dans la protection oculaire.....	26
I.2.5.	Propriétés physiologiques des flavonoïdes.....	27
I.2.5.1.	Rôle attracteur chez les plantes.....	27
I.2.5.2.	Rôle protecteur chez les plantes.....	28
I.2.6.	Caractéristiques chromatographiques des flavonoïdes.....	29
I.3.	Généralité sur le chiendent.....	30
I.3.1.	Classification d'espèce.....	31
I.3.2.	Botanique.....	31
I.3.3.	Composition chimique.....	31
I.3.4.	Les usages.....	32
I.3.5.	Le mode de multiplication.....	32
I.3.6.	Intérêts thérapeutiques de chiendent.....	32
I.3.7.	Le choix de la période de récolte de la plante.....	33
I.3.7.1	Dosage des composées flavoniques.....	34
I.3.7.1.1.	Dosage des anthocyanes.....	34
I.3.7.1.2.	Dosage des Aglycones.....	34
I.3.7.2.	La teneur en aglycones.....	35
I.3.7.3.	La teneur en anthocyanes.....	36

## **Chapitre II : Matériels et Méthodes**

II.1.	Matérielle.....	39
II.1.1.	Le séchage.....	39
II.1.2.	Extraction des aglycones et des anthocyanes.....	39
II.1.2.1	Les Aglycones.....	39
II.1.2.2.	Les Anthocyanes.....	40
II.2.	Les techniques de séparation et d'identification.....	41
II.2.1.	Séparation des aglycones et des anthocyanes existants dans chaque organe de la plante par chromatographie sur les plaques préparatives.....	41
II.2.1.1	Les conditions de séparation.....	42

II.2.2.	Séparation et identification des aglycones et des anthocyanes existants dans chaque organe de la plante par chromatographie liquide à haut performance (CLHP).....	42
II.2.2.1.	Matériels et Appareillage.....	43
II.2.2.1.1	Constitution de dispositif.....	43
II.2.2.1.2	Les extraits à analysé.....	43
II.2.2.1.3	Les conditions d'analyse.....	43
II.2.3.	Séparation des extraits aglyconiques et anthocyaniques de la plante par des plaque préparatives.....	44
II.2.4.	Identification de la structure des composés fractionnés des deux extraits aglyconiques et anthocyaniques avec chromatographie liquide haut performance couplé avec la spectroscopie de masse (LC MS/MS).....	45
II.2.4.1.	Appareillage.....	45
II.2.4.2.	Caractéristiques technique de l'appareil.....	46
II.2.4.3.	Les conditions d'analyse.....	46
II.3.	Etude de l'activité antioxydant des anthocyanes et des aglycones.....	47
II.3.1.	Mode opératoire.....	48
II.4.	Etude de l'activité antibactérienne des anthocyanes et des aglycones.....	48
II.4.1.	Souches bactérienne utilisées.....	49
II.4.2.	Mode opératoire.....	49

### **Chapitre III : Résultats et discussions**

III.1.	Résultats de l'étude chromatographique.....	53
III.1.1.	Résultats de chromatographie sur couche mince des extraits aglyconiques et anthocyaniques de trois partie de la plante.....	53
III.1.2.	Résultats de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des composés existants dans les extraits aglyconique et anthocyanique des trois parties de la plante.....	57

III.1.3.	Résultats de séparation des extraits aglyconiques et anthocyaniques de la plante avec plaques préparatives.....	60
III.1.4.	Résultats de chromatographie liquide haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (LC-MS/MS).....	62
III.2.	Résultats de l'étude de l'activité antioxydant des anthocyanes et des aglycones.....	64
III.2.1.	Interprétation.....	66
III.3.	Résultats de l'étude de l'activité antibactérienne des anthocyanes et des aglycones...	66
III.3.1.	Interprétation.....	67
	<b>Conclusion générale</b> .....	68
	<b>Références bibliographiques</b> .....	69
	<b>Annexes</b> .....	80



## ***LISTE DES TABLEAUX***

<b>Tableau 1 :</b>	Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV.....	29
<b>Tableau 2 :</b>	Données climatique de la région de Ouargla.....	33
<b>Tableau 3 :</b>	Teneur de la plante chiendent en aglycones.....	35
<b>Tableau 4 :</b>	Teneur de la plante chiendent en anthocyanes.....	36
<b>Tableau 5 :</b>	La phase mobile utilisé dans la chromatographie liquide à haut Performance.....	44
<b>Tableau 6 :</b>	Temps de rétention de quelques étalons aglyconiques.....	44
<b>Tableau 7 :</b>	Le gradient de la phase mobile utilisé dans la chromatographie liquide à haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (LC-MS/MS)....	47
<b>Tableau 8 :</b>	Caractéristiques des bactéries utilisées.....	49
<b>Tableau 9 :</b>	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.....	50
<b>Tableau 10 :</b>	R <sub>f</sub> des composés existants dans les extraits aglyconiques des trois parties de la plante.....	54
<b>Tableau 11 :</b>	R <sub>f</sub> des composés existants dans les extraits anthocyaniques des trois parties de la plante.....	55
<b>Tableau 12 :</b>	Temps de rétention et les concentrations des composés existants dans les extraits aglyconiques des trois parties de la plante.....	57
<b>Tableau 13 :</b>	Temps de rétention et les concentrations des composés existants dans les extraits anthocyaniques des trois parties de la plante.....	58
<b>Tableau 14 :</b>	R <sub>f</sub> et couleur des composés existants dans l'extrait aglyconique séparés sur plaque de gel de silice.....	60
<b>Tableau 15 :</b>	R <sub>f</sub> et couleur des composés existants dans l'extrait anthocyanique séparés sur plaque de gel de silice.....	61
<b>Tableau 16 :</b>	Le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aglyconique.....	64
<b>Tableau 17 :</b>	Le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait anthocyanique.....	64
<b>Tableau 18 :</b>	Le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de la quercétine.....	65

<b>Tableau 19:</b>	Valeurs des diamètres des zones d'inhibition(en mm) des bactéries avec les deux extraits aglyconique et anthocyanique.....	66
<b>Tableau 20 :</b>	Maximums d'absorption et ions caractéristiques des acides phénoliques et flavonoides détectés dans l'extrait PSFME de baies d'argousier.....	93

## ***LISTE DES FIGURES***

<b>Figure 1 :</b>	Quelques exemples des acides phénoliques.....	5
<b>Figure 2 :</b>	Quelques exemples des dérivés de l'acide cinamique.....	6
<b>Figure 3 :</b>	Structure de base d'un flavonoïde.....	6
<b>Figure 4 :</b>	Structure du cationflavylium ou 2-phényl-1-benzopyrilium.....	7
<b>Figure 5 :</b>	Structure de la (+) – Catéchine.....	7
<b>Figure 6 :</b>	Squelette de base des flavonoides.....	12
<b>Figure 7 :</b>	Cyclisation d'un cinnamoyl-phloroglucinol « Caféoyl-phloroglucinol »...	14
<b>Figure 8 :</b>	Biosynthèse des flavonoïdes.....	16
<b>Figure 9 :</b>	Les structure des bactéries.....	19
<b>Figure 10 :</b>	La plante chiendent « <i>Cynodon dactylon (L) Pers</i> ».....	30
<b>Figure 11 :</b>	La teneur des aglycones en mois décembre et juillet.....	35
<b>Figure 12 :</b>	La teneur des anthocyanes en mois décembre et juillet.....	36
<b>Figure 13 :</b>	Rupture des liaisons osidique des composées hétérosidique.....	40
<b>Figure 14 :</b>	L'oxydation des proanthocyanes.....	40
<b>Figure 15 :</b>	Le cation flavylium.....	40
<b>Figure 16 :</b>	Les plaques CCM des extraits aglyconiques des trois parties de la plante Chiendent « <i>Cynodon dactylon (L) Pers</i> ».....	53
<b>Figure 17 :</b>	Les plaques CCM des extraits anthocyaniques des trois parties de la plante Chiendent« <i>Cynodon dactylon (L) Pers</i> ».....	55
<b>Figure 18 :</b>	La plaques CCM de l'extrait aglyconique sous la lampe U.V.....	60
<b>Figure 19 :</b>	La plaques CCM de l'extrait aglyconique sous la lampe U.V .....	61
<b>Figure 20 :</b>	Spectre des ions de produit a <sub>2</sub> de l'extrait aglyconique on mode négatif (M-H).....	62
<b>Figure 21 :</b>	5,7,3',4'- tétra hydroxy flavanone.....	62
<b>Figure 22 :</b>	Spectre des ions de produit b <sub>2</sub> de l'extrait anthocyanique on mode négatif (M-H) <sup>-</sup> .....	63
<b>Figure 23 :</b>	3'- méthyloxy de la lutéoline-8-C-hexose « Chrysoeriol-8-c-hexose ».....	63
<b>Figure 24 :</b>	Le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits des aglycones, des anthocyanes et de la Quercétine.....	65

## ***LISTE DES ABREVIATIONS***

**HPLC** : High performance liquid chromatography

**DPPH** : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle

**DMSO** : Diméthyle sulfoxide

**NCCLS** : National Committee for Clinical Laboratory Standards

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**LDL** : Low density lipoprotein

**HIV** : Human immunodeficiency virus

**SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise

**ADV** : Adénovirus

**HV** : Herpes virus

**A/WS/33** : Virus de la grippe A

**LDL** : Low density lipoprotein

**HMC-1** : Human mast- cell line

**L P S** : Lipopolysaccharide

**MAPK** : Mitogen activated protein kinase

**JNK** : C-Jun N-terminal kinase

**ROS** : Réactive oxygenspecies

**Rf** : Résolution frontal

**Tr** : Temp de retention

**TFA** : Trifluoroacétic acid

**ACN** : Acétonitrile

**ERO** : European Regulators Organization

**NADPH** : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

**CCE** : Comité de coordination et d'exécution

**PSFME** : Popular Subtle Forgiving Moderate Excited

**ONM** : Office National de la Météorologie

**TNF- $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor alpha

**IL-1- $\beta$**  : Interleukine 1 béta

## **INTRODUCTION**

Les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire. Nous pouvons citer comme exemple les alcaloïdes, les terpènes, les stéroïdes, les polyphénols, les huiles essentielles ..... etc.

Parmi ces composés on trouve les polyphénols qui représentent l'un des groupes les plus importants du fait qu'ils ont une faible toxicité et de nombreux avantages biologiques, notamment thérapeutiques, pharmaceutiques, cosmétologiques et alimentaires.

En 1992, nous avons assisté à un grand regain des phytothérapeutes pour les produits riches en polyphénols, et principalement les flavonoïdes. Ces derniers ont d'ailleurs montré qu'ils avaient des propriétés biologiques très importantes et très vastes. Nous pouvons dire que ce sont notamment des grands antioxydants et antimicrobiens[1].

En effet, de nombreuses études antérieures ont prouvé que les flavonoïdes étaient capables d'inhiber différents types de microorganismes : bactéries, levures, moisissures, protozoaires et même virus. De même l'activité antioxydante a été attribuée à la majorité des flavonoïdes découverts.

Ces derniers avaient la capacité de neutraliser différents types de radicaux libres : les peroxydes (ROO•), les alcoxyles (RO•), les superoxydes (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et les hydroxyles (HO•) ; empêchant de ce fait l'oxydation des lipides, des protéines, des enzymes et de l'ADN.

Les flavonoïdes tels que la rutine, la disomine, la lutéoline et la quercétine sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés, parce qu'ils sont utilisés dans les industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétologiques, soit à l'état pur ou sous forme d'extraits[2].

Dans ce travail, nous avons réalisé les suivants :

- 1- La séparation et l'identification des aglycones et des anthocyanes existant dans la plante « *Cynodon dactylon (L) Pers* »
- 2- La détermination des propriétés biologiques.

De ce fait, nous avons articulé le manuscrit en trois chapitres.

- 1- Le premier chapitre est une étude théorique des flavonoïdes (les aglycones et les anthocyanes) de la plante étudiée (*Cynodon dactylon (L) Pers*)
- 2- Le deuxième chapitre présenté le matériels et les méthodes utilisés dans cette étude, on commence par l'extraction puis la séparation et l'identification structurale des aglycones et des anthocyanes existant dans la plante « *Cynodon dactylon (L) Per* ». plus une étude sur l'activité antioxydante et antibactérienne des composées flavonoïques.
- 3- Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats et discussions suivie par une conclusion générale.

***Chapitre I :***  
***Partie Théorique***

## I.1. Généralités Sur Les Polyphénols

### I.1.1 Définition des polyphénols:

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés.

Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal. Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines [1,2,3].

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants[4]. Ils peuvent être de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tannins [2,3].

Comme la majorité des composés de métabolites secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, qui sont:

- Défense contre les pathogènes; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes.
- Dissuasion alimentaire. On parle du phénomène d'allopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.
- Attraction des pollinisateurs: les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.
- Protections contre les rayonnements UV les molécules qui donnent des arômes et odeurs aux plantes. Ce qui sert principalement à attirer les herbivores. Exemple: les polyphénols des pélargoniums [5,6,7,8].



## I.1.2. Classification des polyphénols:

Les polyphénols possèdent plusieurs groupements phénoliques avec ou sans autres fonctions (alcooliques, carboxyles...). Dans cette famille de molécules, se trouvent de nombreuses substances, qui peuvent se classer selon leur structure en cinq groupes principaux:

### I.1.2.1. Les acides phénols :

Les acides phénols, ou acides phénoliques, ont une fonction acide et plusieurs fonctions phénols. Ils sont incolores et plutôt rares dans la nature. Ils se divisent en deux catégories:

Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides [9]. Exemple : l'acide gallique qui est un élément principale de la structure des tannins hydrolysables .

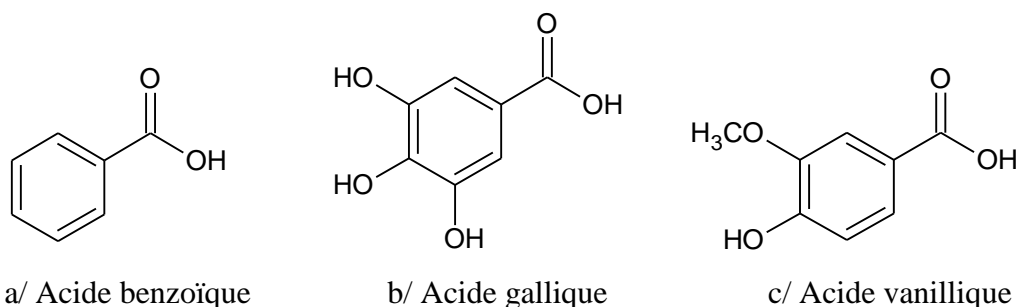
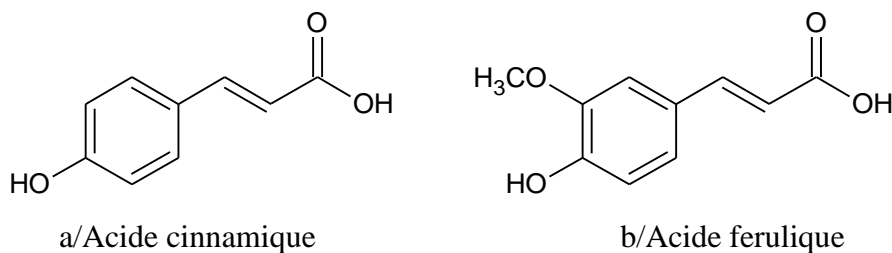
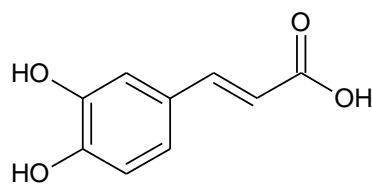


Figure 1 : Quelques exemples des acides phénoliques

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide synaptique [9,10]; dont certains sont représentés dans la figure2.





c/Acide caféique

Figure 2 : Quelques exemples des dérivés de l'acide cinamique

### I.1.2.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (a et b) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle c) (Figure 1). Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones.

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances[11]

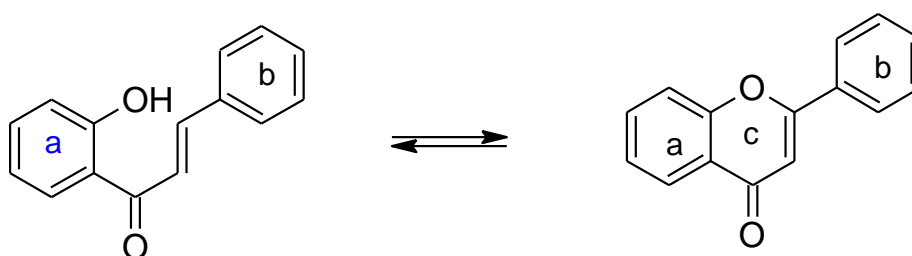


Figure 3 : Structure de base d'un flavonoïde

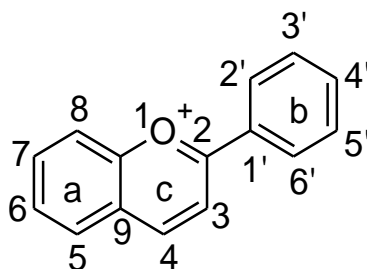
### I.1.2.3. Les anthocyanes :

Les anthocyanes donnent des couleurs très variées : bleu, mauve, rose ou rouge. Ces molécules ont, comme les flavonoïdes, un squelette de base en C15 formé de deux cycles a et b, et d'un hétérocycle (cycle c); mais leur caractéristique principale est que ce dernier est chargé positivement. Cette charge est due à leur structure de base commune : le cation flavylium ou 2-phenyl-1-benzopyrylium (Figure 4) [11].

Les trois anthocyanes principaux sont :

- \* La pélagonidine : qui a un OH en 4' et donne une couleur rouge-orange.
- \* La cyanidine : qui a deux OH en 3', 4' . Elle donne une couleur rouge magenta.

\*La delphinidine : qui a trois OH en 3', 4', 5'. Elle donne une couleur mauve.



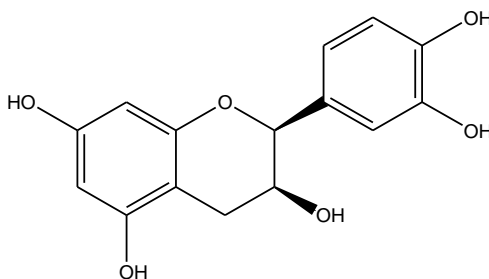
**Figure 4:** Structure du cation flavylium ou 2-phényl-1-benzopyrylium.

#### I.1.2.4. Les flavanes :

Les flavanes sont sous forme de monomères (ex : la catéchine) ou sous forme de polymères (dimères, trimères...de catéchine).

Ils existent sous forme de plusieurs stéréo isomères provenant de deux carbones asymétriques: C2 et C3 [12].

Les flavanes sont très répandues dans les écorces végétales (Figure 3)



**Figure 5:** Structure de la (+) –catéchine.

#### I.1.2.5. Les tannins :

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

\* Les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique (Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

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

Les polymères donnent une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines [3,12].

### **I.1.3. Biosynthèse des polyphénols:**

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

#### **I.1.3.1. La voie de l'acide shikimique:**

Dans cette voie, l'érythrose 4-phosphate et le phosphoénol pyruvate sont produits par les hydrates de carbones lors de leur dégradation par la voie des pentoses phosphate et la glycolyse respectivement.

Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés [9,13].

Aussi, il est intéressant de préciser que la tyrosine et la phénylalanine dérivent de cette voie métabolique. En effet, ces deux acides aminés sont des intermédiaires métaboliques entre l'acide shikimique et l'acide cinnamique.

#### **I.1.3.2. La voie de l'acide malonique:**

La glycolyse et la  $\beta$ -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl-CoA donnant le malonate. C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités «Acétate» qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase [14,15].

### **I.1.4. Intérêts thérapeutiques des polyphénols:**

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants [16,17,18]. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, comme le Daflon produit à base de diosmine.

Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux bon-mauvais (qui peuvent être les deux), comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier [19,20].

En raison de ces vertus, les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et pharmaceutiques. Parmi les nombreux intérêts qu'offrent les polyphénols à la santé, nous pouvons citer les suivants:

#### **I.1.4.1. Activité anticancéreuse:**

Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes. Des cellules impliquées, comme les hépatocytes, synthétisent des enzymes dites de phase I (notamment des mono oxygénases, telle que les cytochromes P-450) qui peuvent oxyder les substances mutagènes hydrophobes en produits constituant le substrat des enzymes de phase II (glucoronyl transférases, sulfotransférases...).

Ces dernières convertissent leurs substrats en espèces hydrolysables facilement excrétées hors des cellules. Les enzymes de phase I et II agissent également dans la muqueuse intestinale. Elles sont synthétisées sous l'action des substances polyphénoliques trouvées dans les légumes, et aussi sous l'action des isothiocyanates (dérivés des glucosinolates) [21].

#### **I.1.4.2. Prévention contre les maladies cardiovasculaires :**

En effet, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire [22]. Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) [23] évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués).

Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères.

Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde [24].

#### **I.1.4.3. Prévention contre les maladies hormona-dépendantes:**

L'exemple le plus important est la prévention contre l'ostéoporose. Ceci en modulant la réponse aux œstrogènes endogènes. Certains polyphénols et plus particulièrement les isoflavones du soja ont une affinité remarquable pour les récepteurs d'œstrogènes et sont qualifiés pour cela de phyto-oestrogènes.

Les fruits et légumes contenant aussi des polyphénols, tels que la quercétine de l'oignon ou le kaempferol de la chicorée, possèdent également des propriétés pseudo-oestrogéniques inhibant la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. Mais, de nouvelles études restent nécessaires pour confirmer ces effets chez l'homme[25].

Aussi, les effets bénéfiques des polyphénols (lignanes en particulier) dans la prévention de cancers hormono-dépendants ont été largement documentés ces dernières années par des études épidémiologiques identifiant une relation entre la présence de lignanes dans la ration alimentaire et le taux d'incidence de certains cancers [26].

#### **I.1.4.4. Action gastro-protectrice des polyphénols :**

Les polyphénols principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques comme l'acide caféique, l'acide gallique ; sont capables de réduire la surface des lésions gastriques produites par l'indométacine chez les rates.

L'acutissimine B et phillyraeïdine A isolées et purifiées à partir de *Quercus suber* et *Quercus cocci fera* ont aussi confirmé l'action gastro-protectrice attribuée aux polyphénols.

De même, ces derniers montrent une activité antibactérienne très importante contre *Helicobacter pylori*, responsable de l'ulcère de l'estomac et du duodénum [27,28].

#### **I.1.5. Dosage des polyphénols totaux :**

L'estimation de la teneur en phénols totaux peut être obtenue par différentes méthodes. En particulier par l'utilisation d'un mélange de phosphomolybdate et de phosphotungstate commercialisée sous la dénomination de réactif de Folin-Ciocalteu [29].

Le caractère réducteur des composés phénoliques et leur complexation possible avec les métaux lourds conduisent à la formation de complexes colorés bleus que l'on peut doser par colorimétrie vers 720nm. Cette méthode est très sensible mais peu spécifique car beaucoup d'autres composés réducteurs peuvent interférer, comme l'acide ascorbique. Il est donc recommandé de ne l'utiliser, que sur des extraits purifiés et de réaliser des témoins négatifs.

On peut avoir alors une bonne approximation de la teneur de l'extrait en phénols que l'on exprime par rapport à un composé de référence (par exemple en équivalents d'acide gallique ou d'acide chlorogénique). La valeur obtenue n'est pas très satisfaisante car elle est très globale et ne donne aucune indication sur les différents composés présents dans l'échantillon, car chacun d'entre eux peut réagir de manière différente dans la réaction colorée[30].

## I.2.Généralités Sur Les flavonoïdes

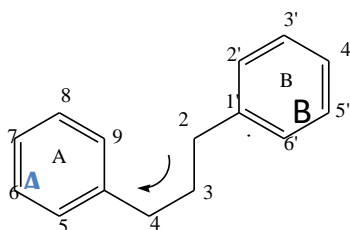
### I.2.1. Définition et généralités:

Les flavonoïdes rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones. Ces composés représente le groupe de composés phénoliques le plus diversifié: plus de 4000 flavonoïde sont déjà été identifiés [31].

Le terme «flavonoïde» est dû à sa couleur jaune (= flavusen latin)qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration; au delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes[32]. Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois...etc. Aussi, ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal [33]. Certains sont plus spécifiques de certains tissus. Exemple: les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales de fleurs.

### I.2.2.Classification chimique :

Tous les flavonoides environ 3000 composés ont une origine bio synthétique commune et, de ce fait, possèdent le même squelette de base a « 15 » atomes de carbones constitués de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaîne en C3



**Figure 6** : squelette de base des flavonoides

Ils peuvent être regroupés en une douzaine de classe selon le degré d'oxydation de la chaîne C3 [34][35].

1°/ 2-phényl benzopyriliums, anthocyanes

2°/ phényl chromane

- a) flavones, flavonol, et leur dérivés
- b) flavanones et dihydroflavonole



c) isoflavanones – isoflavones

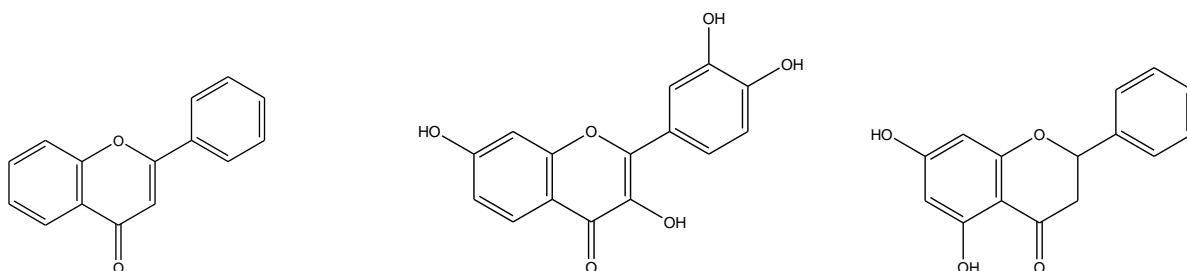
3°/ 2-phenylechromane

´a) flavanes

´b) flavan- 3-ols, flavan –3,4-diols

4°/ chalcones et dihydrochalcones

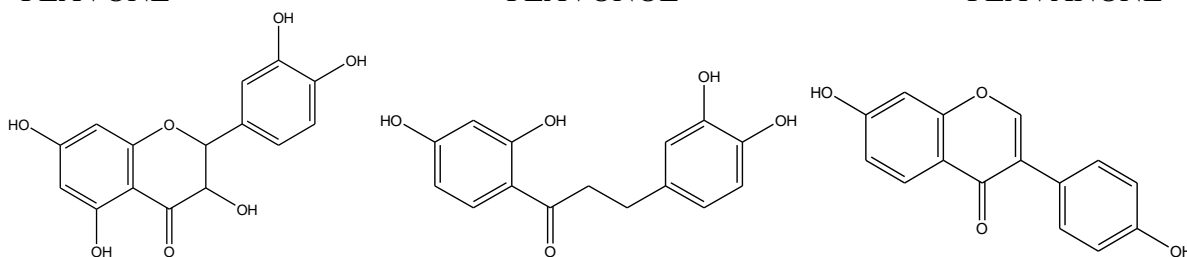
5°/ benzylidène coumaranones (aurones)



FLAVONE

FLAVONOL

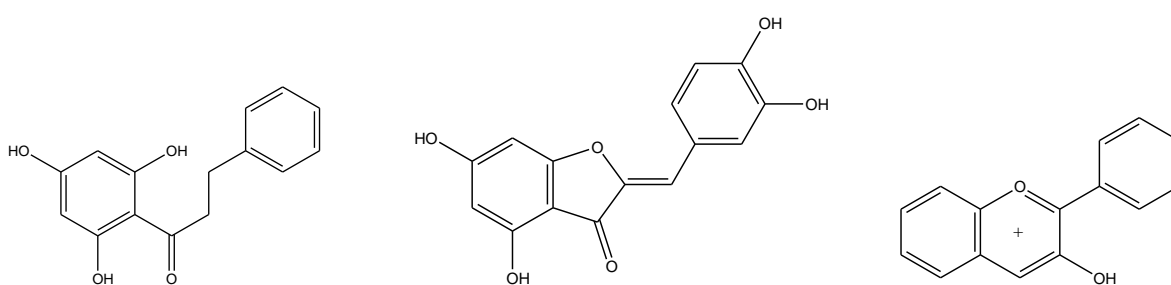
FLAVANONE



FLAVANONOL

CHALCONE

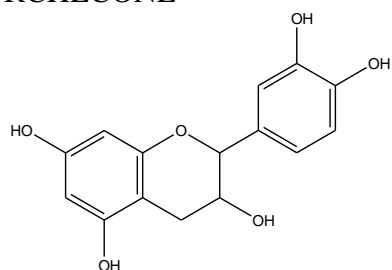
ISOFLAVONE



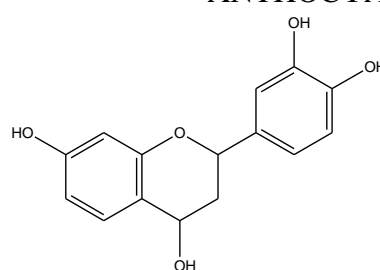
DIHYDRCHLCONE

AURONE

ANTHOCYANIDIN



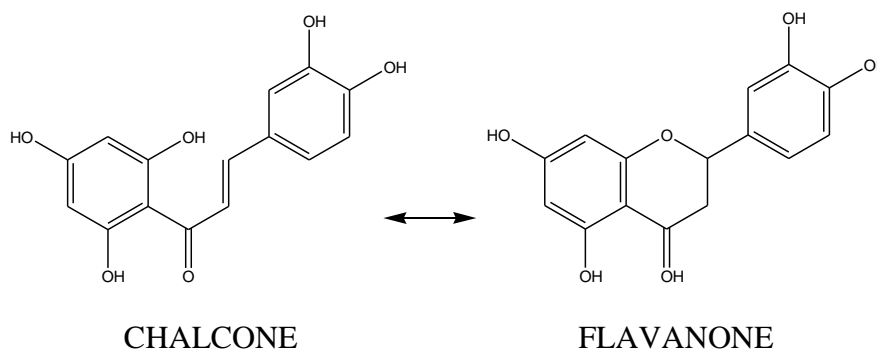
CATECHINE



FLAVAN-3,4-DIOL

Les composés flavoniques se présente habituellement dans les plantes sous forme des glucosides, dont la plupart des groupes (OH) phénolique sont combinés avec du sucre [35].

Les groupes hydroxyle sont souvent trouvés à la position 5 ou 7 dans le cycle « A », et peuvent être considérées théoriquement comme résultant de la cyclisation d'un cinnamoyl-phloroglucinol « caféoyl-phloroglucinol »[36]



**Figure 7 :** Cyclisation d'un cinnamoyl-phloroglucinol « caféoyl-phloroglucinol »

Le cycle « B » contient des groupes alkoxy en position 4' ou en positions 3' et 4' [36].

D'autant plus les flavonoïdes peuvent être sous forme d'hétérosides, sachant que la partie osidique peut être mono-di- ou trisacharidique, il existe deux types d'hétérosides [37] :

- O-hétéroside
- C-hétéroside

La liaison entre la génine et l'ose peut se faire par l'un des hydroxyles phénoliques de la génine mais, en règle générale se sont surtout 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.

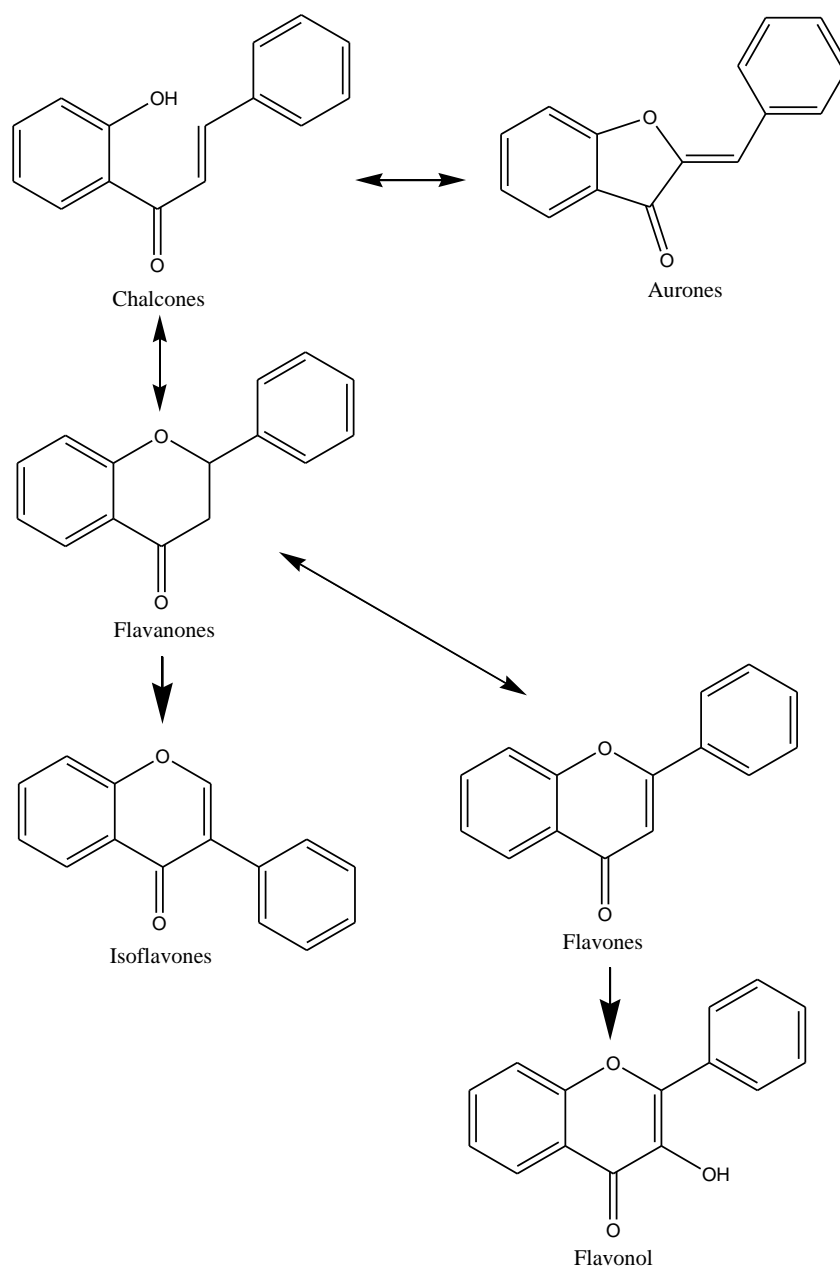
Les C-hétérosides : on en connaît plus de 300, la liaison s'établit entre le carbone anomérique du sucre et le carbone en position 6 ou 8 de la génine [38].

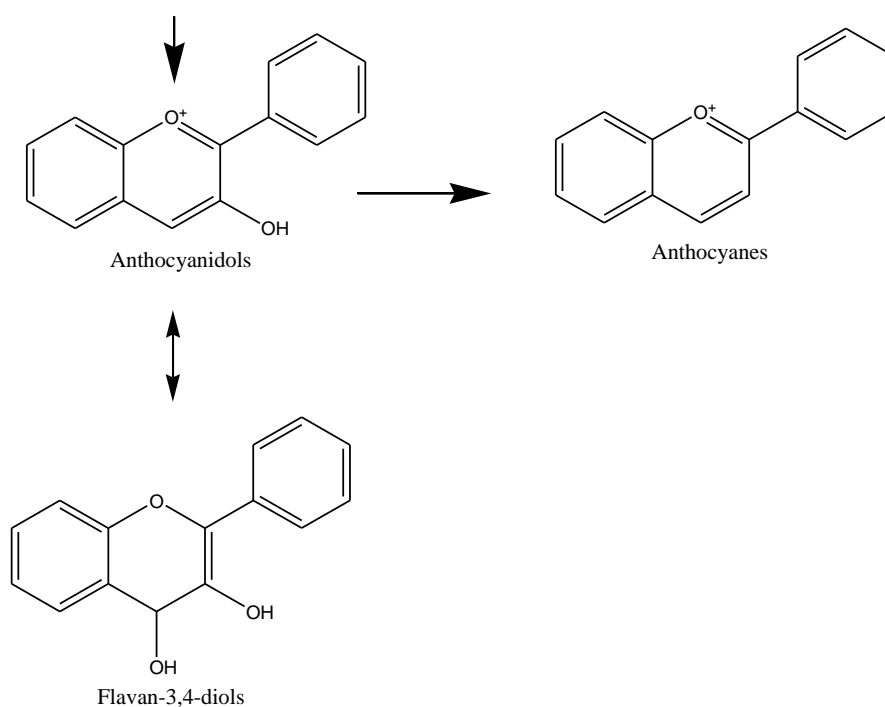
### I.2.3. Biosynthèse des flavonoïdes :

Comme ça a été précisé auparavant, les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone. Ce dernier est constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaînes en C3, on parle alors des chalcones. Ces dernières représentent le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes [31,33,35]. La chalcone est métabolisée sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone : naringénine. Ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase donne les flavones : apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R)-dihydrokaempférol respectivement. Les

deux enzymes citées fonctionnent différemment: la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3,

tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C3. Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-reductase, se métabolise en flavonol, kaempférol ou en flavan-3,4-diol et leucoanthocyanidol respectivement [34,35,37]. Toutes les voies métaboliques intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes peuvent être simplifiées comme c'est schématisé dans la figure 5.





**Figure 8 : Biosynthèse des flavonoïdes**

Les composés de chaque groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyyles...) sur les deux cycles aromatiques et la chaîne en C3 intermédiaire ou l'hétérocycle. A l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent souvent sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est dite : aglycone.

#### **I.2.4. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes:**

Les intérêts thérapeutiques des flavonoïdes sont maintes fois été démontrés. Pour citer quelques exemples, nous pouvons dire que:

Des expériences menées sur des souris ont montré que la quercétrine avaient une activité antidiarrhéique très importante. Le mécanisme de ces composés consistait à augmenter l'absorption des électrolytes et de l'eau par la muqueuse intestinale [39,40].

Aussi d'autres flavonoïdes, comme l'apigénine, ont été décrits comme des composés bactéricides et bactériostatiques très efficaces [41-43].

De même les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase [44,45].

Mais pour confirmer et mettre le point sur les différentes activités biologiques des flavonoïdes qui nous ont d'ailleurs poussés à aborder ce travail, pour présenter ce qui suit:

#### **I.2.4.1. Activité antioxydante :**

Les flavonoïdes sont considérés comme des agents antioxydants très puissants en raison de leur structure, se rapportant en particulier à la position des groupements hydroxyles sur les noyaux aromatiques, et la capacité des composés aromatiques à supporter une délocalisation électronique.

Ces dernières années, un intérêt particulier a été accordée aux propriétés antioxydantes des flavonoïdes, qui seraient attribuées à:

- Leur capacité à piéger directement les radicaux libres.
- Leur pouvoir de chélater les ions métalliques impliqués dans la production des espèces oxygénées réactives (ERO).
- Leur capacité d'inhiber quelques enzymes en particulier les oxydases et d'inhiber les enzymes pro-oxydantes.

Les flavonoïdes sont capables d'inhiber la peroxydation lipidique causée par les EOR dans la bicouche phospholipidique. Du fait de leur caractère hydrophile, les flavonoïdes peuvent interférer avec les réactions en chaîne à l'interface des membranes et prévenir ainsi la propagation de ces réactions en chaîne.

Certains flavonoïdes peuvent chélater des ions métalliques de transition (Al, Cu, ...) responsables de la formation de EOR et ainsi, inhiber la réaction de la lipooxy génase.

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments. Ils exercent leur capacité antioxydante au travers de la stimulation ou de la protection des systèmes antioxydants endogènes. En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps[46].

La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20%de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du côlon et y prévient l'apparition des cryptes anormales.

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

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxy des oxyguanosine(8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. La catéchine a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. Elle est très abondante dans le thé sous forme d'épigallo catéchin gallate.[16,46].

L'activité antioxydante des flavonoïdes peut être mesurée par l'utilisation d'une méthode simple, rapide et facile à mettre en œuvre ; c'est la méthode de DPPH, dont le DPPH est un radical libre, stable, qui possède une bande d'absorbance à 517 nm, employé pour évaluer l'activité antioxydante des composés purs ou de mélange complexe, la méthodologie est basée sur la décroissance de l'absorbance d'une solution méthanolique de DPPH suite à l'addition de l'antioxydant.[47]

#### **I.2.4.2. Activité antimicrobienne des flavonoïdes:**

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes [48].

##### **I.2.4.2.1. Activité antibactérienne des flavonoïdes:**

###### **I.2.4.2.1.1. Définition de bactérie :**

Les bactéries sont de minuscules êtres vivants microscopiques, unicellulaire et procaryote, présents dans tous les milieux : l'air, les sols, l'eau, la peau. Certaines peuvent provoquer des maladies (rhume, listériose) d'autres sans danger et nécessaires au bon fonctionnement du microbiote intestinal , elles empêchent le développement d'autres bactéries et interviennent dans la production de vitamine K , elles aident à digérer, elles sont aussi utilisées pour fabriquer certains aliments (yaourts, choucroute), Les bactéries sont les micro-organismes les plus populaires de notre planète.

Les bactéries se nourrissent par simple intussusception, à travers la membrane d'enveloppe des cellules, aux dépens de l'eau ou du liquide dans lequel elles vivent : desséchées elles cessent de se nourrir[49].

La vie des bactéries, et surtout leur développement, nécessite toujours la présence de l'humidité et d'une température qui, en général ne soit ni trop basse ni trop élevée (mais on connaît aussi des exemples de bactéries capables de vivre et de se développer à de hautes températures); les unes ont besoin de l'air, les autres, au contraire, ne peuvent se développer qu'à l'abri de l'air.

Les unes sont capables de photosynthèse, les autres pas. La présence de certaines bactéries peut s'opposer au développement de certaines autres. Enfin, un grand nombre de substances, nommées antiseptiques ou antibiotiques tuent les bactéries (bactériocides), ou bien arrêtent leur développement (bactériostatiques).

#### I.2.4.2.1.2. Structure des bactéries :

Il existe différentes formes de bactéries, chaque forme ayant une appellation particulière :

- les bactéries sphériques appelées coques, de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre
- les bactéries en forme de bâtonnets appelées bacilles de 1 à 10  $\mu\text{m}$
- les bactéries incurvées appelées vibrions
- les bactéries en forme de fuseau appelées fusiformes
- les bactéries spirilles.

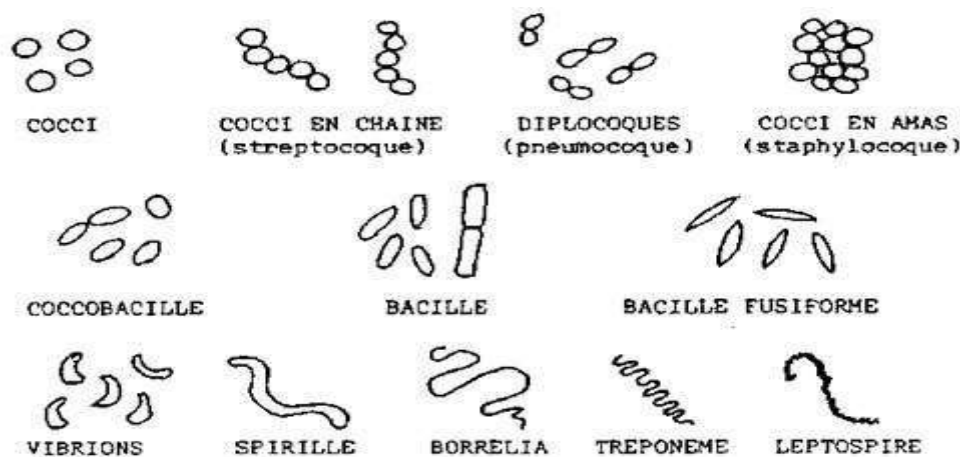


Figure 9: Les structures des bactéries

De nombreuses études épidémiologiques et expérimentales récentes suggèrent que les composés flavoniques très abondants dans les plantes médicinales et alimentaires possèdent un pouvoir antibactérien remarquable.

### **I.2.4.2.1.3. Quelques exemples des souches bactériennes :**

#### **I.2.4.2.1.3.1. *Escherichia coli* :**

Egalement appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, bacille gram négatif radio résistant de la famille des Enterobacteriaceae. C'est une bactérie intestinale (Gram négatif) des mammifères, très commune chez l'être humain. En effet, elle compose environ 80 % de notre flore intestinale aérobie. Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites, ou se psis. La taille de cette bactérie varie en fonction des conditions de croissance (entre 0,5 à 3 µm), pesant de 0,5 à 5 picogrammes<sup>1</sup>, les bactéries en croissance rapide étant plus allongées et donc plus grandes que les bactéries quiescentes[50].

#### **I.2.4.2.1.3.2. *Staphylococcus aureus* :**

Les staphylocoques sont des bactéries de type cocci à Gram positif, qui se retrouvent fréquemment chez les personnes en bonne santé, habituellement dans la muqueuse du nez. La bactérie peut ensuite coloniser d'autres régions, via les mains, et en particulier les parties humides du corps comme les aisselles ou la zone génitale.

Parmi la quarantaine de types de staphylocoques existants, le *Staphylococcus aureus* est le plus souvent rencontré dans les pathologies infectieuses. Ce staphylocoque peut causer des infections graves. De plus, il est l'un des principaux responsables des infections nosocomiales, c'est-à-dire contractées en milieu hospitalier, ainsi que des intoxications alimentaires.

La bactérie *Staphylococcus aureus*, également nommée staphylocoque doré en référence à la couleur or des colonies qu'il forme, a été décrit pour la première fois en 1880 par Louis Pasteur.



On retrouve le staphylocoque doré sur la peau de l'homme et de l'animal : elle fait partie de notre flore cutanée. On la retrouve aussi sur les muqueuses (du nez notamment). On peut par ailleurs la retrouver dans l'eau, sur le sol, dans les aliments, sur des objets. C'est une bactérie commensale : elle vit avec nous[51].

#### **I.2.4.2.1.3.3. *klebsiella pneumoniae* :**

*Klebsiella pneumoniae* est une bactérie naturellement présente dans l'organisme, elle fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* et comporte cinq sous-espèces et Il s'agit d'une bactérie dite Gram négatif. Elle est un germe commensal (c'est-à-dire qu'il ne provoque de maladie qu'à condition que le sujet se fragilise) du tube digestif et des voies aériennes supérieures, elle peut donc devenir pathogène dans certaines conditions : chez les personnes présentant des défenses immunitaires diminuées (on parle de personnes immunodéprimées), chez les personnes alcooliques ou encore diabétiques. Elle est l'espèce du genre *Klebsiella*, la plus pathogène pour l'humain, on la trouve aussi chez des animaux[52].

#### **I.2.4.2.1.3.4. *Salmonella Typhi* :**

Les *Salmonella* sont des bactéries Gram négatif, il sont des entérobactéries dont les caractères essentiels sont de ne pas fermenter le lactose et de ne pas produire d'uréase.

Les *Salmonella* sont des parasites de l'homme, des mammifères (rongeurs), des oiseaux (volailles) et des animaux à sang froid (reptiles).

Elles sont responsables, après pénétration par voie orale, de nombreuses infections (salmonelloses), notamment des fièvres typhoïde et paratyphoïdes (maladies à déclaration obligatoire n° 1), des gastro-entérites et des toxi-infections alimentaires collectives (maladies à déclaration obligatoire n° 12)[52].

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve: les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries: *Staphylococcus aureus* [53], *Escherichia coli* [48], *Enterococcus faecalis*, cloaceae, *Heliotropiumsiniatum*, *Proteus mirabilis*.....etc[54,55,56].

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple: sur plusieurs bactéries testées l'apigénine n'a montré une faible activité comme *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus*; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule [41,42,43].

Aussi dans certains travaux, il a été cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95% étaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60% de la même plante ne l'étaient pas, comme c'était le cas des flavonoïdes de *Linumcapitatum* contre *Staphylococcus aureus* [57].

La diffusion radiale souvent demeure utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne in vitro, même si la mesure par le biais de cette méthode est parfois difficile à cause des zones diffusionnelles[58].

Bien que le mécanisme des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli*.

En effet, selon les travaux de Dadi et ses collaborateurs[59], la quercétine serait capable d'inhiber la gyrase bactérienne par deux mécanismes:

- Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité.
- Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase. Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.[59]

#### **I.2.4.2.2 Activité antifongique des flavonoïdes:**

La majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle d'Ortuno et ses collaborateurs (2006), qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus parasidi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'hespéridine, la nobilétine, la sinensétine et la tangéritine

extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *Penicilliumdigitatum*[60].

Batawita et ses collaborateurs(2002), dans leur étude sur les flavonoïdes de *Conyzaaegyptica* L.,ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporumcanis*, *Microsporumgypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida zeylanoïdes*. D'autres flavonoïdes extraits de *Tibouchina grandifolia* ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures [61].

Néanmoins, les études portées sur l'activité antifongique des flavonoïdes restent encore insuffisantes du fait de la grande hétérogénéité des moisissures et des levures.

#### **I.2.4.2.3. Activité antivirale des flavonoïdes:**

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, le virus de l'herpès (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A (A/WS/33) [62,63].

Certains chercheurs ont suggéré que les polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte; bloquant ainsi tout le processus infectieux. D'autres travaux plus récents ont ensuite démontré que les flavonoïdes inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARN viral [63]. Ceci, impliquait que les flavonoïdes n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication virale.

#### **I.2.4.3. Activité des flavonoïdes contre la cardiotoxicité, la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique:**

En effet, les flavonoïdes sont aussi connus pour avoir un rôle préventif contre la cardio toxicité, leur inhibition de la peroxydation lipidique et leur capacité à prévenir différentes atteintes hématologiques [64].

En effet, les flavonoïdes apportent une protection contre les radicaux libres en empêchant leur liaison avec les lipides membranaires des cellules; ce qui se traduit par une diminution du malonyl dialdéhyde (peroxyde lipidique) et par la protection de la composition

hématologique en permettant une bonne régénération érythrocytaire et une prévention contre la leucopénie et la thrombopénie observées en présence des radicaux libres [65,66].

Les flavonoïdes ont une capacité à capturer et désactiver les radicaux libres. Cette activité anti radicalaire nécessite :

- Une structure ortho dihydroxy du cycle B des flavonoïdes.
- Une double liaison en C2-C3 conjuguée avec la fonction C4-oxo, responsable de la délocalisation d'électrons.
- Les hydroxyles en position C3 et C5 qui permettent une activité anti radicalaire maximale [67,68].

#### **I.2.4.4. Activité cardioprotectrice des flavonoïdes:**

Les flavonoïdes sont connus pour leur effet protecteur sur la santé cardiovasculaire en modifiant plusieurs processus pathologiques qui interviennent dans l'apparition des maladies cardiovasculaires. Ces effets sont notamment les suivants :

- Inhibition de l'oxydation du cholestérol LDL (mauvais cholestérol) par les radicaux libres, étape initiale importante dans la formation de la plaque d'athérome.
- Abolition de la tendance des cellules sanguines de petite taille ou plaquettes à se regrouper et à former des caillots sanguins. Cet effet est souvent décrit comme « l'effet aspirine ».
- Régulation des réponses inflammatoires et immunitaires au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins qui peut être anormale en cas de maladie cardiovasculaire.
- Régulation du tonus vasculaire ou degré de constriction des petits vaisseaux sanguins qui contribue à l'hypertension [69,70].

#### **I.2.4.5. Intérêt des flavonoïdes contre l'obésité:**

Certains flavonoïdes ont un intérêt dans le métabolisme lipidique en diminuant la lipidémie. L'effet de quelques flavanones (la naringénine, la naringine, l'hespérétine et l'hespidine) sur la conversion des pré adipocytes en adipocytes, sur une lignée cellulaire AM-Ia [71].

Les deux flavonoïdes sous forme aglycone, la naringénine et l'hespérétine, ont induit un arrêt de la croissance des cellules entraîné par une apoptose. L'impact de la naringénine sur différentes protéines impliquées dans l'apoptose a été déterminé.

Le résultat était que dans les cellules traitées avec ce flavonoïde, les taux de protéines antiapoptotiques (p-Akt, NF- $\kappa$ B, et Bcl-2) étaient diminués, et ceux de Bad (protéines pro-apoptotiques) augmentés.

L'exposition des cellules à la naringénine ou à l'hespérétine durant une courtes périodes a augmenté la taille des gouttes lipidiques dans le cytoplasme.

De plus, l'expression de la fatty acid synthase (intervenant dans la synthèse des acides gras) et des PPAR- $\gamma$  a été augmentée dans les cellules traitées à la naringénine. Ces résultats suggèrent que l'apoptose induite par les flavanones n'intervient pas sur la conversion des pre-adipocytes en adipocytes. De ce fait, les adipocytes sembleraient ne pas être une cible directe pour les activités hypolipémiantes des flavanones[71].

#### **I.2.4.6. Intérêt des flavonoïdes contre les inflammations:**

Les mastocytes sont des cellules qui participent aux réactions allergiques et à l'inflammation en sécrétant des médiateurs inflammatoires comme l'histamine et des cytokines pro-inflammatoires. L'action pharmacologique des flavonoïdes suggère qu'ils pourraient présenter un intérêt dans le traitement des désordres allergiques en sous-régulant ces mastocytes.

En effet, une étude portée sur l'astragaline, la fisetine, le kaempférol, la myricétine, la quercétine et la rutine, sur les réactions inflammatoires allergiques induites par les mastocytes a permis de constater que toutes ces molécules, hormis l'astragaline, inhibaient la sécrétion de l'histamine. Les cinq flavonoïdes actifs ont également inhibé la hausse du taux de calcium intracellulaire.

L'analyse de l'expression des gènes et de la sécrétion de plusieurs cytokines dans des mastocytes humains (cellules HMC-1) a révélé que la fisetine, la quercétine et la rutine diminuaient l'expression et la production du TNF- $\alpha$ , de l'IL-1- $\beta$ , de l'IL-6 et de l'IL-8. Lamyrictine, quant à elle, a diminué celles du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 mais pas celles de l'IL-1- $\beta$  ou de l'IL-8. Enfin la fisetine, la myricétine et la rutine ont supprimé l'activation de NF- $\kappa$ B[72].

#### **I.2.4.7. Rôle des flavonoïdes dans la protection des neurones:**

Les flavonoïdes sont en effet connus pour être des agents protecteurs contre la dégénérescence des neurones. Ce rôle a principalement été mis en évidence dans le cas de la maladie de Parkinson. De nombreuses études suggèrent que l'inflammation joue un rôle dans l'apparition de cette maladie. Des chercheurs ont évalué l'effet de la lutéoline, un flavonoïde possédant diverses activités et notamment des effets anti-inflammatoires, sur la diminution du captage de la dopamine et la perte de neurones dans les cultures mésencéphaliques gliales.

L'évaluation de la diminution du captage de dopamine a été réalisée, dans l'étude considérée [73], grâce à un test de stimulation au LPS et la perte de neurones par la mesure de l'immuno-réactivité de ceux-ci à la tyrosine-hydroxylase.

Les résultats étaient que la lutéoline a inhibé de manière dose-dépendante la diminution du captage de la dopamine par les neurones et la perte de neurones. De plus, la lutéoline a également inhibé significativement l'activation de la microglie induite et la production excessive du TNF- $\alpha$  (cytokine pro-inflammatoire), du NO et du superoxyde dans les cultures de neurones mésencéphaliques et les cultures enrichies en microglie.

Ces résultats ont démontré que la lutéoline était capable de protéger les neurones des dommages ainsi causés [73].

#### **I.2.4.8. Rôle des flavonoïdes dans la protection oculaire:**

Le stress oxydant induit par les rayons ultraviolets (UV) joue un rôle important dans la progression de la cataracte. Certains flavonoïdes, comme la fisétine, ont été examinés pour leur effet protecteur contre le stress oxydant induit par les UV dans des cellules épithéliales de la lentille (SRA01/04). Les cellules ont été exposées à différentes intensités à l'UV, et ont été cultivées avec des concentrations croissantes de fisétine. La viabilité des cellules ainsi que le stress oxydant (cytométrie de flux) ont été alors mesurés.

Aussi, la translocation du NF-kappa B, impliquée dans les mécanismes inflammatoires, a été suivie par immunocytochimie. Enfin, l'expression des protéines NF-kappa B/P65, Ikappa B et MAPK (mitogen activated protein kinase) a été mesurée [74].

Le traitement des cellules avec les flavonoïdes testés a permis d'inhiber la mort cellulaire induite par les UVB, ainsi que la génération d'espèces oxygénées réactives.

D'un point de vue mécanistique, la fisétine était la plus active, et a inhibé l'activation et la translocation des NF-kappaB/p65 induite par les UVB, et ce via l'inhibition de la dégradation et de l'activation du Ikappa B. La fisétine a également inhibé la phosphorylation de plusieurs protéines de la famille des MAPK (P38 et c-Jun N-terminal kinase (JNK)) induite par les UVB [74].

Les flavonoïdes, et principalement la fisétine, pourraient donc permettre de limiter le stress oxydant induit par les rayons UV, ainsi que l'activation des NF-kappa B et MAPK dans les cellules épithéliales de la lentille oculaire humaine, suggérant ainsi un potentiel effet protecteur vis-à-vis de l'apparition de la cataracte.

### **I.2.5. Propriétés physiologiques des flavonoïdes :**

Les flavonoïdes comptent parmi les plus représentatifs des substances élaborées par les plantes à travers leurs métabolismes secondaires, ces substances possèdent des propriétés colorantes, aromatiques, médicinales et cosmétologiques et confèrent à la plante des avantages adaptatifs. De nombreux principes actifs sont bénéfiques à l'homme et à l'animal.

#### **I.2.5.1. Rôle attracteur chez les plantes :**

Les flavonoïdes sont à l'origine des propriétés chromatiques des différents pigments qui sont accumulés dans la plupart des organes des végétaux. Les pigments responsables des couleurs vives et variées des fleurs, ont non seulement un effet esthétique, mais sont aussi responsables de l'attraction des pollinisateurs (oiseaux et insectes).

Un tel constat a été mis en évidence par Harborne et al.(1978), confirmant le rôle des anthocyanes dans le processus de pollinisation. D'autres auteurs soulignent l'importance des flavonoïdes dans la fertilité des plantes, ils sont indispensables dans le développement des gamétophytes mâles [75].

Des mutations affectant l'enzyme clé chalcone synthétase qui catalyse la biosynthèse des composés phénoliques entraîne l'absence de pigments dans les anthères et une stérilité mâle.

### **I.2.5.2. Rôle protecteur chez les plantes :**

Les flavonoïdes jouent un rôle important dans la défense des plantes contre les agressions parasitaires ou abiotiques. Les plantes étant immobiles, elles ont dû mettre en place un système de résistance pour combattre les effets de l'environnement comme le gel et la sécheresse.

Les flavonoïdes pourraient également permettre aux plantes de survivre sur les sols riches en métaux toxiques comme l'aluminium [76].

Les flavonoïdes de défense peuvent être divisés en deux groupes : un groupe est préformé, et l'autre dont la synthèse va être induite par un phénomène physique, une infection ou un stress. Ils peuvent être présents de manière constitutive, mais leur synthèse va être augmentée par un facteur déclenchant, dans ce cas on parle de phytoalexines [77,78].

Les flavonoïdes préformés sont des composés synthétisés durant le développement normal de la plante. Ils sont souvent accumulés à des endroits stratégiques de la plante pour sa défense.

Ce qui explique que certains de ces composés possèdent un potentiel thérapeutique contre les microorganismes (bactéries, virus, champignons), et les insectes.

Les flavonoïdes pourraient entraîner des changements dans la différenciation tissulaire et promouvoir la formation de thylle et de cal, empêchant ainsi l'agression par des agents invasifs.

En raison de leur structure, les flavonoïdes présentent une zone d'absorption dans l'ultraviolet et leur synthèse est fortement stimulée chez certaines espèces par la lumière ultraviolette [79,80].

Ces composés s'accumulent en grandes quantités dans les tissus périphériques, ils font écran aux UV qui endommagent l'ADN [81] et protègent ainsi les tissus internes des tiges et des feuilles.



### I.2.6. Caractéristiques chromatographiques des flavonoïdes :

Des indications significatives sur la structure chimiques des flavonoïdes peuvent être fournies par les valeurs des Rf dans un système de solvant donné. La couleur de la fluorescence sous lumière ultra-violette peut également orienter quant à la structure de la famille flavonique (tableau 1).

**Tableau 1** : Fluorescence des structures flavoniques sous lumière UV[82]

Couleur des spots	Noms des flavonoïdes
Noir-violette	Flavones -5, 6,7Flavonol substitué en 3
Bleu	-Flavone ou flavonol sans OH en 5 -Flavanone avec OH en 3 ou flavanol -Flavonol avec 3-OH substitué ou sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange	Isoflavones
Jaune verte	Aurones
Verte	Chalcones
Bleu verte	Flavanone sans 5-OH

### I.3. Généralités sur Le chiendent



**Figure 10** : La plante chiendent « *Cynodon dactylon (L) Pers* »

Il existe trois espèces de chiendent :

- *Agropyrum repens*.
- *Triticum repens*.
- *Cynodon dactylon (L)Pers*

Le dernier type est l'espèce répandue dans le midi de la France, l'Italie ou l'Nord, comme elle se trouve dans tout le Sahara d'Algérie, les lits d'Oued et les cultures cosmopolites.

Il s'agit d'un sorte de gazon envahissant, considéré comme mauvaise herbe par les agriculteurs, cependant du point de vue médicinal il est plein de vertus par ses principes actifs, il doit son nom à son utilisation instinctive en tant que purgatif de la part des chiens et des chats, en outre, il est considéré comme diurétique anti-inflammatoire, décongestionnant des voies urinaires et conseillé en cas de lithiases ( rénales ou bili<aires ) grâce aux sels de potassium et à l'huile essentielle qu'il contient.

Il est d'un grand secours dans les cas de colique néphrétique surtout si on commence la cure dès les premiers symptômes de la crise.

Il est conseillées dans le traitement du Diabète et le Rhumatisme[83,84].

### **I.3.1. Classification d'espèce :**

D'après la bibliographie on note cette classification [85] :

Division : Spermatophytes

Subdivision : Angiospermes

Classe : Cotylédonées

Ordre : Glumiflores

Famille : Graminées

Gent : *Cynodon*

Espèce : *Cynodon dactylon L*

### **I.3.2. Botanique :**

Plante vivace très commune sur tous les continents, se propageant par de longs rhizomes traçants, pouvant atteindre 1,5 m de hauteur et jusqu'à 2 m.

Les rhizomes sont jaune-pâle, à saveur mucilagineuse et légèrement sucrée, ils portent des tiges fertiles et stériles. Ses feuilles sont aussi très fines, allongées, vert clair dont la gaine embrasse la tige.

L'inflorescence se fait en épi distique comprimé et dressé (15 cm de long) avec des épillets sessiles, compacts, aplatis et très fleuris. La floraison a lieu de juin à septembre.

Chaque épillet porte alors 2 glumes lancéolées, aiguës, et au-dessus, 4 à 6 fleurs vertes hermaphrodites sans calice ni corolle. Son fruit est un caryopse [84].

### **I.3.3. Composition chimique :**

D'après les études de « Miller 1958 », on constate que 100g de la plante séchée à l'abri du soleil contient [85] :

- Polysaccharides : fructanes dont inuline, triticine, fructose, manitol, inositol,
- Flavonoïdes
- Composés phénoliques : acide vanillique, acides carboxyliques phénoliques, acide silicique et silicates
- Tanins

- Mucilages
- Saponines
- Acides gras libres (acide palmitique)
- Composés phénoliques
- HE (traces) mono terpènes, sesquiterpènes
- Sels de potassium [86].

#### **I.3.4. Les usages :**

C'est une plante résistante maintient sa verdure pendant le temps chaud pour cette raison il est considéré comme un pâturage précieux et herbe de fourrage excellent, Il peut grandir dans des sols humides, supporter la sécheresse et aussi il a une tendance d'éliminer d'autres plantes.

Un pâturage pour chevaux et bétail, Il est précieux pour conservation du sol dû à ses longs coureurs qui enracinent aux nœuds. Il est difficile d'extirper et peut devenir une mauvaise herbe dans les terres cultivée. Dans certain régions l'utilisée comme pelouse et gazon, et dans les îles de Hawaii il est considéré comme un excellent gazon [84].

#### **I.3.5. Le mode de multiplication :**

Il existe deux types de multiplication :

- a- par graines.
- b- 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 graine 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 plants qui se multiplie par les graines plus le bourgeonnement des tiges. [87]

#### **I.3.6. Intérêts thérapeutiques de chiendent :**

La plante est traditionnellement utilisée comme un agent pour contrôler le diabète en inde. L'extrait de feuilles de cette plante a été signalé comme anti diabétique, l'efficacité

antioxydant et hypolipémies. La guérison des blessures mineures et antioxydant hépatique[86].

### I.3.7. Le choix de la période de récolte de la plante :

D'après une étude effectuée en collaboration avec d'autres chercheurs concernons la meilleur période pour effectuer une extraction des flavonoïdes, Compte tenu du climat de Ouargla comme le montre le tableau (2) qui présente les données climatiques de la région d'Ouargla pour la période 2006 / 2015.

**Tableau 2 :** Données climatiques de la région d'Ouargla

<i>Paramètres Mois</i>	<i>Temp Min(C°)</i>	<i>Temp Max(C°)</i>	<i>Temp Moy(C°)</i>	<i>Précip (mm)</i>	<i>Hum (%)</i>	<i>Insol (Heure/mois)</i>	<i>Evapo (mm)</i>	<i>V du vent (M/s)</i>
<i>Janvier</i>	6,36	<b>19,95</b>	13,16	<b>9,42</b>	58,77	244,77	90,70	5,79
<i>Février</i>	6,25	21,48	13,87	3,16	52,50	241,84	129,15	5,34
<i>Mars</i>	10,00	26,46	18,23	2,93	46,11	259,09	204,51	5,87
<i>Avril</i>	14,48	31,11	22,80	1,78	38,95	280,90	254,53	<b>7,08</b>
<i>Mai</i>	19,51	36,11	27,81	1,61	34,18	301,03	327,61	6,62
<i>Juin</i>	24,24	41,05	32,65	0,79	26,24	253,20	399,75	5,24
<i>Juillet</i>	<b>27,61</b>	<b>44,10</b>	<b>35,86</b>	<b>0,35</b>	29,94	327,18	<b>464,44</b>	6,41
<i>Août</i>	27,25	43,32	35,29	0,56	<b>29,35</b>	<b>330,68</b>	414,58	5,81
<i>Septembre</i>	23,03	38,79	30,91	3,73	37,89	269,05	299,57	5,41
<i>Octobre</i>	16,96	32,74	24,85	4,14	44,27	265,28	230,60	4,89
<i>Novembre</i>	9,79	25,19	17,49	1,16	53,52	249,68	124,89	4,59
<i>Décembre</i>	<b>5,50</b>	20,02	<b>12,76</b>	3,78	<b>59,78</b>	<b>223,28</b>	<b>88,80</b>	<b>4,34</b>
<b>Moyenne</b>	<b>15,915</b>	<b>31,693</b>	<b>23,804</b>	<b>2,784</b>	<b>42,625</b>	<b>270,498</b>	<b>252,428</b>	<b>5,616</b>

Source : pris de O.N.M. Ouargla

### I.3.7.1. Dosage des composées flavoniques :

Il est préférable de commencer par le calcul de la teneur d'anthocyane car ce dernier se dégrade rapidement à cause de la lumière par rapport aux aglycones.

#### I.3.7.1.1. Dosage des Anthocyanes :

La teneur en anthocyane est donnée par la formule suivante [88]:

$$T \text{ (mg/g)} = \eta \text{ (D.O/ } \epsilon \text{ )} * M * V * (d/P)$$

$\eta$  = facteur correctif tenant compte du rendement de transformation des proanthocyanes en anthocyanes équivalents.

**DO** : densité optique à la longueur d'onde maximale comprise entre 515 et 540 nm dans la phase aqueuse

$\epsilon$  = 34700 coefficient d'absorption molaire de la cyanidine

**M** = 306 : masse molaire de la procyanidine.

**V** : volume de la phase aqueuse mesuré après l'hydrolyse.

**d** : facteur de dilution ici égale à 1.

**P** = 1g poids sec de matière végétale.

#### I.3.7.1.2. Dosage des aglycones :

La teneur en aglycones flavoniques exprimée en quercétine (flavonol) est calculée par la formule suivant [89] :

$$T \text{ ( \% ou mg/g)} = (\Delta \text{(D.O)}/\epsilon) * M * (V/P) * d$$

$\Delta \text{(D.O)}$  : densité optique du pic différentiel { $D.O_{Al^{3+}} - D.O_{EtOH}$ }

- $D.O_{Al^{3+}}$  densité optique des aglycones dans la solution  $AlCl_3$  1% dans EtOH
- $D.O_{EtOH}$  densité optique des aglycones dans une solution éthanolique.

$\epsilon$  : coefficient d'absorption molaire de la quercétine égal à 23.000 au pic différentiel.

**M** = 302 g/mol masse molaire de la quercétine.

**V** : volume de la phase éthanolique des aglycones.

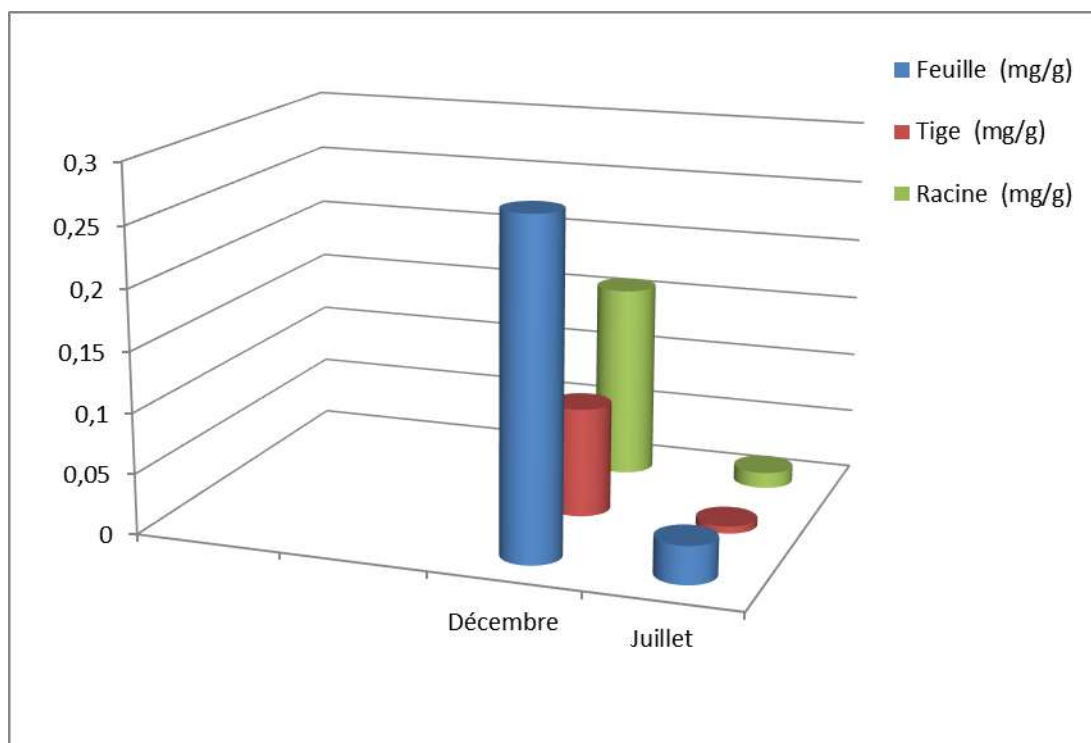
**d** : facteur de dilution égale 6.

P = 1g poids sec de la matière végétale hydrolysée.

### I.3.7.2. La teneur en aglycones :

**Tableau 3** : Teneur de la plante chiendent en aglycones

<i>L'ORGANE</i>	<i>Feuille</i> <i>(mg/g)</i>	<i>Tige</i> <i>(mg/g)</i>	<i>Racine</i> <i>(mg/g)</i>
<i>LA PERIODE</i>			
<i>Décembre</i>	0,274	0,09	0,16
<i>Juillet</i>	0,031	0,006	0,013
<i>La moyenne</i>	0,153	0,048	0,087
<i>L'écart type</i>	± 0,12	± 0,042	± 0,074
<i>Coefficient de variable</i>	78 %	87 %	85 %

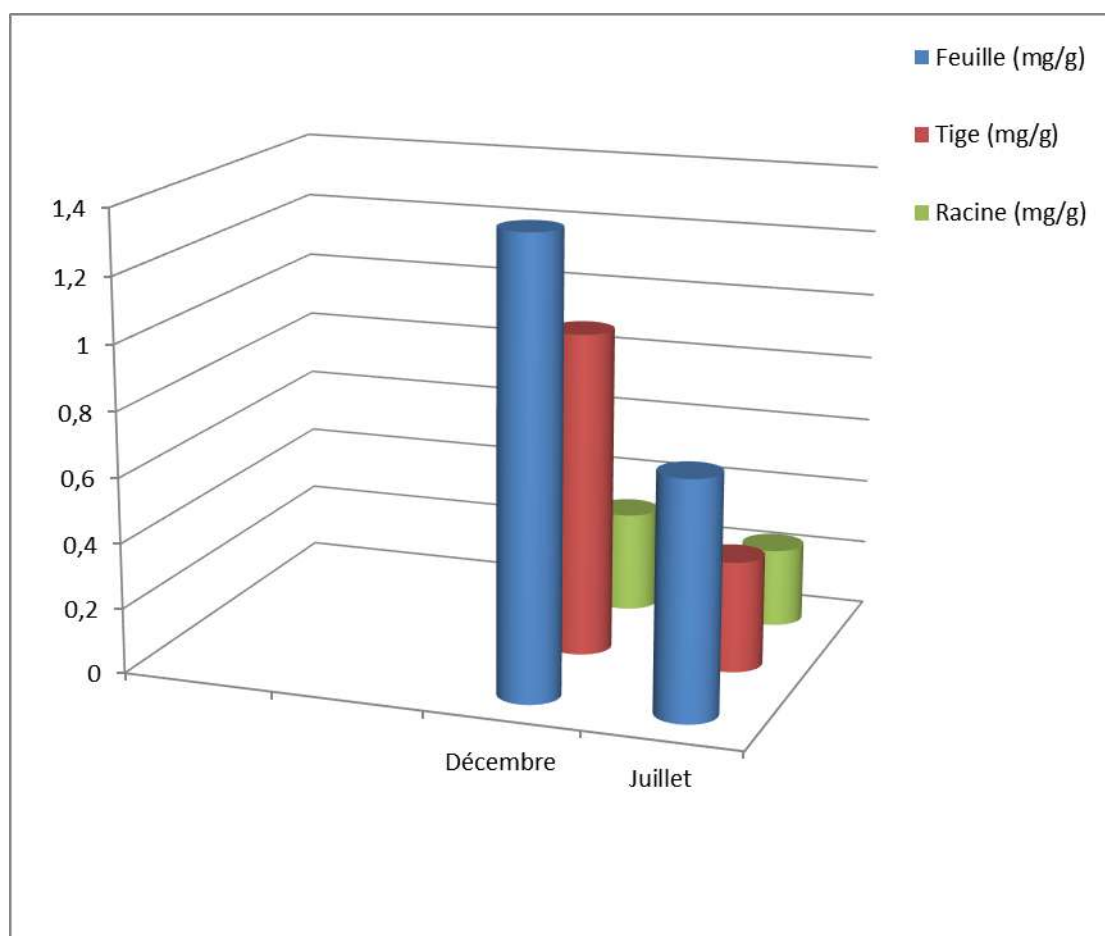


**Figure 11** : La teneur des aglycones en mois décembre et juillet

### I.3.7.3. La teneur en anthocyanes :

**Tableau 4 :** Teneur de la plante chiendent anthocyanes

<i>LA PERIODE</i>	<i>L'ORGANE</i>	<i>Feuille</i> (mg/g)	<i>Tige</i> (mg/g)	<i>Racine</i> (mg/g)
		<i>HCl 2N</i>	<i>HCl 2N</i>	<i>HCl 2N</i>
<i>Décembre</i>		1,381	0,99	0,307
<i>Juillet</i>		0,72	0,34	0,24
<i>La moyenne</i>		1,05	0,67	0,27
<i>L'écart type</i>		± 0,33	± 0,33	± 0,034
<i>Coefficient de variable</i>		31 %	49 %	12 %



**Figure 12 :** La teneur des anthocyanes en mois décembre et juillet



On a constaté d'après ces résultats que le taux des flavonoïdes au mois de décembre est supérieur à celui de mois de juillet. Pour cela nous avons choisi le mois de décembre pour effectuer l'extraction des composés flavoniques et pour faire toutes nos études concernant l'identification structurale et les études biologiques.

***Chapitre-II :***

***Matériels et Méthodes***

## **II.1. Matérielles :**

Nous avons procédé la récolte de la plante le 20/12/2012 dans une exploitation de la région d'Ouargla situé à trois kilomètres Nord-Est de la ville d'Ouargla, s'étend sur une superficie de 360 m<sup>2</sup>.

### **II.1.1. Le séchage :**

La plante est séchée dans une étuve, dans une température de 80°C (car les flavonoïdes ne se dégradent pas à cette température) pendant 03 jours avec un brassage pour avoir un séchage homogène, après le séchage de différentes parties de la plante puis broyée à l'aide d'un broyeur électrique, la poudre est entreposée à l'abri de la lumière dans des récipients en verre fumé propre et sec, fermé par des couvercles hermétiques suivant la méthode de M.PENELOPE Ody1995 [90].

### **II.1.2. Extraction des aglycones et des anthocyanes :**

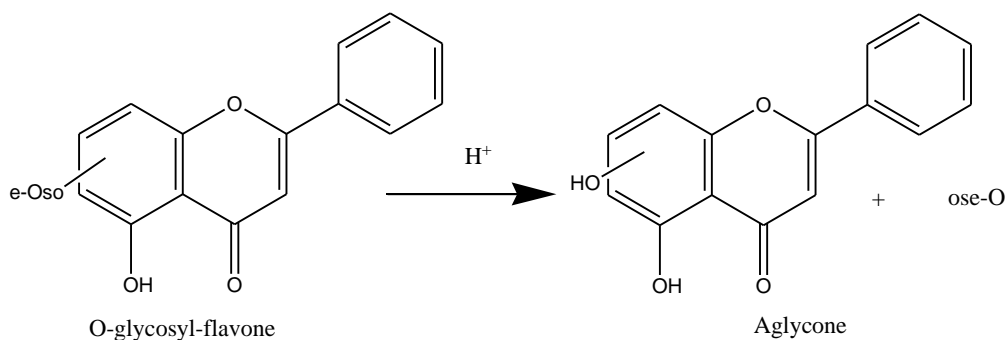
La méthode d'extraction d'après (TERRAK et col 1987 et OUAFI et DINARE pris de LEBRETON et col 1967) se base sur l'hydrolyse acide des hétérosides de la matière végétale, elle permet d'extraire, d'identifier et de séparer les aglycones et anthocyanes.

Après la récolte et le séchage de la plante et une fois la réduire en poudre sèche, 1g de cette dernière subit séparément une hydrolyse dans 80 ml d'HCl 2N au bain-marie bouillant pendant 40 min avec insufflation d'air toutes les 10 min, l'oxygène permet l'oxydation des proanthocyanes en anthocyanes correspondants, après refroidissement, le mélange est filtré pour éliminer toutes les traces de la poudre végétale, puis extraire les aglycones flavoniques trois fois par l'éther éthylique, évaporé à l'air libre l'éther puis repris le résidu par 5-10 ml d'éthanol.

Pour extraire les anthocyanes et les C-glycosides de la phase aqueuse on a utilisé le n-butanol, après on évapore le butanol avec rota vapeur et on repris l'extrait sec dans 5-10 ml de méthanol [91].

#### **II.1.2.1. Les Aglycones :**

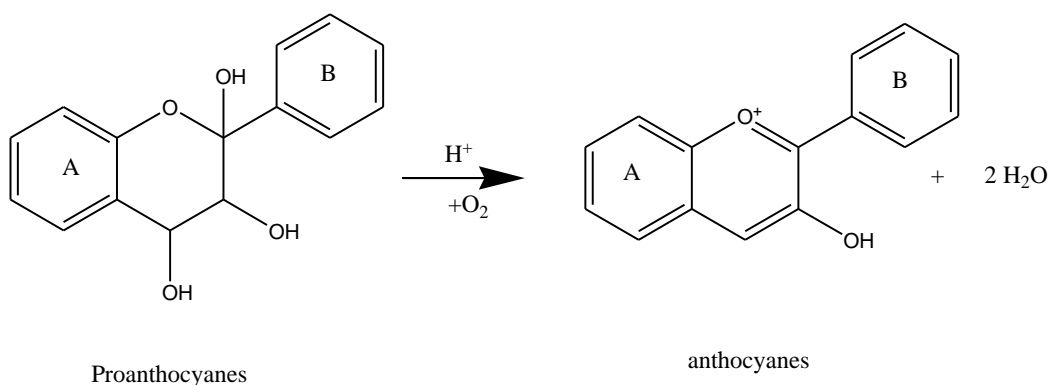
Sont obtenus lors de l'hydrolyse acide de la matière végétale par rupture des liaisons osidiques des composés hétérosidiques natives selon la figure n° 9 [92].



**Figure 13 :** Rupture des liaisons osidique des composées hétérosidique

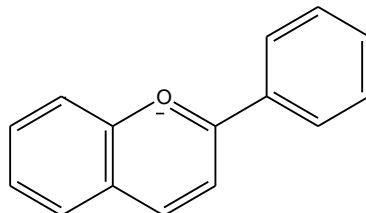
### II.1.2.2. Les Anthocyanes :

Se sont le résultat de l'oxydation des proanthocyanes correspondant selon la figure n° 10 :



**Figure 14 :** L'oxydation des proanthocyanes

Ils sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange, la structure de base des anthocyanes est la flavylum (2-phenyl-1-benzopyrylium) .



**Figure 15 :** Le cation flavylum

Leur présence dans les plantes est détectable à l'œil nu, les anthocyanes sont glycosylés le plus souvent en position 3 et 5, les sucres les plus fréquents étant des mono-

saccharides ( glucose, galactose, rhamnose et arabinose ), les di et tri-saccharides forment par combinaison des mono-saccharides précédents .

L'anthocyane est caractérisée par deux bandes d'absorption, dont une bande intense dans le domaine du visible. On trouve les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines [92].

### **\* Effet du pH sur les anthocyanes :**

Le pH est le premier facteur influant sur la couleur des anthocyanes particulièrement sur la structure de ces composées, en outre la couleur d'une solution aqueuse d'anthocyane montre la coloration rouge à pH très acide, cette couleur disparaît avec l'augmentation de pH, la solution neutre des anthocyanes à une couleur bleue qui décolore rapidement, ce changement de couleur est dû à des équilibres chimiques entre les différentes formes que peut prendre l'anthocyane. [93]

## **II.2. Les techniques de séparation et d'identification :**

### **II.2.1. Séparation des aglycones et des anthocyanes existants dans chaque organe de la plante sur les plaques préparatives :**

Ne donne pas une identification structurale mais elle nous donne une aide sur la composition flavonique des extraits comme la classe chimique et le nombre des composées existent.

#### **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.

### II.2.1.1. Les conditions de séparation:

Pour la séparation avec chromatographie préparative on a procédé à une séparation mono-dimensionnelle dans une cuve à chromatographie avec gel de silice (phase stationnaire  $\phi_s$ ) et plusieurs types de solvants (phase mobile  $\phi_m$ ) sont :

- Le supports sont les plaque commerciales de gel de silice 60 de dimension 10\*10 cm avec un épaisseur de 0.375 mm
- Le solvant d'élution pour les aglycones est le mélange  $C_2H_4Cl_2/EtOH$  (80/20).
- Le solvant d'élution pour les anthocyanes est la phase mobile  $EtOAc/MeOH/ H_2O$  (10/2/0,5)[ 94].

### II.2.2. Séparations et identification des aglycones et des anthocyanes existants dans chaque organe de la plante par chromatographie liquide à haut performance (CLHP) :

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est la technique la plus performante et la plus utilisée pour la séparation et le dosage des composés phénoliques comme un témoin, les excellentes séparations déjà obtenues il y a plus de quarant ans. Elle ne demande qu'une faible quantité d'échantillon végétale[38, 95].

Les séparations sont basées sur les polarités respectives des phases stationnaires utilisées du solvant d'élution et des composés phénoliques concernés.

Il est considéré comme l'un des outils puissants de la chimie analytique. L' HPLC est un type de chromatographie sur colonne dans lequel le solvant contenant le mélange d'échantillon est passé à travers une colonne contenant un matériau adsorbant, en utilisant une pompe à pression. Le composant de l'échantillon réagit différemment avec le matériau adsorbant, conduisant à différents débits de différents composants séparés ainsi les mélanges. Compte tenu de la haute résolution de cette technique de séparation, nous pouvons aujourd'hui identifier plusieurs produits inconnus par une simple comparaison des temps de rétention avec celle des témoins, où la séparation est effectuée par la distribution dynamique de chaque produit entre deux phases (développé par WAGNER et al en 1985)comme on peut analyser pas mal de produits non volatile tell que les flavonoïdes[96] :

\* la phase stationnaire  $\phi_s$

\* la phase mobile  $\phi_m$

Là où le temps de rétention égale au temps écoulé entre le moment de l'injection et celui de l'apparition du sommet de pic d'élution pour un des produits injectés dans l'appareil, d'autant dire que le produit à analyser déposé au sommet de la colonne pour que la phase mobile pourra migrer les différents composés de notre produit ont analysé selon leur affinité avec les deux phases ( $\phi_s, \phi_m$ ) [97].

## II.2.2.1. Matériels et Appareillage:

### II.2.2.1.1. Constitution de dispositif:

- Dégazeur à vide de type YL9101 4 canaux, le débit maximum est de 10ml/min par canal, le volume interne par canal est de 925  $\mu$ l.
- Pompe quaternaire YL9110 à double piston avec possibilité d'utiliser 4 solvants.
- Compartiment à colonne YL9131 dans une plage de température allant de 4°C jusqu'à 90°C
- Détecteur UV/Visible de type YL9120 à double longueur d'onde (de 190 à 900 nm).

### II.2.2.1.2. Les extraits à analysé :

a- Extrait éthanolique des aglycones.

b-Extrait méthanolique des anthocyanes.

### II.2.2.1.3. Les conditions d'analyse [97]

- Colonne type C18.
- Diamètre des particules de 5  $\mu$ m.
- Diamètre de la colonne (250mm x 4.6mm)
- Injection : 20  $\mu$ l.
- Mode gradient d'élution
- Longueur d'onde de détection : 340 nm.
- Phase mobile et un mélange d'acide trifluoroacétique (TFA) (0.5%) et de l'acétonitrile (AcN) selon le tableau n°5 suivant :

**Tableau 5 :** La phase mobile utilisé dans la chromatographie liquide à haute performance

TFA	AcN	Temps (min)
3%	97%	10
40%	60%	25

Le tableau N°5 rassemble les valeurs du temps de rétention (**tr**) de dix étalons séparés sur l'HPLC selon les conditions précédente:

**Tableau 6 :** Temps de rétention de quelques étalons aglyconiques. [83]

Etalon	Temps de rétention des étalons (min)
<b>E<sub>1</sub></b> :Hesperetin.	7,412
<b>E<sub>2</sub></b> :Isorhamnetin.	11,405
<b>E<sub>3</sub></b> :Butein.	1,795
<b>E<sub>4</sub></b> :Rhamnetin.	1,822
<b>E<sub>5</sub></b> :Fisetin.	4,359
<b>E<sub>6</sub></b> :Hesperidin.	2,851
<b>E<sub>7</sub></b> : Luteolin.	7,556

### II.2.3. Séparation des extraits aglyconiques et anthocyaniques de la plante par des plaques préparatives :

On va faire une séparations pour les extraits qui contient les trois parties de plante (feuilles, tiges et racines).

La séparation a été faite avec des plaques préparatifs de gel de silice et comme phase mobile on a utilisé les systèmes suivants :



- Pour les aglycones est  $C_2H_4Cl_2/EtOH$  (80/20).
- Pour les anthocyanes est  $EtOAc/MeOH/H_2O$  (10/3/1).

La composition des fractions sont détectées par des CCM analytique et analysé par chromatographie liquide haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (*LC MS/MS*) :

#### **II.2.4. Identification de la structure des composés fractionnés des deux extraits aglyconiques et anthocyaniques avec chromatographie liquide haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (*LC MS/MS*) :**

La spectrométrie de masse permet d'apporter la preuve de l'identité des composés phénoliques préalablement séparés par HPLC ou EC en apportant, grâce à la fragmentation de la molécule, des informations sur sa masse moléculaire et sur les principaux groupements chimiques présents ont permis d'analyser les flavonoïdes.

##### **II.2.4.1. Appareillage :**

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

\*un système de chromatographie liquide 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 grand 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 haut productivité, cette technologie de pointe intègre la technique d'ionisation orthogonale, un concept de quadripôle hyperbolique, une cellule de collision hexa polaire à haute pression avec accélération linéaire, et un détecteur de dynode à haute énergie, excentré.

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

### II.2.4.2. Caractéristiques technique 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 100µL.
- 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.

### II.2.4.3. Les condition d'analyse :

Il existe plusieurs type 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 Bombardement). Dans cette technique l'ion moléculaire n'est 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 [98] :

A : eau

B : Méthanol

C : Acétonitrile

chaque phase mobile contienne 0,2 % de trifluoroacétique

Le gradient utilisé est présenté dans le tableau n° 7 suivant :

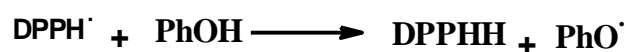
**Tableau 7 :** Le gradient de la phase mobile utilisé dans la chromatographie liquide à haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (LC MS/MS) :

Le gradient	Le temps
90% A + 6% B + 4% C	5 min
85% A + 9% B + 6% C	5 min
71% A + 17,4% B + 11,6% C	30 min
0% A + 85% B + 15% C	60 min
La vitesse d'écoulement : 01 ml/min, T = 200 °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. Etude de l'activité antioxydante des anthocyanes et des aglycones :

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 transforme en une molécule stable DPPHH.[47,99]



### III.3.1. Mode opératoire :

Une gamme de concentrations (0-200 µg/ml) d'extrait de plantes ou de la Quercétine (antioxydant de référence) est préparée dans le méthanol. Un volume de 2,5 ml de cette solution, est mélangé à 2,5 ml 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 [100] :

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

I% : pourcentage d'inhibition du radical

DO : densité optique.

La CI<sub>50</sub> 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.4. Etude de l'activité antibactérienne des anthocyanes et des aglycones :

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris, agents antibactériens. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections (CCE, 2001).

Le mode d'action de ces agents sur les bactéries, peuvent être: Bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries ou bactéricides: lorsque la substance détruit totalement les bactéries[101].

### II.4.1. Souches bactérienne utilisées:

**Tableau 8** : Caractéristiques des bactéries utilisées [49] :

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>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 25923		Gram +
<i>Klebsiellapneumoniae</i> : ATCC 700603		Gram -
<i>Salmonella Typhi</i> : ATCC 35664		Gram -

ATCC : American type culture collection

### II.4.2. 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, ce dernier est ensuite placé sur de la gélose non inhibitrice (gélose Mueller Hinton et gélose au sang) coulée dans des boites 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<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> C.F.U/ml. Les boites sont incubées à une température de 37°C pendant 18 à 24 heures[102].

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 9 :** 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 [103].

Les bactéries	Valeurs critiques des diamètres d'inhibition (mm)		
	Résistant	Intermédiaire	Sensible
<i>Escherichia coli</i> : ATCC 25922	≤12	13 -14	≥15
<i>Klebsiellapneumoniae</i> : ATCC 700603	≤12	13 -15	≥16
<i>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 25923	≤10	11 -15	≥16
<i>Salmonella Typhi</i> : ATCC 35664	≤16	16-20	≥21



***Chapitre III :***  
***Résultats et discussions***

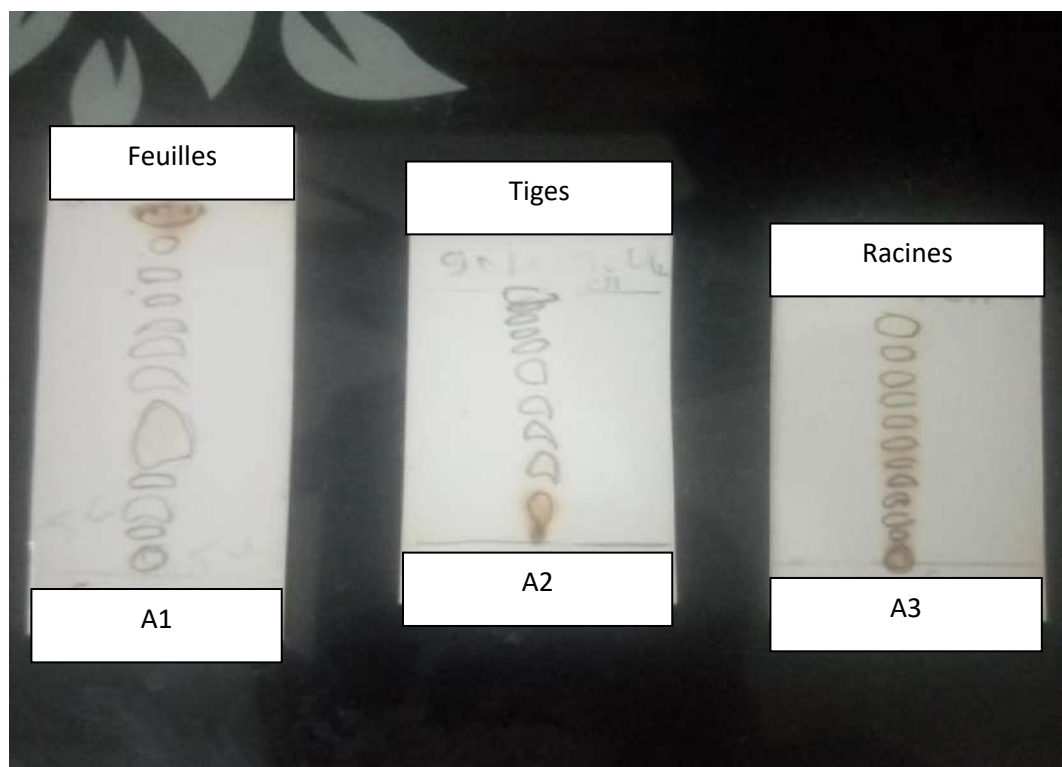


### III.1. Résultats de l'étude chromatographique :

#### III.1.1. Résultats de chromatographie sur couche mince des extraits aglyconiques et anthocyaniques des trois parties de la plante :

##### 1/ Pour les aglycones :

Les résultats sont regroupés dans le tableau n°8



**Figure 16 :** Les plaques CCM des extraits aglyconiques des trois parties de la plante chiendent « *Cynodon dactylon (L) Pers* »

**Tableau 10** :  $R_f$  des composés existants dans les extraits aglyconiques des trois parties de la plante.

<i>C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH (80/20)</i>			
<i>Couleur</i>	<i>R<sub>f</sub> feuille</i>	<i>R<sub>f</sub> Tige</i>	<i>R<sub>f</sub> racine</i>
<b>Bleu</b>	0,92	0,93	0,91
<b>Pourpre</b>	0,89	-	0,87
<b>Jaune</b>	0,84	-	0,82
<b>Bleu V</b>	0,77	0,80	-
<b>Jaune</b>	0,72	0,68	0,70
<b>J-vert</b>	0,60	0,57	0,63
<b>Orange</b>	0,57	0,47	0,68
<b>Pourpre</b>	-	0,40	0,45
<b>Jaune</b>	0,40	0,29	-
<b>Bleu-C</b>	0,21	0,19	0,35
<b>Pourpre-</b>	0,16	-	0,10
<b>J-vert</b>	0,08	-	0,07
<b>Marron</b>	0,00	0,00	0,00

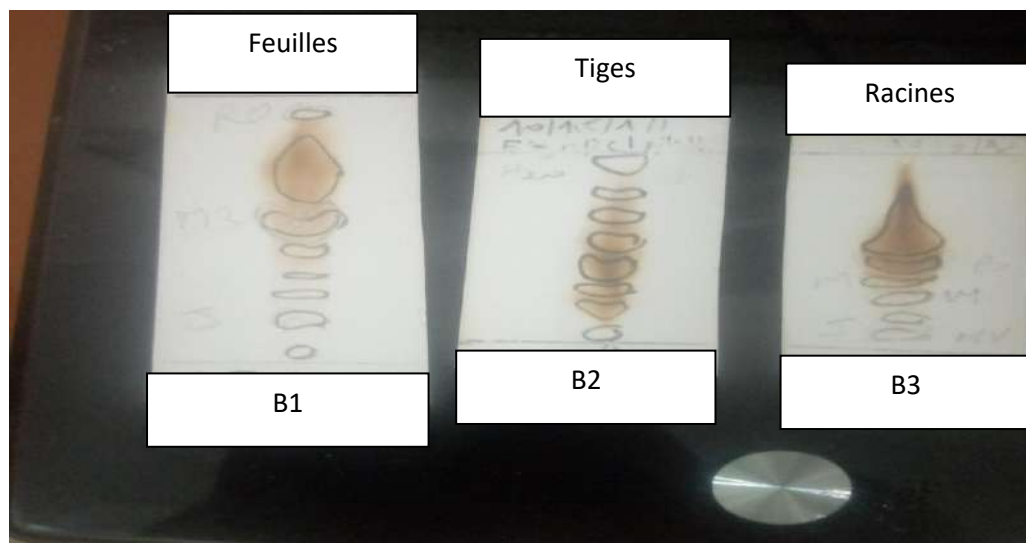
D'après les résultats existants dans le tableau n°8 on remarque qu'il y a au minimum :

- 12 produits dans les feuilles.
- 09 dans les tiges.
- 11 dans les racine.

D'après ces résultats on constate que la partie la plus riche en aglycones est les feuilles.

## 2/ Pour les anthocyanes :

Les résultats sont regroupé dans le tableau n°9



**Figure 17 :** Les plaques CCM des extraits anthocyaniques des trois parties de la plante chiendent« *Cynodon dactylon (L) Pers* »

**Tableau 11 :**  $R_f$  des composés existants dans les extraits anthocyaniques des trois parties de la plante.

<i>EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (10/2/0,5)</i>			
<i>Couleur</i>	<i>R<sub>f</sub> feuille</i>	<i>R<sub>f</sub> tige</i>	<i>R<sub>f</sub> racine</i>
<i>Rouge</i>	0,89	0,87	-
<i>Pourpre</i>	0,83	0,73	0,77
<i>Orange</i>	-	0,56	-
<i>Jaune</i>	0,46	0,42	0,45
<i>Bleu</i>	0,36	0,39	0,40
<i>Jaune</i>	0,32	0,30	0,32
<i>J- Clair</i>	0,23	0,21	-
<i>Pourpre</i>	0,11	-	0,08
<i>Marone</i>	0,00	0,000	0,00

D'après les résultats obtenus dans le tableau n°9 on remarque qu'il y a au moins :

- 8 produits dans les feuilles.
- 8 produits dans les tiges.
- 6 produits dans les racines.

Alors on constate que les feuilles sont la partie la plus riche en anthocyanes.

**III.1.2. Résultats de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des composés existants dans les extraits aglyconiques et anthocyaniques des trois parties de la plante :**

**1/ Pour l'extrait des aglycones**

**Tableau 12:** Temps de rétention et les concentrations des composés

existants dans les extrais aglyconiques des trois parties de la plante.

<i>Organes</i> <i>Comps</i>	<i>Feuilles</i>		<i>Tiges</i>		<i>Racines</i>	
	<i>Tr(min)</i>	<i>Tr(Et)</i>	<i>Tr(min)</i>	<i>Tr(Et)</i>	<i>Tr(min)</i>	<i>Tr(Et)</i>
<b>1</b>	0,641		2,500		2,512	
<b>2</b>	1,561	<b>E<sub>3</sub></b>	3,314		3,391	
<b>3</b>	2,280		3,923		4,690	<b>E<sub>5</sub></b>
<b>4</b>	3,198		4,666	<b>E<sub>5</sub></b>	5,127	
<b>5</b>	3,666		5,071		6,027	
<b>6</b>	4,453	<b>E<sub>5</sub></b>	6,971		6,981	
<b>7</b>	4,939		8,135		8,217	
<b>8</b>	6,731		9,167		9,176	
<b>9</b>	7,172		9,720		9,732	
<b>10</b>	7,757	<b>E<sub>7</sub></b>	11,656	<b>E<sub>2</sub></b>	-	
<b>11</b>	8,933		15,031		-	
<b>12</b>	9,492		-		-	
<b>13</b>	11,384	<b>E<sub>2</sub></b>	-		-	
<b>14</b>	13,073		-		-	
<b>15</b>	14,510		-		-	

**Tr :** le temps de rétention.

**Et :** étalon.

D'après le tableau N°10 obtenu des chromatogrammes HPLC (voir Annexe) des extraits aglyconiques de trois parties de la plante on remarque que la partie la plus riche en produit est les feuilles.

Et d'après la comparaison des temps de rétention des étalons (tableau N°5) avec ceux des composés existants dans les extraits aglyconique (tableau N°10), on remarque la possibilité de l'existence d'un produit E<sub>5</sub>(Fisetin) dans les trois parties de la plante, E<sub>2</sub>(Isorhamnetin) dans les feuilles et les tiges et E<sub>3</sub>(Butein) et E<sub>7</sub>(Luteolin) seulement dans les feuilles.

## 2/ Pour l'extrait des anthocyanes :

**Tableau 13** : Temps de rétention et les concentrations des composés existants dans les extrais anthocyanique des trois parties de la plante.

<i>Organes</i>	<i>Feuilles</i>	<i>Tiges</i>	<i>Racines</i>
<i>Comps</i>	<i>Tr(min)</i>	<i>Tr(min)</i>	<i>Tr(min)</i>
<b>1</b>	2,537	2,435	2,446
<b>2</b>	3,219	3,159	3,158
<b>3</b>	3,811	3,940	4,489
<b>4</b>	4,825	5,073	5,803
<b>5</b>	6,554	6,567	8,142
<b>6</b>	7,125	8,123	9,073
<b>7</b>	8,800	9,605	9,681
<b>8</b>	9,606	12,055	-
<b>9</b>	-	12,958	-
<b>10</b>	-	16,687	-
<b>11</b>	-	20,790	-

**Tr** : le temps de rétention.

**Et** : étalon.

Le tableau N°11 qui représente les temps de rétention et les concentrations des composés existants dans les extraits anthocyaniques des trois parties de la plante obtenu de chromatogramme HPLC des anthocyanes (voir Annexe) montre que le nombre des produits dans les racines est le plus grand par rapport aux autre partie de la plante , à cause du manque des étalons pour les anthocyanes on n'a pas pu identifier la composition chimique de l'extrait des anthocyanes.

### III.1.3. Résultats de séparation des extraits aglyconiques et anthocyaniques de la plante avec plaques préparatives :

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux (12 et 13) suivants :

#### 1/ Pour les aglycones :



Figure 18 : La plaque CCM de l'extrait aglyconique sous la lampe U.V

Tableau 14 :  $R_f$  et couleur des composés existants dans l'extrait aglyconique séparés sur plaque de gel de silice

Le composé	La couleur	$R_f$
a <sub>1</sub>	Bleu	0.6
a <sub>2</sub>	Bleu vert	0.5
a <sub>3</sub>	Jaune vert	0.3



## 2/ Pour les anthocyanes :



**Figure 19 :** La plaque CCM de l'extrait anthocyanique sous la lampe U.V

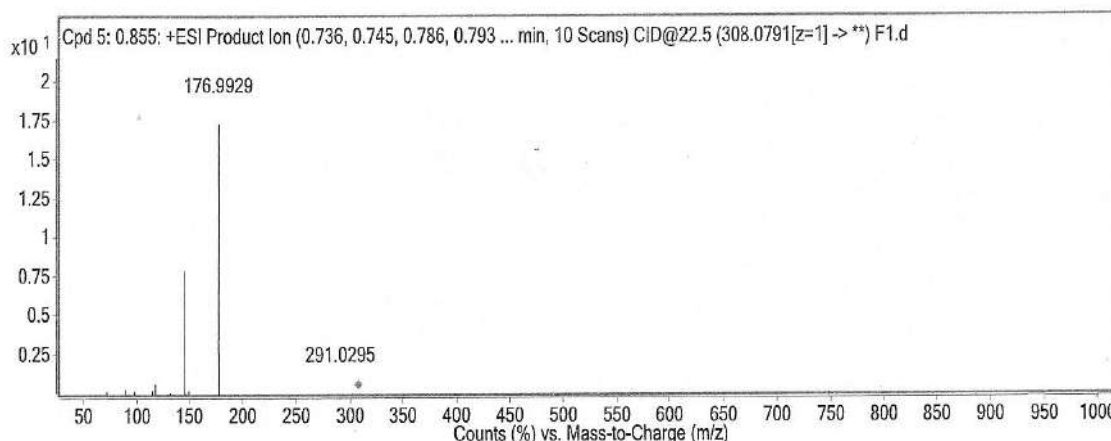
**Tableau 15 :** Rf et couleur des composés existants dans l'extrait anthocyanique séparés sur la plaque de gel de silice

Le composé	La couleur	Rf
b <sub>1</sub>	Bleu	0.6
b <sub>2</sub>	Orange	0.4
b <sub>3</sub>	Jaune	0.3
b <sub>4</sub>	Jaune – Braine	0.03

Les chromatogrammes obtenus par la CCM présentent une bonne migration par conséquent une bonne séparation qui permet l'analyse qualitative des composés étudiés.

### III.1.4. Résultats de la chromatographie liquide haute performance couplé avec la spectroscopie de masse (LC MS/MS) :

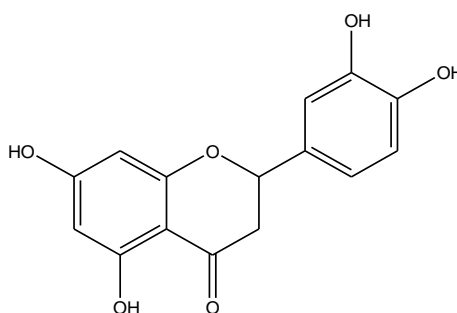
#### III.1.4.1. La structure de composé a<sub>2</sub> de l'extrait aglyconique :



**Figure 20** : Spectre des ions de produit a<sub>2</sub> de l'extrait aglyconique en mode négatif (M-H)<sup>-</sup>

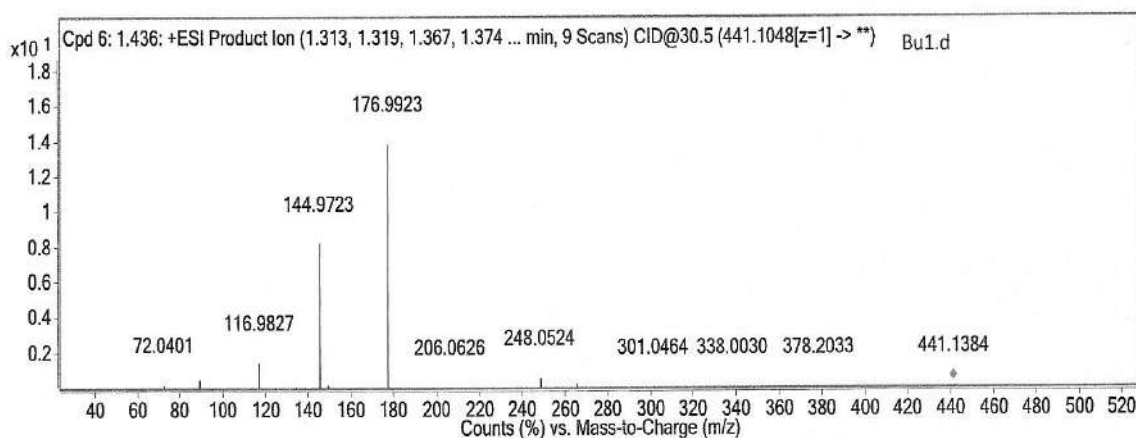
La couleur bleu vert de la tâche du composé correspond à un flavanone, et on remarque d'après le spectre de LCMS/MS l'existence d'un pic 291.03 [M-H]<sup>-</sup> de la molécule mère. La fragmentation de composé a<sub>2</sub> de l'extrait aglyconique donne un pic m/z 176.99 correspond à C<sub>9</sub>O<sub>4</sub>H<sub>5</sub> (177), m/z 149 correspond à l'ion [<sup>1,3</sup>A<sup>-</sup>2H] et un pic m/z 121 attribué à l'ion [<sup>1,3</sup>A<sup>-</sup>CO] plus que le pic m/z 135 correspond à l'ion <sup>1,3</sup>B<sup>+</sup> et le pic m/z 117 attribué à l'ion [<sup>1,3</sup>B<sup>+</sup>-H<sub>2</sub>O][93,106,107] (voir l'annexe). D'après ces résultats on constate que la structure de composé a<sub>2</sub> est 5,7,3',4'- tétra hydroxy flavanone.

Alors la structure proposée pour le composé a<sub>2</sub> est :



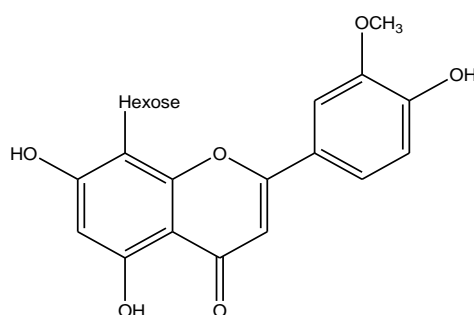
**Figure 21** : 5,7,3',4'- tétra hydroxy flavanone

### III.1.4.2. La structure de produits b<sub>2</sub> de l'extrait anthocyanique :



**Figure 22 :** Spectre des ions de produit b<sub>2</sub> de l'extrait anthocyanique on mode négatif (M-H)<sup>-</sup>

Le composé a une couleur orange qui correspond à un flavone, d'autre part le spectre LCMS/MS du composé b<sub>2</sub> (figure 15) confirme son identification on comparons avec les rapports m/z des fragments obtenu aux valeurs par Rosch et al[97] ou on trouve le pic de la molécule mère m/z 441.1384 [M-H]<sup>-</sup> qui correspond à un flavone glycosidé. En revanche la perte de m/z 144.9723 caractéristique d'un désoxyhexose (m/z 145). Le pic m/z 176.9923 correspond à [<sup>1,4</sup>B<sup>-</sup>+CH<sub>3</sub>] et le pic m/z 301.0464 caractéristique de la 3'méthyle de la lutéoline « Chrysoeriol ». De plus, la faible abondance de l'ion radicalaire à m/z 301.0464 suggère une glycoside à la position 8 de la Chrysoeriol[93,106,107](voir l'annexe), je propose le structure suivant pour le composé b<sub>2</sub> qui correspondrait à la Chrysoeriol-8-C-hexsosse.Donc la structure de composé b<sub>2</sub> est :



**Figure 23:** 3'-méthoxy de la lutéoline -8-C- hexsosse« Chrysoeriol -8-C- hexsosse »

### III.2. Résultats de l'étude de l'activité antioxydante des anthocyanes et des aglycones :

Le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations des extraits et de la Quercétine est :

**Tableau 16 :** Le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait aglyconique :

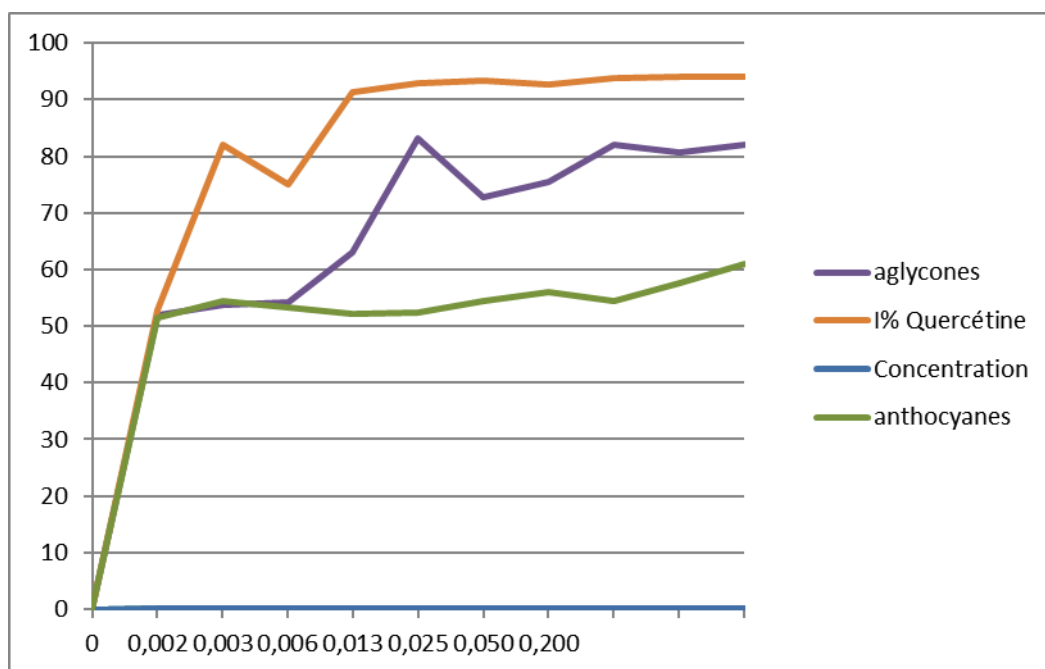
Extrait des aglycones	
Concentration (mg/ml)	I% aglycones
0	0,00
0,002	51,96
0,003	53,64
0,006	54,13
0,013	63,12
0,025	83,28
0,050	72,84
0,075	75,44
0,100	81,98
0,150	80,65
0,200	81,98

**Tableau 17 :** Le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de l'extrait anthocyanique

Extrait des anthocyanes	
Concentration	I% anthocyanes
0	0,00
0,002	51,40
0,003	54,51
0,006	53,32
0,013	52,10
0,025	52,31
0,050	54,37
0,075	56,12
0,100	54,40
0,150	57,70
0,200	61,02

**Tableau 18 :** Le pourcentage d'inhibition de DPPH en fonction des concentrations de la quercétine

Quercétine	
Concentration (mg/ml)	I% Quercétine
0	0
0,002	52,83
0,003	82,15
0,006	74,95
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



**Figure 24 :** Le pourcentage d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations des extraits des aglycones, des anthocyanes et de la Quercétine

### III.2.1. Interprétation :

La figure n° 18 indique que la concentration des extraits à I<sub>50</sub> (CI<sub>50</sub>), pour l'extrait d'Anthocyanes est CI<sub>50</sub> ≈ 0,0019 mg/ml, l'extrait d'Aglycones est CI<sub>50</sub> ≈ 0,00185 mg/ml et pour la molécule de référence( la Quercétin) le CI<sub>50</sub> ≈ 0,0018 mg/ml, alors d'après ces résultats on remarque que les deux extraits ont presque la même valeur de CI<sub>50</sub> de la Quercétin.

On constate qu'ils ont un pouvoir antioxydant très importants. Certains auteurs ont attribué la capacité des composés flavoniques à piéger les radicaux libres, à la présence de groupements OH en 3', 4' sur le noyau B et/ou un OH libre[108]

### III.3. Résultats de l'étude de l'activité anti bactérienne des anthocyanes et des aglycones :

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* (aglycone et anthocyanne).

Les résultats d'analysé sont regroupés dans le Tableau n° 17 :

**Tableau 19:** Valeurs des diamètres des zones d'inhibition(en mm) des bactéries avec les deux extraits aglyconique et anthocyanique

Les extraits Les souches	A	B	B1	B2	B3
<i>Escherichia coli</i> : ATCC 25922	-	8.57	-	4.5	-
<i>Klebsiellapneumoniae</i> : ATCC 700603	-	5.62	6.25	-	
<i>Staphylococcus aureus</i> : ATCC 25923	-	11	-	-	-
<i>Salmonella Typhi</i> : ATCC 35664	-	-	-	-	4.5

(-) : Absence de Zone d'inhibition.

B : extrait d'aglycone avec une concentration c<sub>B</sub>

B1 : extrait d'aglycone avec une concentration  $c_{B1} = c_B / 2$

B2 : extrait d'aglycone avec une concentration  $c_{B2} = c_B / 4$

B3 : extrait d'aglycone avec une concentration  $c_{B3} = c_B / 8$

A : extrait d'anthocyane avec une concentration  $c_A$

### III.3.1. Interprétation :

L'analyse des données existé dans le tableau n°17 a également montré que l'extrait des aglycones est le plus active (Figures 19,20,21,22,23,24) par rapport à l'extrait des anthocyanes qui n'a aucun activité sur tous les germes étudiée ( voir l'annexe).

En effet, *Staphylococcus aureusa* est la souche la plus sensible (11mm) à l'extrait d'aglycones. L'extrait des aglycones a une activité positive sur les autres germes t-elle que *Escherichia coli* (8.57mm et 4.5mm) *Klebsiellapneumoniae* (5.62mm et 6.25mm) et *Salmonella Typhi*(4.5mm).

On voie aussi que la diminution de la concentration de cette extrait aglyconique provoque l'apparence d'une zone d'inhibition dans le cas des deux souches bactériennes *Salmonella* et *Klebsiellapneumoniae*

Et si on compare les résultats obtenu avec le tableau n° 7 en remarque que :

Les zones d'inhibition des germes *Escherichia coli* et *Klebsiellapneumoniae* par l'extrait aglyconique sont inférieure de (12mm), dans le cas de *Staphylococcus aureusa* la zones d'inhibition est entre (10mm et 15mm) et pour le germe *Salmonella Typhi* la zone d'inhibition est inférieure de (16mm). Alors on constate que l'extrait des aglycones a une inhibition intermédiaire dans le cas de germe *Staphylococcus aureusa* et les autres germes sont considéré comme des germes résistants.

## CONCLUSION GENERALE :

Dans ce travail nous sommes intéressés à l'étude chimique des aglycones et des anthocyanes flavoniques existants dans la plante « *Cynodon dactylon (L) Pers* » et leurs activités antioxydantes et antibactériennes.

La séparation et l'identification structurale sont faites par CCM, HPLC et LCMS/MS. D'après la CCM, on a remarqué que les extraits des aglycones contiennent au moins **12** produits dans les feuilles, **09** dans les tiges et **11** dans les racines et pour les anthocyanes on a **8** produits dans les feuilles, **8** produits dans les tiges et **6** produits dans les racines.

D'après l'HPLC nous avons remarqué la possibilité d'existence des produits **E<sub>2</sub>** (**Isorhamnetin**), **E<sub>3</sub>** (**Butein**), **E<sub>5</sub>** (**Fisetin**) et **E<sub>7</sub>** (**Luteolin**) dans l'extrait des aglycones, mais pour l'extrait des anthocyanes on n'a pas pu identifier ces produits à cause de l'absence des étalons anthocyaniques.

LC MS/MS nous amène à proposer les structures des deux composés, un aglycone qui est le **5, 7, 3', 5'- tétra hydroxy flavanone** et un C glycoside qui est le **3'-méthoxy de la lutéoline -8-C- hexose**.

L'évaluation antioxydante par le test DPPH montre que les deux extraits étudiés ont une activité antioxydante remarquable presque égale à celle de l'étalon de référence « la quercétine » ou l'extrait anthocyanique présente un **CI<sub>50</sub> ≈ 0,0019 mg/ml** et l'extrait aglyconique un **CI<sub>50</sub> ≈ 0,00185 mg/ml**.

Et d'après l'étude de l'effet antibactérien des aglycones et des anthocyanes sur quelques germes on a constaté que l'extrait aglyconique a une faible activité antibactérienne contre tous les germes des références par contre l'extrait anthocyanique n'a aucun effet sur ses germes.

Comme perspectives on propose d'orienter les recherches scientifiques vers la réalisation des études approfondies et complémentaires de l'activité antioxydante et antibactérienne des composés polyphénoliques en générale et des flavonoïdes en particulier.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1/Dangles O, Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R. Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33: 5227-30.
- 2/ Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Richel TL. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46: 1887-92.
- 3/ Sarni-Manchado P, Cheynier V. *Les polyphénols en agroalimentaire*, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, 2006, 300-398.
- 4/ Bamforth CW. Perceptions of beer foam. *J. Inst. Brew.* 2000, 106: 229-38.
- 5/ Druyne T. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.* 1999, 27 (4): 445-59.
- 6/ Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W. Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J. Comp. Physiol. Sensory Neural Behav. Physiol.* 2000, 186 (6): 567-74.
- 7/ Yi-Cai FU, Xi-Peng JIN, Shao-Min WEI, Hui-Feng LIN, Sam K. Ultraviolet radiation and reactive oxygen generation as inducers of keratinocyte apoptosis : Protective role of tea polyphenols. *J. Toxicol. Environ. Health* 2000, 61 (3): 177-88.
- 8/ Sasaki K, Takahashi T. A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochem.* 2002, 61 (3): 339-43.
- 9/ Haslam E. Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.* 1994, 11: 41-66
- 10/Bruneton J. *Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales*. 4e Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, 2009, 1288.

- 11/ Heller W, Forkmann G. The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 1993, 399-425.
- 12/ Montenegro de Matta SS, Delle Monache F, Ferrari F, Marini-Bettolo GB. Alkaloids and procyanidins of an *Uncaria* sp. from Peru. *Farmaco. Sci.* 1976, 31: 5227-35.
- 13/ Dewick PM. The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 1995, 12: 579-607.
- 14/ Fleeger JL, Flipse IJ. Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 1964, 47 (5): 535-8.
- 15/ Richter G. *Métabolisme des végétaux. Physiologie et Biochimie.* Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 1993, 322-323.
- 16/ Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63 (7), 1035-42.
- 17/ Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: Evidence from animal studies. *J. Nutr.* 2003, 133: 3275-84.
- 18/ Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K. Antioxidant tannins from 108 Rosaceae plant roots. *Food Chem.* 2007, 100 (2): 579-83.
- 19/ Srivastava RC, Husain MM, Hasan SK, Athar M. Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.* 2000, 153 (12) :1-5.
- 20/ Kenny TP, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME. Immune effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Biol. Med.* 2007, 232:293-300.
- 21/ Ames BN, Gold LS, Willett WC. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92: 5258-65.
- 22/ Martin S, Andriantsitohaina R. Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 2002, 51 (6): 304-15.

- 23/ Yamanaka N, Samu O, Nagao S. Green tea catechins such as (-) epicatechin and (-) epigallocatechin accelerate Cu<sup>2+</sup> induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett.*1996, 401: 230-4.
- 24/ Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL. Cocoa inhibits platelets activation and function, *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 72:30-5.
- 25/ Gerber M, Berta-Vanrullen I. Soja et phytoestrogènes. *Arch. Pédiatrie* 2006, 13 (6): 534536.
- 26/ Lainé E, Hano C, Lamblin F. Les lignanes phyto-œstrogènes du lin sont ils des bienfaiteurs méconnus ? *Phytothér.*2007, 5: 121-8.
- 27/ Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol.Immunol.* 2004, 48 (4): 251-61.
- 28/ Ruggiero P, Tombola F, Rossi G, Pancotto L, Lauretti L, Del Giudice G, Zoratti M. Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. *Antimicrob.Agents Chemother.* 2006, 50 (7): 2550-52.
- 29/Harbone, J.B. *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Technique of Plant Analysis.* 3rd Edition, Chapman and Hill, London. 1989, 285.
- 30/Macheix JJ, Fleuriet A, Jay-Allemand C. Les composés phénoliques des végétaux - Unexemple de métabolites secondaires d'importance économique.Lausanne, Presses polytechniques et Universitaires Romandes. ISBN . 2005, 2880746256.
- 31/Grisebach H. Biosynthesis of anthocyanidins.In Markakis P. *Anthocyanidins as food colours.* Ed. Academic Press, New York, USA. 1982: 69-92.
- 32/Wilson A. Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandracoridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol.* 1987, 13 (3): 473-493.
- 33/Hashimoto F, Jamal Uddin AFM, Shimizu K, Sakaba Y. Multiple allelism in flavonoid hydroxylation in *Eustomagrandidiflorum* (Raf.) Shinn.*Flowers. J. Japan Soc. Hort. Sci.* 2004, 73 (3): 235-240.

- 34/Ono E, Hatayama M, Isono Y, Sato T, Watanabe R, Yonekura-Sakakibara K, FukuchiMizutani M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T, Nakayama T. Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* 2006, 45: 133-43.
- 35/Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J. Nutr.* 2006, 136 (10): 2481-5.
- 36/ Morreel K, Goeminne G, Storme V, Sterck L, Ralph J, Coppieters W, Breyne P, Steenackers M, Georges M, Messens E, Boerjan W. Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *Plant J.* 2006, 47: 224-37.
- 37/ Bruneton J. Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 1999, 369-404.
- 38/Wulf L.W. & C.W. Nagel. High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am. J. Enol. Vitic.* 1978, 29, 42-49.
- 39/ Galvez J, Crespo J, Jimenez J, Suarez A, Zarzuelo A. Antidiarrhoeic activity of quercetin in mice and rats. *J. Pharmacol.* 1993 a, 45: 157-9.
- 40/ Galvez J, Zarzuelo A, Crespo J, Lorente MD, Acete MA, Jimenez J. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.* 1993 b, 59: 333-6.
- 41/ Basile A, Giordano S, Lopez Saez JA, Cobianchi BC. Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochem.* 1999, 2 (8): 1419-82.
- 42/ Cushnie TP, Hamilthoh VES, Lamb AJ. Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoïds and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* 2003, 158(4): 281-9.
- 43/ Martini A, Katerere DR, Eloff JN. Seven flavonoïds with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 93 (2-3): 207-12.
- 44/ Goodarzi MT, Zal F, Malakooti M, Safari MR, Sadeghian S. Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran.* 2006, 44(1): 41-5.

- 45/ Ouali K, Trea F, Toumi L, Bairi A, Maurel D, Guellati MA. L'hespéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothér.* 2007, 5 (4): 204-9.
- 46/ Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* 2009, 80 (11): 1799-808.
- 47/ Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel–Wissenschaft und Technologie.* 1995, 28, 25-30.
- 48/ Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G. Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 2006, 184 (5): 271-8.
- 49/ Nicoli M.C., Anese M. & Parpinel M. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables, *J. Trends Food Sci. Technol.* 1999, Vol. 10, 94-100.
- 50/ Kaper JB., Nataro JP., Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2004, Feb; 2(2):123-40.
- 51/ Kluytmans J., Van Belkum A., Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clinical Microbiology Reviews.* 1997, 10(3), 505-520.
- 52/ François Denis., Marie-Cécile Poly. *Bactériologie médicale : techniques usuelles* ECBU, Elsevier Masson. 2007, p139.
- 53/ Babayi H, Kolo I, Okogum JI. The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochemistry* 2004, 16 (2): 102-5.
- 54/ Didrak M. Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, *Salvia* sp and *Phlomis* sp). *J. Biol.* 1999, 23: 241-8.
- 55/ Modak B. Actividad antibacteriana de flavonoïdes aislados de exudados de *Heliotropium sinuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol. Soc. Quim.* 2001, 47 (1): 366-421.

- 56/ Okigbo RN, Mbajinka CS, Njoku CO. Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopiiaethopica* and *Occinumgratissimum* L. some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 2005, 1 (4): 392-7.
- 57/ Slavica B, Ilic SSK, B. Zoran BT. Flavonoids from flower of *Linumcapitatum* kit. *Phys. Chem. Technol.* 2004, 3: 67-71.
- 58/ Ilic SB, Konstrantinovic SS, Todorovic ZB. Antimicrobial activity of bioactive component from flower of *Linumcapitatum* Kit. *Physics Chem. Technol.* 2004, 3 (1): 73-7.
- 59/Dadi PK, Ahmad M, Ahmad Z. Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP sqynthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* 2009, 45 (1): 72-9.
- 60/ Ortuno A, Baidez A, Gomez P, Arcas MC, Porras I, Garcia-Lidon A, Del Rio JA. Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicilliumdigitatum*. *Food Chem.* 2006, 98 (2): 351-8.
- 61/ Kuster RM, Arnold N, Wessjohann L. Anti-fungal flavonoids from *Tibouchinagrandidifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2009, 37 (1): 63-5.
- 62/ Spedding G, Ratty A, Middleton E. Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* 1989, 12 (2): 99-110.
- 63/ Choi HJ, Song JH, Park KS. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 37 (3-4): 329-33.
- 64/ Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinae N, Hirota S. Protective effect of flavonoids on doxorubicin induced radiotoxicity. *Toxicoll.Lett.* 1997, 92(1): 1-7.
- 65/ Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins : Antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 2007, 41 (1): 42-8.
- 66/ ChandanaVenkateswara R, Vijayakumar M. Effect of quercetin, flavonoids and  $\alpha$ tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, 589 (1-3): 233-8.

- 67/ Lopez-Lazaro M. Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poisons. *Z. Naturforsch C.* 2000, 735 (11-12): 898-902.
- 68/ Siess MH, Le Bon AM, Lavier C. Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors* 2000, 12 (1-4): 193-9.
- 69/ Ariefdjohan MW, Savaiano DA. Chocolate and cardiovascular health: is it too good to be true? *Nutr. Rev.* 2005, 63 (12-1): 427-30.
- 70/ Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: A systematic review. *Nutr. Metab.* 2006, 3: 2.
- 71/ Morikawa K, Nonaka M, Mochizuki H, Handa K, Hanada H, Hirota K. Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (22): 11030-7.
- 72/ Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* 2008, 31(10): 1303-11.
- 73/ Chen HQ, Jin ZY, Wang XJ, Xu XM, Deng L, Zhao JW. Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci. Lett.* 2008, 448 (2): 175-9.
- 74/ Yao K, Zhang L, Zhang Y, Ye P, Zhu N. The flavonoid, fisetin, inhibits UV radiation-induced oxidative stress and the activation of NF-kappaB and MAPK signaling in human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* 2008, 14: 1865-71.
- 75/ Peggy E Pollak, Thomas V, Yinyuan M. and Loveline P.T. Chalcone synthase and flavonol accumulation in stigmas and anthers of *Petunia hybrida*. *Plant Physiology.* 1993, 102: 925–932.
- 76/ Morel S. Etude phytochimique et évaluation biologique de *Derris ferruginea* Benth. (Fabaceae). Thèse de doctorat, Université d'Angers, France. M. 2011

- 77/ Figen M.T. Phytoalexins: Defence or just a response to stress. *Journal of Cell and Molecular Biology*. . 2002, 1: 1–6.
- 78/ Jeandet P., Hébrard C., Deville M.A., Cordelier S., Dorey S., Aziz A. and Crouzet J. Deciphering the Role of Phytoalexins in Plant-Microorganism Interactions and Human Health. *Molecules*. 2014, 19(11): 18033-18056.
- 79/ Schmelzer E., Jahnen W. and Halbrock K. In situ localization of high-induced chalcone synthase and flavonoid products in epidermal cells of parsley leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1988, 85: 2989–2993.
- 80/ Shirley B.W. Flavonoid biosynthesis: "new" functions for an "old" pathway. *Trends in Plant Science*. 1996, 1: 377–382.
- 81/ Stapleton, A.E. Ultraviolet radiation and plants: Burning questions. *The Plant Cell*. 1992, 105: 881–889.
- 82/ Markham K.R. *Techniques of flavonoids identification*. Edition Academic Press, London. 1982
- 83/ ROMART ; « la nouvelle phytothérapie », Publicis Méditerranée éd R.C. 83 B320 (1993).
- 84/ Duke J., A. *Handbook of Energy Crop* (unpublished). Purdue University, Center for New Crops Plants Products, West Lafayette, Indiana. 1983 1-5p.
- 85/ Kaliyaperumal A., Kumarakurubaran S., Saradha D. M. *Cynodon dactylon* (L) Pers. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2013, 7(48), pp. 3477-3483.
- 86/ Benzahi K, Contribution à l'étude des flavonoïdes dans la plante *Cynodon dactylon* (L) Pers. Université Kasdi Merbah, Ouargla 2001, p 113, N° d'ordre : THE. CH.01/31/2.
- 87/ Negre R. *Petite flore des régions arides du Maroc occidental*, éd Centre national de la recherche scientifique. Paris. 1961, p 66.
- 88/ Lebreton P, Jay M, Voirin B. Sur l'analyse qualitative et quantitative des es. *Chim. Anal.* 1967 ; 49 : 375-383.
- 89/ Sadki, Hacht B, Souliman A, Atmani F. Acute diuretic activity of aqueous *Erica multiflora* and *Cynodon dactylon* rhizomes extract in rats. *J. Ethnopharmacol*, 2010; 128: 352-356.



- 90/Penelope O. Home Herbal. Dorling Kindersley Publishing, Paris, 1995, pp. 118-119.
- 91/Lebreton P, Jay M, Voirin B. Sur l'analyse qualitative et quantitative des es. Chim. Anal. 1967 ; 49 : 375- 383.
- 92/P.BINET et J.P.BRUNEL ; Paris VI<sup>e</sup> p766-776 (1968).
- 93/ R.BROUILLARD et Col ; J-Chem. Soc Perkin Trans 2 p1235-1241 (1991).
- 94/Ahmed S, Reza MS, Jabbar A. Antimicrobial activity of Cynodondactylon. Fitoterapia 1994; 65:463-464.
- 95/Markham.K-R-Rayan.k-G-Boor-S.J- et Mitchell.K.A. An increase in luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement.*phytochemistry*. 1998, 48, 791-94.
- 96/ Sari H Hakkinen, Sirpa O Karenlampi, I MaarinaHeinonen, Hannu M Mykkanen and A RiittaTorrönen, HPLC Methode for Screening of Flavonoids and Phenolic Acids in Berries., J Sci Food Agric 1998, 77, 543-551.
- 97/ Félix Kini, Adama Saba, Monique Tits, Luc Angelot et Pierre J. Guissou. Analyse par Chromatographie et par Spectrométrie Electronique des Extraits de Feuilles de *Odontonemastrictum* (Acanthaceae). Mise en Evidence de Flavonoides du type Flavone., J.Soc. Ouest-Afr (2008) 025 ; 117-121.
- 98/ Dimitrios Tsimogiannis, Martina Samiotaki, George Panayotou, Vassiliki Oreopoulou. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. Molecules 2007, 12, 593-606.
- 99/ Luis JC, Valdes F, Martin R, Carmona AJ, Dimz J. DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus* sp. Lusitanicum. Fitoterapia 2006, 77 (6): 469-71.
- 100/ Benzahi K., Etude Physico-chimique et Phamacologiques des hétérosides existante dans le Chiendent Cynodon Dactylon (L) Pers. Université KasdiMerbah, Ouargla 2017, p 96.
- 101/ Johnson I. Antioxydants et anticancereux, *Biofutur*. 1999 Vol. 186, 14-17.
- 102/ Ngameni, B., Kuete, V., Simo I.K., Mbaveng, A.T., Awoussong, P.K., Patnam, R., Roy, R., Ngadjui, B.T. Antibacterial and antifungal activities of the crude extract and compounds from *Dorsteniaturbanata* (Moraceae). South African J Botany.2009, 75 : 256-261.

103/ Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Vétérinaire à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS, 3ème Edition (2005).

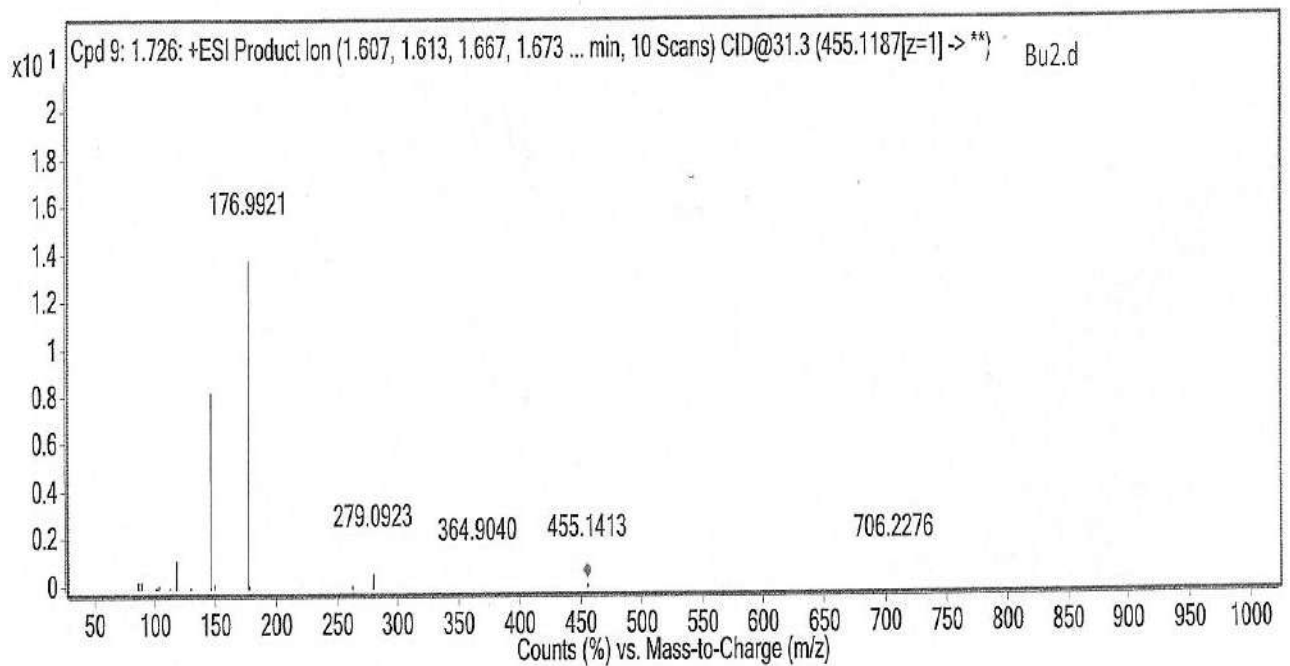
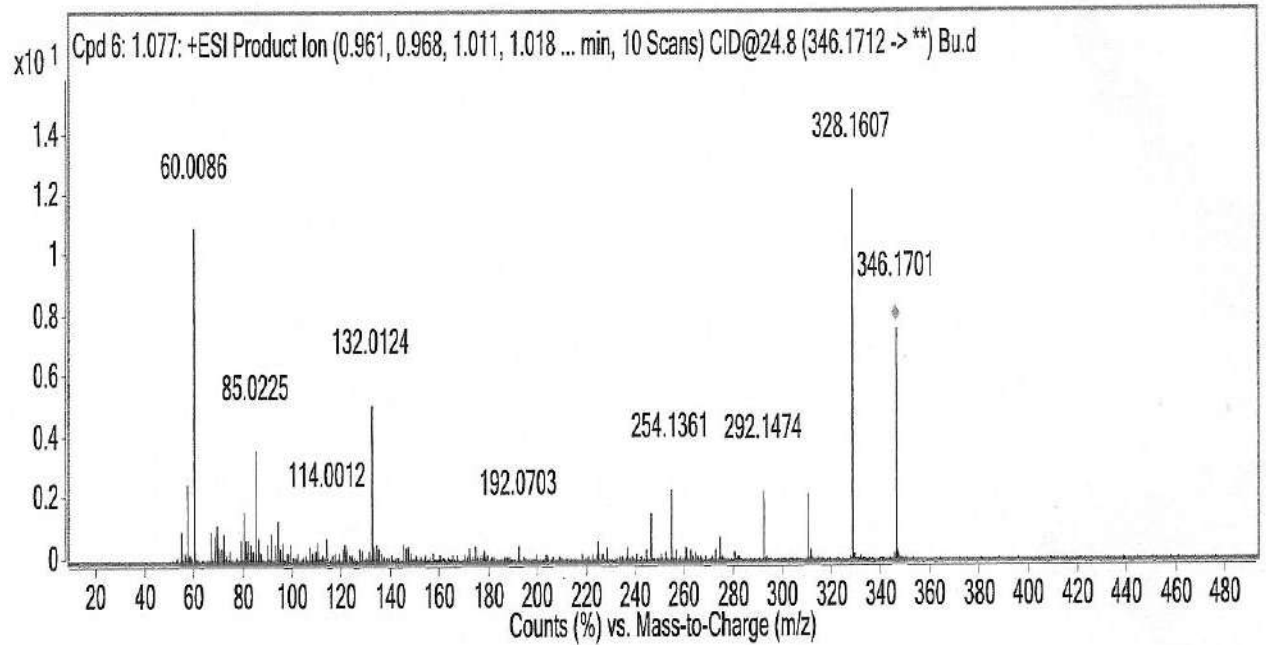
104/ March, R. E., Míax, X. S. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2004, 231, 157-167.

105/ Es-Safi, N. E., Kerhoas, L., Einhorn, J. and Ducrot, P. H. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2005, 447,93-100.

106/ Amie D. Davidovic- Amic D., Besto D.and Trinajstic N. Structure radical scavenging activity relationships of flavonids. *Croatica Chemica ACTD*. 2003, 76(1):55-61.

# ***ANNEXES***

# 1/ Les spectre LC MS/MS des composés existant dans l'extrait anthocyanidique:





**Photo N° 1 :** Test d'*Escherichia coli* avec B



**Photo N° 2 :** Test de *Klebsiella pneumoniae* avec B



**Photo N° 3:** Test de *Staphylococcus aureus* avec B



**Photo N° 4:** Test de *Klebsiella pneumoniae* avec B<sub>1</sub>



**Photo N° 5 :** Test d'*Escherichia coli* avec B<sub>2</sub>



**Photo N° 6 :** Test de *Salmonella typhi* avec B<sub>3</sub>



**Photo N° 7 :** Test de *Salmonella Typhi* avec B



**Photo N° 8 :** Test de *Escherichia coli* avec A





**Photo N° 9 :** Test de *Salmonella Typhi* avec A



**Photo N° 10 :** Test de *Staphylococcus aureus* avec A

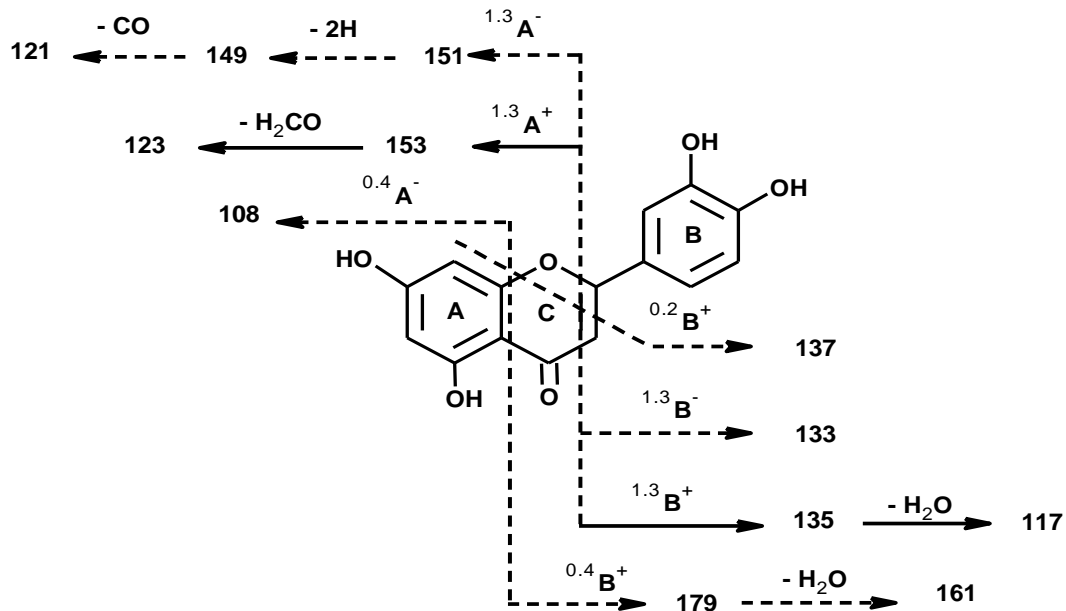




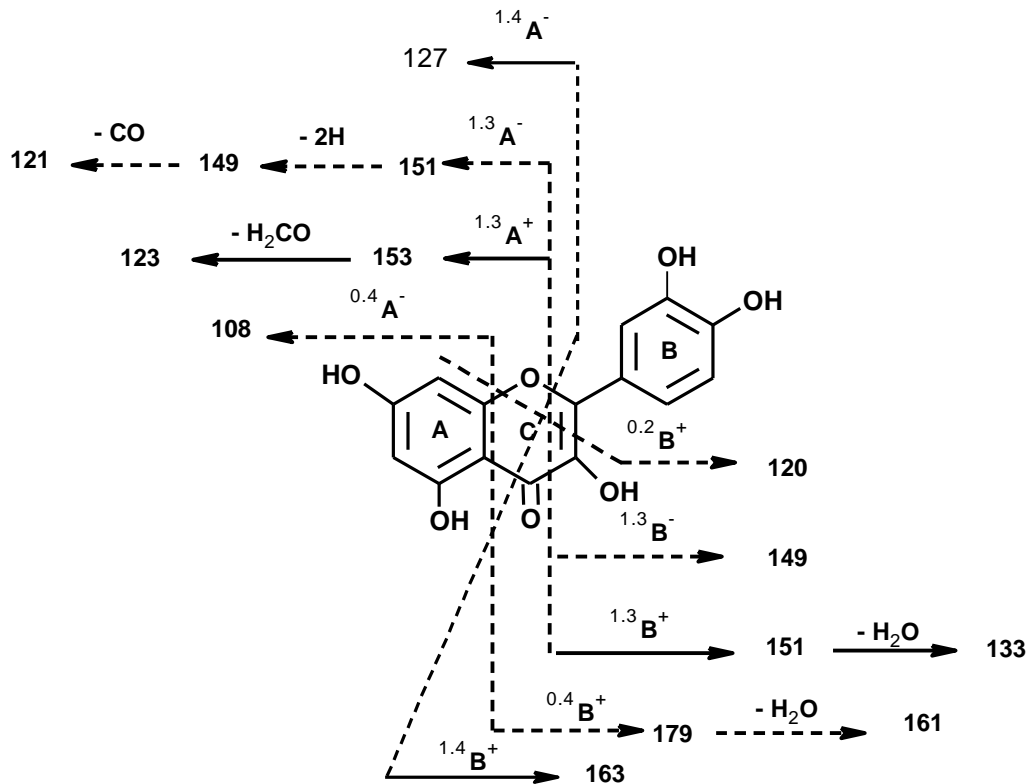
**Photo N° 11 :** Test de *Escherichia coli* avec B<sub>3</sub>

## Les différents mécanismes de fragmentation des flavones et des flavonols :

### 1/ Les fragmentations principales des ions de la luteoline $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ [104] :



### 2/ Les fragmentations principales des ions de la quercétine $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ [105] :

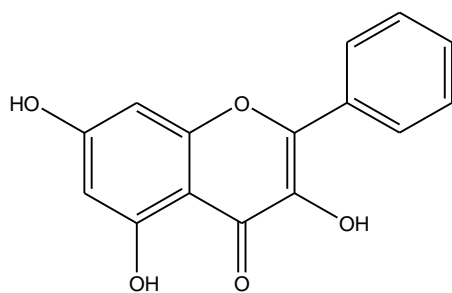


**Tableau 20 :** Maximums d'absorption et ions caractéristiques des acides phénoliques et flavonoïdes détectés dans l'extrait PSFME de baies d'argousier[106].

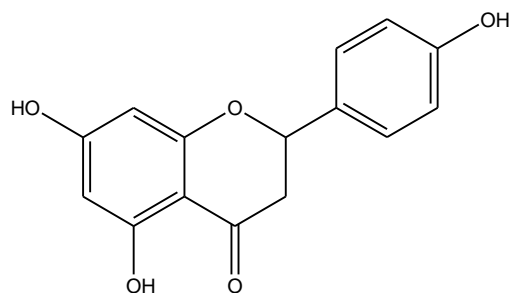
Assignation	Tr (min)	Fraction	$\lambda_{\max}$ (nm)	Mode Négatif		Mode positif		Proposition de structure
				[M-H] <sup>-</sup>	MS-MS (m/z)	[M+H] <sup>+</sup>	MS-MS (m/z)	
1	6.5	4-5	270	169	125,107	171	127,109	Acide gallique
2	10.4	4-5-6	254	153	125,107, 80	155	127,109, 81,53	Acide 3,4-dihydroxybenzoïque
3	11.2	4		285	175,199			En cour d'identification
4	14.4	4-5	258,293	153	109	155	111,137	Acide protocatéchique
5	24.3	8	254,270 (ep),349	771		773		Quercétine-3-O-Glu-7-O-rhamnoside
6	24.9	8	254,267 (ep),349	785		787		Isorhamnétine-3-O-Glu-7-O-rhamnoside
7	25.4	8	254,267 (ep),353	785	639,179, 125	787		Isorhamnétine-3-O-sophoroside-7-O-rhamnoside
8	25.9	4	373	221		223	205	En cour d'identification
9	26.8	8	254,267 (ep),345	991	845,653, 639	993		Quercétine diméthyl éther 3-hydroxyferuoyl-glucoside-7-O-rhamnoside
10	27.1	8	254,267 (ep),339	991	769,623	993	771	Dérivé triglycosylé acylé de l'isorhamnétine
11	27.6	8	254,267 (ep),319	809	623,609	811	625	Dérivé glycosylé de l'isorhamnétine
12	28.4	6-7	255,356	463	300,179, 151,125	465	303	Quercétine-3-O-glucoside
13	28.5	8	251,261 (ep),354	623	477,461, 315	625	463	Isorhamnétine-3-O-glucoside-7-O-rhamnoside
14	28.9	8	254,266 (ep),354	609	301,257 149	611	303	Quercétine-3-O-rutinoside
15	30.1	5-6		477	315,151	479	317,302	Isorhamnétine monoglycosylé
16	31.6	5-6-7	254,265 (ep),354	477	315,314, 285,271, 179,151	479	317,302	Isorhamnétine-3-O-glucoside

17	32.3	8	253,266 (ep),355	623	315,314, 300	625	317	Isorhamnétine-3- <i>O</i> - rutinoside
18	33.4	4	255,268 (ep),368	447	314,315	449		Dérivé monoglycosylé de l'isorhamnétine Isorhamnétine-3- <i>O</i> -pentoside
19	34.5	4	253,267 (ep),355	447	301,179, 151	449		Quercétine-7- <i>O</i> -rhamnoside
20	35.5	1-2	254,(268 ep),368	301	151,179, 121,107	303	153,137, 165,121, 229,257	Quercétine
21	38.1	4		707	545,477, 315	709	317	Dérivé acylé diglycosylé de l'isorhamnétine
22	38.4	2-3	255,266, 370	461	315,151	463	317,153	Isorhamnétine-7- <i>O</i> - rhamnoside
23	39.2	1	253,264 (ep),365	285	151,185	287	153,121, 183	Kaempférol
24	40.3	1-2-3	253,266 (ep)370	315	300,151, 107	317	302,285, 229,153, 139,165	Isorhamnétine
25	41.1	4		707	545,477, 315	709	317	Dérivé acylé diglycosylé de l'isorhamnétine

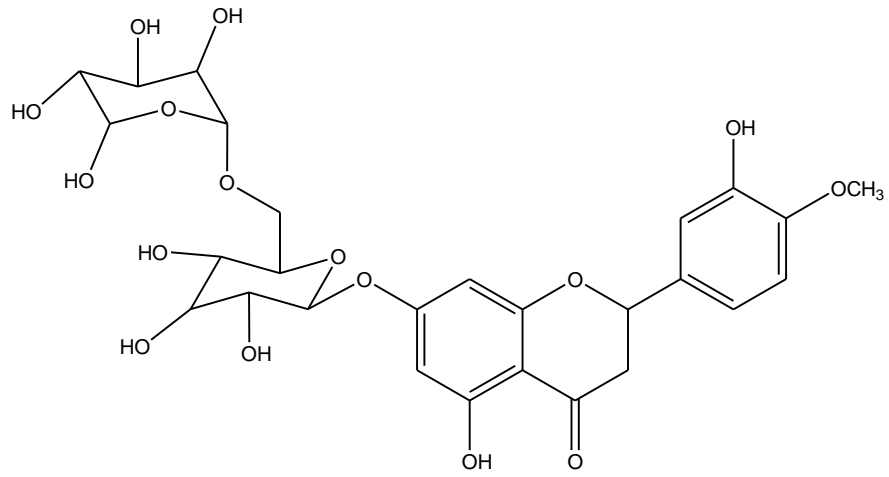
**Structures de quelques composés cités dans la partie théorique :**



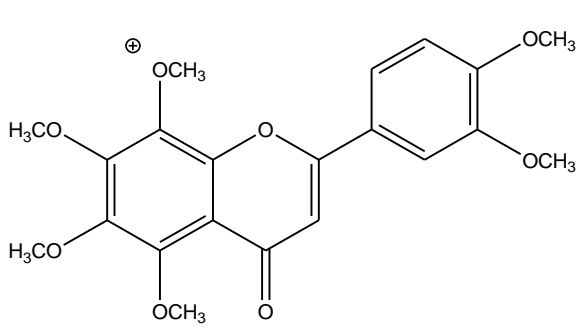
**Galangine**



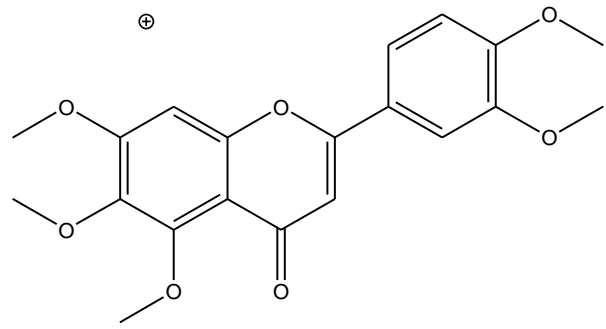
**Naringinone**



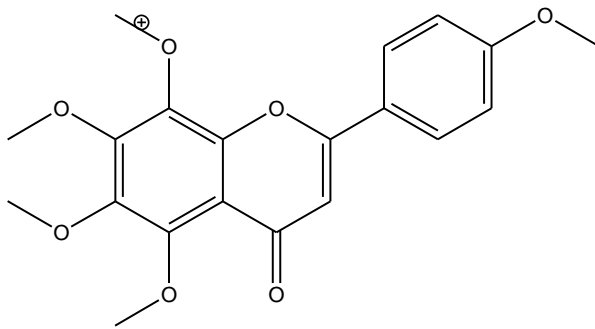
**Hesperidine**



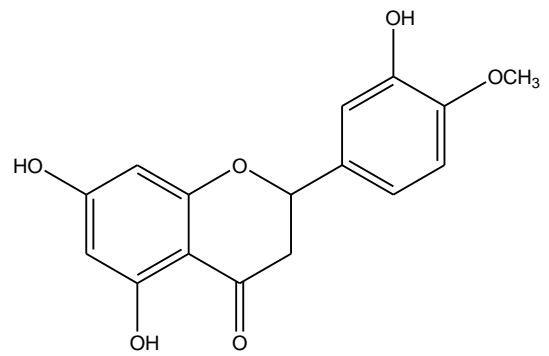
**Nobiletine**



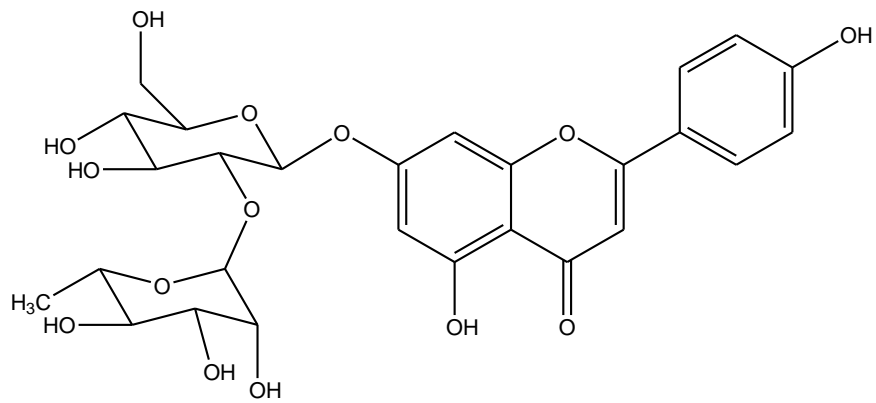
**Sinensétine**



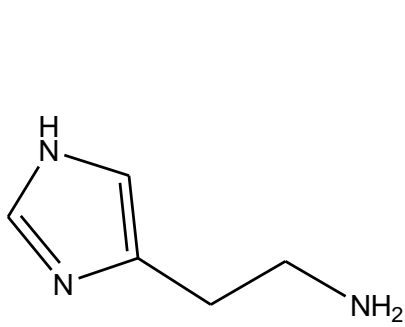
**Tangéritine**



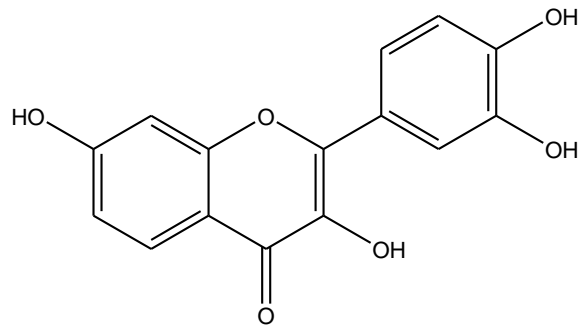
**Hespérétine**



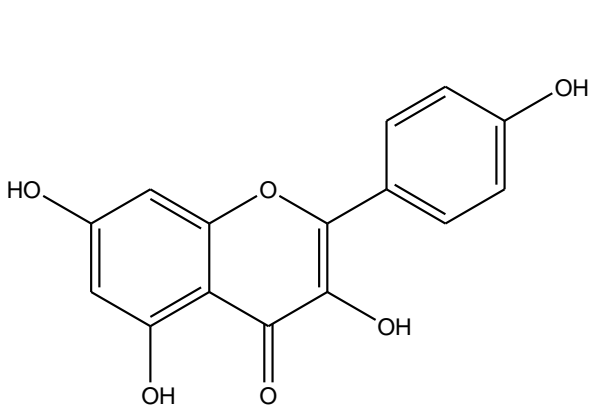
**Naringine**



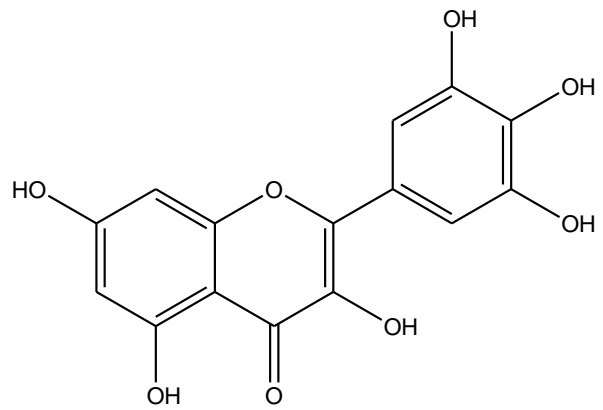
**Histamine**



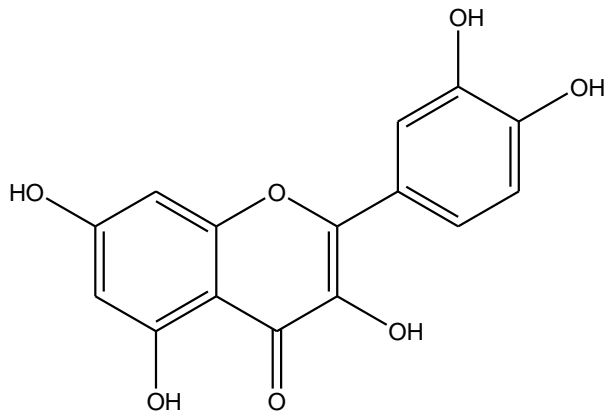
**Fisétine**



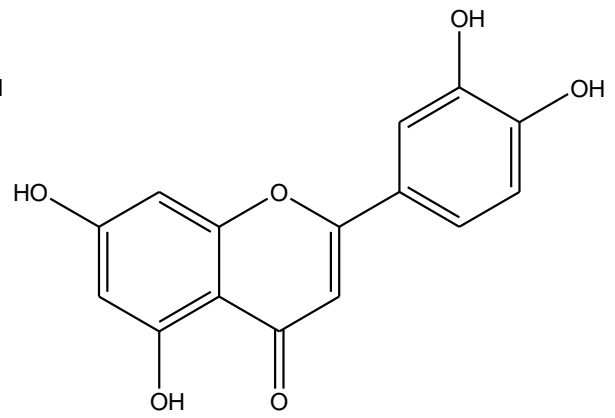
**Kaempférol**



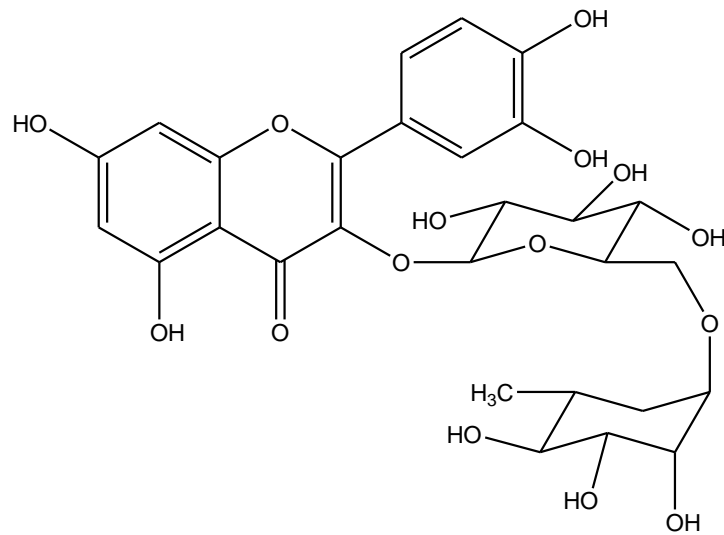
**Myricétine**



**Quercétine**



**Lutéoline**



**Rutine**