



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et écologie Végétale. . قسم بيولوجيا و إكولوجيا النبات .

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master II

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Métabolisme secondaire et molécules bioactives .

Intitulé :

Etude phytochimique et évaluations des activités anti-oxydantes et anti-bactériennes des espèces : *Hibiscus sabdariffa* L. et *Lepidium sativum* L.

Présenté et soutenu par : GRABSI WISSEM
BOUDEFFA HOUDA

Le : 19/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : CHAIB GHANIA (MCA - UFM Constantine).

Rapporteur : CHIBANI SALIH (MCA - UFM Constantine).

Examineurs : KEBAILI ZOUBIR (MAA - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

*Nous somme particulièrement reconnaissantes envers **Mr Chibani Salih.**, docteur à la faculté des sciences, Université des Frères Mentouri de Constantine de nous avoir encadrées, pour l'aide scientifique et les conseils avisés qu'il nous a prodigués.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à **Mm Chaib ghania .,** professeur à la faculté des sciences, Université des Frères Mentouri de Constantine qui nous a fait honneur d'accepter de juger notre travail en qualité de président du jury et **Mr Kebaili Zoubir.,** maitre de conférence qui a également accepté d'examiner notre travail.*

Nombreuses sont les personnes qui nous ont aidé à l'élaboration de ce travail. C'est aussi à elles que s'adressent nos remerciements et notre sympathie.

Dédicaces

❖ *A l'aide de dieu tout puissant, qui nous tracé le chemin de nos vie,*

nous avons pu réaliser ce travail que nous avons dédié :

❖ *A la mémoire de nos pères que dieu repose son âme en paix.*

❖ *A la lumière de mes yeux, l'ombre de mes pas et le bonheur de ma vie ma mère qui ma apporté son appui durant toutes mes années d'étude, pour son sacrifice et soutien qui m'ont donné confiance ,courage et sécurité.*

❖ *A mes chers frères.*

❖ *A mes sœurs et tous mes chères.*

GRABSI WISSEM

BOUDEFFA HOUDA

Liste des abréviations

AcOEt : Acétate d'éthyle

BuOH : Butanol

CHCl₃ : Chloroforme

°C : Degré celsius Cc

: Concentré

CCM : Chromatographie sur couche mince

DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl

DO : Densité optique

EML : Extrait *lepidume sativum*

EMH: Extrait méthanolique des *Hbiscus sabdarriffa*

EMFr : Extrait méthanolique des

FeCl₃ : trichloride de fer

g : gramme

HCl : Acide chlorohydrique

IC₅₀ : Concentration inhibitrice à50%

J : jours

KOH : Hydroxyde de potassium

L : litre

M : mase molaire

m : mètre

MeOH : Méthanol

mg : Milligramme

Mg : Magnésium

MHA : MuellerHinton

min : Minute

ml : Millilitre mm :

Millimètre MS :

matière sèche

Na₂ CO₃ : Bicarbonate

sodium NaCl : Chloride

sodium Na₂SO₄ : picrate de
sodium

NaOH : Sodium hydroxide

nm : nanomètre

SM : Solution mère

UV : Ultra-violet

µg : Microgramme

µl : Microlitre

HPTLC : high-performance thin layer chromatography

Liste des figures

Figure 1 : Organisation florale chez les Brassicacées	02
Figure 2 : Le diagramme florale de la famille brassicase.....	03
Figure 3 : Répartition géographique de <i>Lepidum sativum</i>	06
Figure 4 : Répartition géographique de la famille des malvaces	09
Figure 5 : Organisation générale des Malvacées	10
Figure 6 : Répartition géographique de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	13
Figure 7: Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	19
Figure 8 : Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique	20
Figure 9 : Structure de base de coumarine.....	20
Figure 10 : Structure de base de flavonoïdes.....	22
Figure 11 : Biosynthèse des flavonoïdes.....	23
Figure 12 : squelette de antocyanes (Kueny-Stotz, M. (2008) Contribution à la chimie des flavonoïdes)	24
Figure 13 : Formation en cascade des différentes espèces oxygénées réactives à partir du radical superoxyde (Koechlin-Ramonatxo, 2006).....	27
Figure 14 : Filtration de l'extrait par ROTA de l'espèce <i>hipiscus S</i>	34
Figure 15 : Filtration de l'extrait par ROTA de spèce <i>Lepidume S</i>	34
Figure 16 : Réduction du DPPH par le phénol (Hilali, 2006).....	38
Figure 17: Solution methanolique DPPH.....	39
Figure 18: Le DPPH poudre	39
Figure 19: criblage des terpènes de l' <i>Hibiscus sabdariffa</i>	48
Figure 20: criblage des terpènes de <i>Lepidume sativum</i>	48
Figure 21: chromatogramme photographié	52
Figure 22: chromatogramme photographié.....	52
Figure 23: La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	53
Figure 24: Teneur en polyphénols totaux(en mg/g d'extrait).....	54
Figure 25: l'effet de l'extrait <i>H.sabdariffa L</i> sur les souche bactérienne.....	56
Figure 26: L'effet de l'extrait <i>L.sativum L</i> sur la bacterie <i>listiria sp</i>	56
Figure 27: Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait methanolique de EHS.....	58
Figure 28: Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait methanolique de ELS.....	59
Figure 25: Histogramme représentatif de % d'inhibition du DPPH par l'extrait methanolique de <i>Hibiscus sabdariffa (EHS)</i> et <i>Lepidume sativum (ELS)</i>	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes concentrations des extraits.....	38
Tableau 2: Résultats de criblage des flavonoïdes.....	41
Tableau 3 : Résultats de criblage des Quinones.....	42
Tableau 4 : Résultats de criblage des Anthraquinones.....	43
Tableau 5 : Résultats de criblage des Tanins.....	43
Tableau 6: Résultats de criblage des Anthocyanes.....	45
Tableau 7 : Résultats de criblage des coumarines.....	46
Tableau 8: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV	46
Tableau 9: Résultats de criblage des triterpènes et stéroïdes.....	47
Tableau 10: Les extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.....	49
Tableau 11: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV.....	50
Tableau 12: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV.....	51
Tableau 13: La DO des EMHS et EMLS.....	53
Tableau 14: Le taux des polyphénols totaux calculés des feuilles et graines.....	53
Tableau 15: Les taux de polyphenols totaux existant dans les EMHBet EMLS.....	54
Tableau 16: Taux d'inhibition de l'extrais hydromhétanolique de la plante <i>Hibiscus sapdariffa</i>	55
Tableau 17: La sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les extraits du <i>Hibiscus sabdariffa L.</i>	55
Tableau 18: Taux d'inhibition de l'extrais hydromhétanolique de la plante <i>Lepidume sativum</i>	55
Tableau 19: La sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les extraits du <i>Lepidume sativum L</i>	56
Tableau 20: Taux d'inhibition des extraits EHS et ELS du DPPH.....	58

List e des photos

Photo 1 : photographié de la plante <i>Lepiduim sativum</i>	05
Photo 2 : photographié des graines <i>Lepiduim sativum</i>	05
Photo 3 : La plante <i>Hibiscus Sabdariffa</i>	32
Photo 4 : La plante <i>lipidum Sabdariffa</i>	32
Photo 5 : l'observation des CCM en UV 254 et 366 nm et en lumière blanche	35
Photo 6 : <i>HPTLC</i> : <i>high-performance thin layer chromatography</i>	35
Photo 7 : Le teste de l'activité antibactérienne.....	36
Photo 08 : criblages des polyphénole.....	45

Sommaire

Introduction

1^{ère} partie : Etude bibliographique

II.1.2-Intérêt et exemple d'espèce <i>Lepidium sativum</i>	03
II. 1.3-Milieux de vie	03
II.1.4- Utilisations	03
II.2.1- Le genre <i>Lepidium</i>	04
II.2.2- L'espèce <i>Lepidium sativum</i>	04
II .2.2.1- caractéristique botanique	04
II.2 .2.2. Origine et répartition géographique de la plante	05
II.2.2 .3. Ecologique	06
II.2.2.4 Noms vernaculaires	06
II.2.2.5 Classification phylogénétique	07
II.2 .2.6. constitutions chimiques	07
II.2 .2.7. utilisations et indications	08
II.2 .2.7.1. Utilisations alimentaires	08
II .2.2.7.2 . Utilisations médicinales.....	08
III. La plante <i>Hibiscus sabdariffa</i>	09
III.1. La Famille des <i>malvaces</i>	09
III.1.1. Description botaniques.....	09
III .1.2. Utilisations	10
III.2.Genre <i>Hibiscus</i>	11
III.3. L'espèce <i>Hibiscus</i>	11
III.3.1. Description botanique	11
III.3.2. Origine et répartition géographique	12
III.3.3.Ecologique	12
III .3.4.Nom vernaculaire	13
III.3.5.Classification phylogénique	13
III.3.6.Constituions chimiques	14
III.3.7 . Indications et utilisations	14

III.3.7.1. Utilisations alimentaires	15
III.3.7.2 Utilisations médicales	15

Chapitre II Les Métabolites secondaires

I. Le métabolite secondaire	16
I.1.Introduction	16
I.2. Synthèse de métabolites secondaires chez les végétaux	17
I.3. Fonctions des métabolites secondaires.....	17
I.4. Classification des métabolites secondaires	18
I.4.1. Les composés phénoliques	18
I.4.1.1. Classification des composés phénoliques	19
I.4.1.1.1. Acides phénoliques	19
I.4.1.1.2. Coumarines.....	20
I.4.1.1.3. Quinones.....	21
I.4.1.1.4 Tanins	21
I.4.1.1.5. Flavonoïdes.....	22
I.4.1.1.6 Anthocyanes	24
I.4.2. Terpénoïdes	25
II. Activité antioxydante.....	26
II.1. Historique	26
II.2. Stress oxydant	26
II.3. Le radical libre	26
II.4. Principaux radicaux libres et leurs origines.....	27
II.5. L' antioxydant.....	28
II.5.1. Les antioxydants endogènes.....	28
II.5.2. 2 Les antioxydants exogènes.....	28
II.6. Mécanismes d'actions des antioxydants.....	29
II.7.Les maladies liées au stress oxydant.....	29
III. Activité Antimicrobienne	30
III.1. Effet antimicrobien	30
III.2. Mécanisme d'effet antimicrobien des polyphénols.....	30
III.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées	30

2^{ème} partie : Travail expérimental

Chapitre I : Matériels et méthodes

I. Matériel végétal	32
I.1. Analyse qualitative	32
I.1.1. Criblage des métabolites secondaires	32
I.1.1.1. Criblage des Flavonoïdes	32
I.1.1.2. Criblage des Quinones	32
I.1.1.3. Criblage des Anthraquinones	32
I.1.1.4. Criblage des Tanins.....	33
I.1.1.5. Criblage des coumarines	33
I.1.1.6. Criblage des Stérols et Triterpènes	33
I.2. Préparation des extraits des espèces <i>lepidium sativum</i> L. et <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	34
I.3. Etude analytique par chromatographie sur couche mince(CCM).....	34
II. Dosage des polyphénols	35
III. Evaluations des activités biologiques	35
III.1. Activité antioxydante.....	36
III.1.1.Méthode de détermination de l'activité antioxydante	37
III.1.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH	38
III.. Activité antibactérienne	35

Chapitre II :Résultats et discussion

I.1 Métabolites secondaires	41
I.1. 1. Criblage des Flavonoïdes	41
I .1.2. Criblage des Quinones	42
I.1 .3.Criblage des Anthraquinones.....	43
I.1 .4. Criblage des Tanins	43
I.1 .5. Criblage des Anthocyanes.....	45
I.1 .6. Criblage des coumarines	46
I.2 .è. Criblage des stérols et triterpènes.....	47
I.3.Obtention des extraits	49
I.4 . Analyse chromathographique.....	50
I. 4.1.Chromathographie sur couche mince	50
II. Dosage des polyphénols	53
III.Evaluation des activités biologiques	55
III.1.Activité antioxydante	55
III.2.Activité antibactérienne	57

Conclusion

Références bibliographiques

Résumé

Introduction

Introduction :

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Actuellement, l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Lhuillier, 2007).

Plus de 120 composés provenant de plantes sont aujourd'hui utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel. Parmi, les 25 composés pharmaceutiques les plus vendus au monde, 12 d'entre eux sont issus de produits naturels. Cela signifie que le nombre de médicaments issus de produits naturels est supérieur à celui issus de la chimie combinatoire où plus de 10 000 molécules doivent être synthétisées puis testées afin de mener au développement d'un seul médicament.

Par conséquent, les quelques 250 à 300 000 espèces inventoriées de plantes que l'on trouve sur terre, dont seulement 5 à 15% ont fait l'objet de recherches de molécules bioactives, représentent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels.

Selon certains auteurs, les composés d'origine naturelle présentent l'avantage d'une très grande diversité de structures chimiques et ils possèdent aussi un très large éventail d'activités biologiques (Bérubé-Gagnon, 2006).

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser (Yano *et al.*, 2006). Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices comme source d'antioxydants, qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets du stress oxydant (Mata *et al.*, 2007).

Cette matière végétale contient un grand nombre de molécules qui ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie, Parmi ces composés on retrouve, les coumarines, les alcaloïdes, les acides phénoliques, les tannins, les lignanes, les terpènes et les flavonoïdes (Bahorun, 1997).

Le but de cette étude est d'évaluer l'activité anti-oxydante par anti-radicalaire le test au DPPH et anti microbienne par la méthode de diffusion en milieu gélosé des extraits bruts et leurs fractions de deux plantes médicinales (*lipidium sativum* et *Hibiscus sabdariffa*).

Nos travaux ont été divisé en deux parties, nous avons abordé dans la première partie une étude bibliographique qui regroupe deux chapitres dont le premier concerne la présentation botanique des plantes *Hibiscus sabdariffa* et *Lipidium sativum*, le deuxième chapitre est consacré aux substances naturelles, et leurs classifications. La deuxième partie comprend deux chapitres ; le premier chapitre concerne le matériel et méthodes utilisées dans ce travail, et le deuxième chapitre les résultats obtenus et discussions.

1ere PARTIE

Chapitre 1 :

**Etude Botanique *d'Hibiscus sabdariffa et
Lepidium sativum***

I .L'importance des plantes médicinales

Depuis plusieurs années, l'utilisation de plantes médicinales ou de préparations à base de plantes connaît un succès croissant. Il est d'abord intéressant de remarquer que 30% environ des médicaments prescrits par le médecin sont d'origine naturelle, alors que cette proportion est de 50% pour les médicaments.

II. La plante *Lepidium sativum*

II .1. Famille des brassicacées

La famille des Crucifères ou Brassicacées est connue depuis longtemps, comme étant la famille de la moutarde, c'est une famille très importante ; elle se compose de 13-19 tribus, répartie en 350 genres et plus de 3500 espèces. Elle se trouve surtout dans les régions tempérées et froides. Ce sont principalement des plantes variables ; annuelles, bisannuelles ou vivace.

II.1 .1. Descriptions botaniques

Le terme **Crucifère** signifie qui porte une **croix**, c'est-à-dire la forme des fleurs dont les quatre pétales opposés se croisent pour former une croix (Figure 1). Les feuilles sont généralement alternées et sans stipules. La structure florale est très caractéristique de cette famille :

- Système racinaire

La plupart ont des racines pivotantes à ramifications nombreuses

- Caractéristiques de la tige

Ronde, acaulie (absence de tige visible) fréquente notamment chez les choux, pouvant présenter des poils et des épines, présence de sénévoles variés (responsable de la saveur) dans la sève qui leur donnent des propriétés médicinales et alimentaires.

Disposition et caractéristiques des feuilles par rapport à la tige

Feuilles alternes, dépourvues de stipules, feuilles pétiolées (tige reliant la feuilles et la tige) ou sessiles (fruit directement rattache à la tige), dentées, velues ou glabres (sans poils).

- Types de fleurs

Les fleurs sont épigynes (au dessus de l'ovaire), hermaphrodite, bisexuées et elles sont actinomorphes.

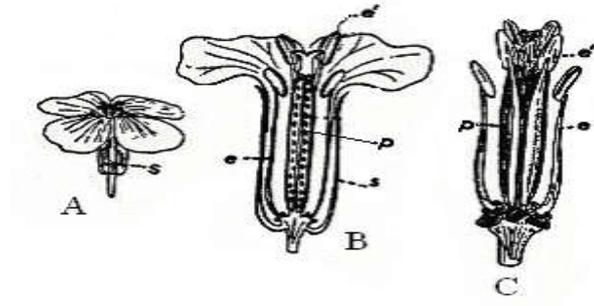


Figure 1: Organisation florale chez les Brassicacées .

- La corolle

Composées de 4 pétales

La corolle est dialypétale (composées de plusieurs pétales détachés) .

- Le calice

Le calice est composé de 4 pétales

Ils sont fermés et bosselés à leur base

- Les étamines

L'androcée groupe 6 étamines libres et bisériées (disposées de 2 rangs) dont 4, groupées en deux paires antéro-postérieure (de l'avant a arrière) sont plus fortes que les deux autres, externes et latérales : l'androcée des Brassicaceae est tétradynome. Exceptionnellement, le nombre d'étamine peut être réduit à 2 ou 4 ou plus nombreux (entre 8 et 24)

- L'ovaire

L'ovaire est supère avec deux carpelles soudées .

- Les fruits

Le fruit des Brassicaceae est généralement une silique (fruit sec) ou une silicule (silique petit et large).

- Mode de dissémination

La dissémination se fait par des insectes pollinisateurs tel que les abeilles à cause du pollen lourd et collant. Certaines fois la pollinisation est possible si deux plantes se touchent. (Grubben , 2004)

- Équation florale :
O:4S, 4P, 2+4E, (2C)
4 sépales non soudés
4 pétales non soudés
étamines en 2 groupes : 2 grandes et 4 petites
2 carpelles soudés, l'ovaire est supère .



Figure 2 : Le diagramme florale de la famille brassicaceae

II.1.2. Intérêt et exemple d'espèces

Beaucoup de Brassicaceae sont comestibles par leurs feuilles (choux), par leur racine (*Brassica napus* : rutabaga, *B. rapa* : navet, *Raphanus sativus* : radis) ou encore par leur inflorescence (*Brassica oleracea*: choux-fleur). D'autres servent de condiments (*B. Sinapsis* : moutardes). Le colza (*Brassica napus* ssp. *oleracea*), est cultivé pour ses graines oléagineuses. Certaines espèces ont des propriétés antiscorbutiques, stimulantes et dépuratives, d'autres servent de fourrage.

II.1.3. Milieu de vie

Mondial, adaptées à tous les écosystèmes.

II.1.4. Utilisation

La famille des Brassicacées, est parmi les dix familles des plantes les plus économiquement importantes . En effet, de nombreuses espèces sont utilisées comme plantes alimentaires : les choux-fleurs, les choux de Bruxelles, les choux de brocolis (*Brassica oleracea*), le colza (*Brassica napus*), le navet (*B. rapa*), le radis (*Raphanus sativus*), le cresson alénois (*Lepidium campestre*),... (livre légume G. J. H. Grubben – 2004)

Certaines Brassicaceae sont utilisées comme condiments telles que : la moutarde noire (*Brassica nigra*), la moutarde chinoise (*B. juncea*), la moutarde blanche (*Sinapis alba*), le raifort (*Armoracia rusticana*), la diplotaxe (*Diplotaxis harra*), et d'autres sont employées comme sources industrielles des huiles végétales : *Brassica*, *Crambe*, *Eruca*.

La famille comporte beaucoup de plantes ornementales, en particulier : les alyssons ou alyssums (*Alysum* ou *Lobularia*), les giroflées (*Erysimum*) et l'isatis des teinturiers ou pastel (*Isatis tinctoria*) qui donne une teinture bleue qui a été remplacée progressivement par l'indigo puis par des produits de synthèse.

II .2.1. le genre *lepidium*

Le genre *Lepidium* est constitué d'environ 175 espèces, largement distribuées à travers le monde, sur tous les continents excepté en Antarctique. C'est l'un des genres les plus représentés de la famille des Brassicacées. Peu d'informations sont connues sur la période d'apparition de ce genre. Il semble que celui-ci soit originaire du bassin méditerranéen, où la plupart des espèces diploïdes ont été trouvées.

Les *Lepidium* sont connus sous le nom vernaculaire de "Passerage", nom proclamant l'ancienne utilisation comme antidote de la rage.

Lepidium est la transcription du grec *lepidion*, diminutif de *lepis*, coquille, et signifie petite coquille, sans doute par allusion à la forme des fruits.

Ce sont des plantes annuelles, vivaces ou sous-ligneuse, à fleurs petites, blanches, rose ou violacées, caractérisées par la silicule déhiscente, à loge renfermant une ou rarement deux graines .

II.2 .2. l'espèce *Lepidium sativum*

II.2.2.1. Caractéristique botanique

plante herbacée annuelle érigée, atteignant 80cm de haut, plus ou moins glauque : tige cylindrique ou finement striée , fortement ramifiée , glabre, Feuilles alternes, irrégulièrement pennées , atteignant 12cm x 6cm ; pétiole atteignant 4cm de long , folioles 5-11, à contour ovale ou obovale , pinnatiséquées, lobes ultimes habituellement dentés de façon irrégulière, légèrement poilus au-dessus ,glabres au-dessous , folioles des feuilles supérieures devenant graduellement linéaires, les feuilles terminales habituellement simples et linéaires, parfois lobées ou dentées .

Inflorescence : grappe terminale ou axillaire de 1-3cm de long, accrescente jusqu'à 25 cm quand elle est en fruits fleurs bisexuées, régulières, 4-mères : pédicelle de 1.5-4.5mm de long, ascendant : sépales ovales de 1-2mm de long : pétales spatulés à onglet court, atteignant 3mm de long , blancs ou rose atteignant 3mm de long , blancs ou rose pale : étamines 6 , anthères généralement violacées : ovaire supère, aplati ,apex marginé , de croissance : l'une en arbuste étalé et l'autre moins commune en arbuste compact à branches érigées .

(Burkill. 1985; Jansen., 1981; 1982 ; Schippers , 2000).



Photos 1 : photographié de la plante
Lepidum sativum



Photos 2 : photographié des graines
Lepidum sativum

II.2. 2.2 Origine et répartition géographique

on ignore l'origine exacte de *Lepidium sativum*, mais on pense qu'il pourrait s'agir de l'Ethiopie et des pays avoisinants , ou de l'Asie occidentale. Sa domestication s'est probablement faite en Asie occidentale. Il était déjà cultivé dans l'Antiquité en Grèce et en Italie et peut-être aussi en Egypte. On le cultive Gestion le plus souvent , *lepidium sativum* est cultivé dans les jardins ou, comme en Ethiopie, dans les champs en association avec le tef ou le lin .pour la production de germes les graines sont semées dru en lignes et légèrement recouvertes de terre ,mais pas obligatoirement .Environ 10 jours après la germination, on peut récolter les plantules. On peut aussi les éclaircir si on préfère les plants de plus grande taille . En Europe, les germes sont vendus directement dans les barquettes ou ils ont germé. Pour la production des graines , on laisse un certain nombre de plantes jusqu' à ce que les graines soient bien mures . les plantes sont ensuite arrachées, séchées et battues. On ne connaît ni maladie ni ravageurs graves, mais quelques infections fongiques et virales ont été signalés, ainsi qu'une sensibilité aux nématodes . (tele botanica , 2009)

II.2.2.3 Ecologique

Lepidium sativum se développe dans n'importe quel sol riche léger ,à forte rétention d'eau mais il pousse mieux sur les quelle altitude et toute l'année, mais dans les régions tropicales il pousse mieux pendant la saison froide .il résiste assez bien à la sécheresse. En afrique tropicale ,il est cultivé à 750 - 2900m d'altitude ,mais il préfère les conditions froides à 2400 m d'altitude environ. Burkill. 1985 :Jansen. ,1981 ; 1982 b ; Schippers. 2000).

On ne connaît ni maladie ni ravageurs graves, mais quelques infections fongiques et virales ont été signalés , ainsi qu'une sensibilité aux nématodes .



Figure 3 : Répartition géographique de *Lepidium sativum*

II.2.2.4 Noms vernaculaires :

Cresson alénois, cresson des jardins, cressonnette (Fr). Garden cress ,peppergrass(En). Mastruco ordinario ,agriao mouro (Po) , حب الرشاد (Ar). (Brotonegoro,S.& Wiharti, W .2001) .

Burkill,H.M. 1985 :Jansen,P.C.M. ,1981 ; Jonsell,B,.1982 b ; Schippers, R.R. 2000

II.2.2.5 Classification phylogénétique APG III

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dilleniidae</i>
Ordre	<i>Capparales</i>
Famille	<i>Brassicaceae</i>
Genre	<i>Lepidium</i>
. Espèce	<i>Lepidium sativum.</i>

II.2 .2.6. constitutions chimiques

La composition nutritionnelle des germes frais de *lepidium sativum* par 100 g de partie comestible est de : eau 89 g, énergie 134 Kj (32kcal), protéines 2,6 g, lipides 0.7 g, glucides 5,5 g, fibres 1,1 g, Ca 81 mg, Mg 38 mg, P 76 mg, Fe 1,3 mg Zn 0,23 mg, vitamine A 9300 UI, thiamine 0.08 mg, riboflavine 0.26 mg, niacine 1.0 mg folate 80 µg, acide ascorbique 69 mg, (USDA, 2002).

La tige et les feuilles de *Lepidium sativum* contiennent des glucosinolates, le composant principal étant la glucosinolates, le composant principal étant la glucotropéoline (benzylglucosinolate). Distillée à la vapeur, la plante produit environ 0.1% d'huile essentielle incolore à l'odeur piquante caractéristique, la graine donne près de 25% d'une huile brun jaunâtre semi-siccative à odeur particulière et déplaisante, l'huile est riche en acides oléique linoléique et urique et contient également des alcaloïdes imidazoles. Elle possède des propriétés anti-oxydantes. Le tégument de la graine germée contient beaucoup de mucilage, lequel présente une substance allélopathique, le lépidimoïde. Les effets de la graine germée ont été étudiés afin d'en déterminer la capacité à ralentir l'hydrolyse de l'amidon en glucose chez les diabétiques. L'huile des graines possède une activité oestrogène prononcée.

II.2 .2.7. utilisation et indication

Les parties utilise de *Lepidium sativum* L. sont les feuilles et les graines .

II.2 .2.7.1. Utilisation alimentaire

Dans de nombreuses régions du monde, les germes de *Lepiduim sativum* sont utilisées en salade en raison de leur gout piquant. Tantôt les fruits entiers, tantôt les graines, sont employés frais ou séchés comme condiment à saveur poivrée. Les graines sont consommées en boisson par les Arabes après cuisson dans l'eau triturées dans du miel ou en infusion dans du lait chaud. L'huile des graines sert à l'éclairage et à la confection de savon. En Ethiopie. La graine et son huile ont avant tout des usages médicaux Mais elles sont employées aussi comme condiments et en pâtisserie, malgré l'odeur désagréable de l'huile. On applique une pate de graines allongée d'eau sur les lèvres gercées, et aussi pour soigner les coups de soleil et autres problèmes de peau qui affectent hommes et animaux.

II .II.2.7.2 . Utilisations médicales

Maux de gorge, la toux, l'asthme et les maux de tête, et en grandes quantités pour provoquer l'avortement. On les applique également en externe pour éloigner les insectes. A l'île Maurice, on emploie les graines pilées dans l'eau pour traiter le hoquet et les maux d'estomac.

En Inde , l'huile des graines, à l'instar de l'huile de moutarde, est utilisée pour soigner le hoquet et les problèmes intestinaux. Les graines pilées sont appliquées en cataplasme sur la peau et possèdent une action vésicante et bienfaisante sur les ecchymoses et les entorses. Les graines sont aussi réputées avoir des vertus galactagogues, emménagogues, laxatives, toniques, diurétiques et aphrodisiaques. Le mucilage des graines germées apaise l'irritation des intestins pendant les épisodes de dysenterie et de diarrhée.

Les graines sont une panacée de la médecine maghrébine. Les parties aériennes sont utilisées dans le traitement de l'asthme, de la toux et du flux hémorroïdal.les feuilles ont une action légèrement stimulante et diurétique et servent à traiter les maladies d'origine scorbutique et les problèmes de foie. Les racines sont utilisées contre la syphilis. En Europe, la plante sert à soigner la toux et la constipation, et elle est utilisée comme diurétique et pour renforcer le système immunitaire.

Lepidium sativum est très souvent employé comme organisme-test dans la recherche sur la physiologie des plantes, comme organisme-test dans la recherche sur la physiologie des plantes, comme plante indicatrice pour examiner le niveau de toxicité des polluants environnementaux, et en recherche expérimentale pour déterminer divers pathogènes.

III. La plante *Hibiscus sabdariffa*

III.1. La Famille des malvaceae

La famille des malvaceae : Plus de 1000 espèces dans le monde réparties dans plus de 80 genres ; dans la région, on compte une douzaine d'espèces appartenant à 5 genres ; famille présente dans les régions chaudes et tempérées ; le nom de la famille dérive du genre *Malva* qui désigne les mauves ; ce nom provient du grec « *malacos* » qui signifie « mou », en référence aux propriétés des mauves (émollientes). (Marine *al*, 2009)



Figure 4 : Répartition géographique de la famille des malvaceae.



III.1.1. Description botaniques

Caractéristique générale permettant de reconnaître une plante appartenant à cette famille :

- Les fleurs : entomophiles, sont solitaires ou groupées en inflorescences variables, axillaires ou terminales ; cymes corymbiformes ou paniculiformes, fascicules, etc. Elles sont pentamères et actinomorphes, très exceptionnellement zygomorphes. Elles sont axillées par des bractéoles involucreales, en nombre supérieur à 3, faisant office de calicule.
- Le calice : a une préfloraison valvaire, et possède 5 sépales libres ou connés.
- La corolle : une préfloraison contournée à imbriquée, et de compose de 5 pétales libres ou fréquemment légèrement soudés à la base. On assiste là à un début de gamopétalie .
- L'androcée : est très particulier il est monadelphé.
les étamines s'unissent par leur filet pour former un tube qui porte au sommet des anthères réduites à une loge, Le pollen est épineux.

- les étamines ne sont pas encore toutes groupées au sommet, comme chez le genre *Malva*, mais réparties tout le long du tube staminal.
- Les carpelles : fermés , sont soudés en un ovaire à placentation axile.

Les fruits : Des espèces tropicales et primitives, qui ont conservés un ovaire à 5 carpelles individualisés, sont des capsules dehiscentes à 5 fentes. Chez les genres évolués, ayant réalisés la complete fusion des carpelles, les fruit est schizocarpique, libérant à maturité de nombreux akènes. Exceptionnellement, le genre *Malvaviscus* produit des baies.

Les graines : sont souvent couvertes de poils fins, qui peuvent être disposés en touffes comme chez *Gossypium*. Elles ont peu ou pas d'albumen, et un embryon courbé ou droit.(Marine Laval et Mathieu Menand 2009) .

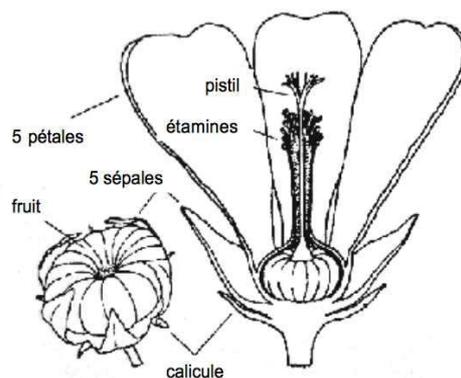


Figure 5 : Organisation générale des Malvacées

III .1.2. Utilisation

Les genres *Hibiscus*, *Malva* et *Althaea* sont connus surtout par leurs espèces ornementales : la rose de Chine (*Hibiscus rosa-sinensis*), la rose trémière (*Althaea rosea*), etc. Certains *Abutilon* sont aussi cultivés pour l'ornementation. D'autres espèces sont, en raison de leur richesse en mucilage, utilisées dans les régimes alimentaires tropicaux (gombo, *Hibiscus esculentus*) ou en herboristerie (guimauve officinale, *Althaea officinalis*). De nombreux *Hibiscus* sont appréciés aussi, localement, pour leurs fibres textiles, comme par exemple le da, ou chanvre de Guinée, tiré de la tige d'*Hibiscus cannabinus*). Les *Urena*, en particulier *Urena lobata*, pantropical, fournissent de même, après rouissage, des fibres de bonne qualité textile.

Mais les Malvaceae économiquement les plus importantes sont les cotonniers (*Gossypium*). L'élément textile des cotonniers est constitué par les soies qui recouvrent les graines, dont l'embryon est, par surcroît, riche en huile alimentaire. (Marine *al* , 2009)

III.2.Genre *Hibiscus*

L'*Hibiscus* est un arbuste à fleurs originaire d'Asie issu de la famille des Malvacées. Il est composé de plus de 30 000 variétés, et de plus de 200 espèces, dont seules deux sont cultivables en Europe, la Rose de Chine, et l'hibiscus syriacus. L'arbuste est composé de feuilles simples, ovales et dentées, et de fleurs à la symétrie centrale, dont les cinq étamines sont soudées autour un long tube.

L'hibiscus est un petit arbuste fleuri qui mesure entre 40 et 70 cm.

Plante tropicale, l'hibiscus supporte très mal le gel, et doit être planté en pot dans les régions d'Europe un peu trop fraîches pour lui. Il se rempote au milieu du printemps, et sa floraison a lieu entre mars et octobre. L'hibiscus, pour s'épanouir, a besoin d'une terre riche en humus. Placez des billes d'argile au fond du pot afin d'optimiser le drainage. Son développement nécessite par ailleurs une grande exposition au soleil. (tela botanica, 2014).

III.3. L'espèce *Hibiscus*

III.3.1. Description botaniques

Hibiscus sabdariffa est une plante herbacée, annuelle à port de sous-arbrisseau atteignant 1 à 1,50 m et plus, suivant les types de l'espèce et le mode de culture.

La tige est robuste, verte ou rougeâtre suivant les variétés, glabre ou hispide, parfois avec quelques poils tuberculés épineux (Kerharo et Adam, 1974).

Elle porte des feuilles glabrescentes, ovales ou trilobées. Les fleurs sont axillaires de 3 à 4 cm de diamètre caractérisées par un calice à cinq sépales de 3 à 4 cm de long dont la couleur verte ou rouge correspond à celle de la tige et par une corolle à cinq pétales jaunes, mouchetés de brun-rouge. A maturité le fruit capsulaire est entouré par le calice persistant devenu charnu.

III.3.2. Origine et répartition géographique

Hibiscus sabdariffa était cultivé à l'origine en Afrique. Il a été largement distribué en Asie, où l'espèce s'est adaptée (Clydesdale et al. , 1979).

Hibiscus sabdariffa est présent en Thaïlande, au Vietnam, en Malaisie, en Chine, au Soudan et au Mexique. Il est aussi présent dans d'autres pays, tels que l'Egypte, le Sénégal, la Tanzanie, le Mali, le Tchad et la Jamaïque, qui en produisent en petite quantité. (Thèse de Pharmacie Seydou TANGARA 62).

III.3.3. Ecologique

La plante *H.sabdariffa* a des besoins de températures situés entre 18°C et 35°C. La croissance de la plante s'arrête à 14°C et elle meurt alors au bout de 15 jours. A 10°C, la mort survient au bout de 2–3 jours seulement. La production de fleurs et de calices diminue en dessous de 17°C. Les cotylédons ne supportent pas les températures inférieures à 10°C pendant plus de 2–3 heures.

L'H.sabdariffa est une plante photosensible qui fleurit mieux lorsque la longueur du jour est inférieure à 12 heures. Elle a besoin de 13 heures de lumière par jour pendant sa croissance végétative pour empêcher sa floraison prématurée. Pourvue d'un système racinaire profond, la roselle a besoin d'une profondeur de sol appropriée ; elle est relativement résistante à la sécheresse. C'est une culture qui se pratique sur des types de sols très variés, les meilleurs étant des limons friables retenant beaucoup d'eau.

L'H.sabdariffa pousse bien dans les régions recevant 800–1600 mm de pluie par an et a besoin d'au moins 100–150 mm par mois pendant sa croissance végétative, ou 300–400 mm répartis sur une période de 3–4 mois. Les périodes sèches au cours des derniers mois de croissance favorisent une bonne production de calices, tandis qu'une précipitation ou une humidité trop abondantes sont susceptibles de faire baisser la qualité des calices. Les plantes de roselle à pigmentation anthocyanique sont capables de supporter les rudes environnements sahéliens mieux que les plantes à coloration jaune-verte

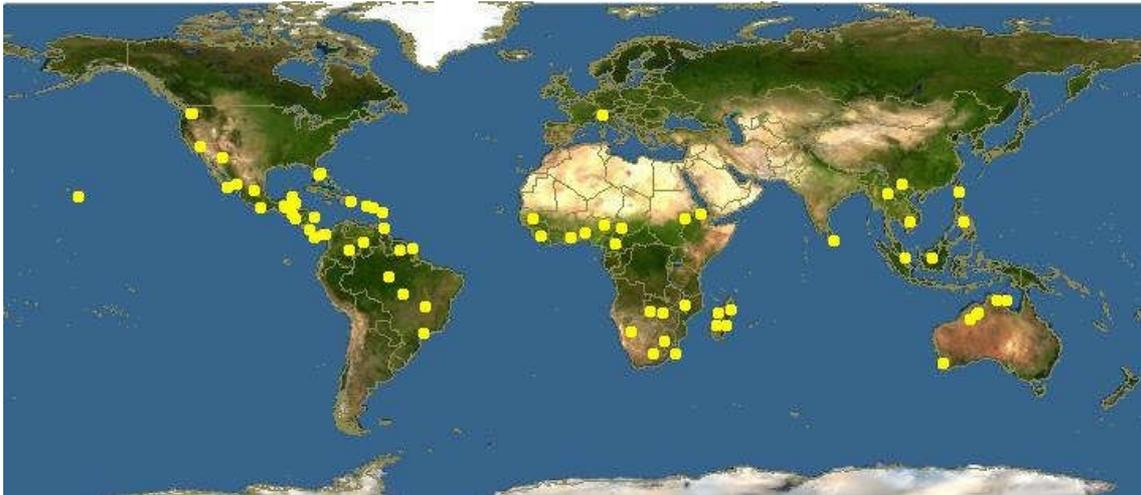


Figure 6 : Répartition géographique de *Hibiscus sabdariffa*

III .3.4.Nom vernaculaire

Français : Oseille de Guinée, Thé rose d'Abyssinie, Roselle , en anglais sorell ,
Arabe *Karkadé* Au Sénégal, elle est appelée en Wolof : *bissap* ; Sérère : *bondo*.

III.3.5.Classification phylogénique APG III

Embranchement : Spermaphyte .

Sous- embranchement : Angiosperme .

Série : Thalamiflore .

Classe : Dicotylédone .

Sous-classe : Dialypétale .

Ordre : Malvale .

Famille : Malvaceae .

Genre : *Hibiscus* .

Espèce : *Hibiscus sabdariffa* .

III.3.6. Constituions chimique

Beaucoup d'études ont été menées en vue de déterminer la composition chimique des feuilles, des calices, des graines et des racines de *Hibiscus sabdariffa*. Nous allons nous intéresser particulièrement aux calices .

Le calice : L'étude de la composition en élément minéraux des calices de *H. sabdariffa* mise en parallèle avec les concentrations maximales autorisées dans l'alimentation humaine révèle une forte variabilité en fonction de la zone géographique de production .

Les sucres présents dans les calices de *H. sabdariffa* sont constitués de glucose, fructose et saccharose. Le glucose, avec près de 40 % des sucres totaux, est le sucre majoritaire. Ils étaient également riches en acides organiques : les acides succinique, oxalique, tartrique et malique étaient présents à des concentrations respectives de (0,51 g ; 0,43 g ; 0,17 g et 0,12 g) par 100 g. (Wong et al., 2002). Les acides succiniques et oxaliques constituent les deux acides organiques majoritaires de *H. sabdariffa*. A eux deux, ils représentent 76 % des acides organiques totaux (Babalola et al., 2001). La présence de β -carotène et de lycopène à des concentrations respectives de 1,9 mg par 100 g et 164,3 μ g par 100 g de matière fraîche a été signalée dans des calices de *H. sabdariffa* (Wong et al., 2002), également des mucilages et des pectines (Tsai, 1995).

Lin et al. (2003) ont aussi montré dans les calices secs de *H. sabdariffa* la présence d'acide protocatechique et des composés polyphénoliques. Une des caractéristiques de *H. sabdariffa* est également sa richesse en anthocyanes (calices rouges) dont la teneur peut atteindre 1,5 g par kg de calices secs, teneur supérieure à la plupart des autres végétaux comestibles (Mazza et Miniati, 2000). Deux à quatre anthocyanes ont été identifiés selon les variétés de *H. sabdariffa* considérées (Du C.T et Francis, 1973 ; Palé et al., 2004). Il s'agit de la delphinidine-3-sambubioside ou hibiscine, la cyanidine-3-sambubioside ou gossypicyanine, la delphinidine-3-glucoside et la cyanidine-3-glucoside. La delphinidine-3-sambubioside est l'anthocyane majoritaire responsable de la couleur rouge violette des calices. Il représente 70 % de la teneur totale en anthocyanes (Francis, 1990).

III.3.7 . Indications et utilisations

Hibiscus sabdariffa est utilisé pour ses **calices, feuilles et graines** .

III.3.7.1. Utilisation alimentaire

Les calices, du fait de leur concentration élevée en acides, pectines, vitamine C et surtout en anthocyanes, constituent la partie de la plante la plus utilisée. Ils interviennent dans la production de boissons en Afrique et en Asie.

Cette boisson est connue selon le pays sous plusieurs appellations :

- **Bissap** au Sénégal, sa consommation est maximale pendant le mois du ramadan.
- **Da bilenni** au Mali, en Côte d'Ivoire et au Burkina Faso.
- **Boisson des pharaons** en Egypte.
- **Thé de Karkadé** au soudan.

Quant aux calices, ils sont utilisés comme tisane, confitures, gelées, boissons, aromatisant et colorant (**Seaforth et Tikasingh 2005**).

En Allemagne, les calices rouges sont de plus en plus utilisés comme colorants naturels dans la confiserie, l'extrait, sous forme de filtrat concentré ou de poudre séchée, est utilisé comme colorant dans l'industrie alimentaire ou pharmaceutique.

les colorants de *Hibiscus sabdariffa* sont préférés à ceux de la betterave, d'un rouge trop foncé, ou à ceux du raisin, moins éclatant, ou encore à ceux de la cochenille qui sont trop chers (**Pouget et al., 1 990**).

Les graines de *H. sabdariffa* permettent la fabrication d'huile qui est traditionnellement utilisée en cuisine au Tchad, en Tanzanie et en Chine. Elle peut entrer également dans la fabrication de savon et de produits cosmétiques (**McClintock et al., 2004**).

III.3.7.2 Utilisation médicale :

L'infusion d'hibiscus sabdariffa pourrait faire baisser la pression artérielle, diminuant ainsi le risque de maladies cardio-vasculaires. Les études phytochimiques ont montré la présence d'acides organiques, d'anthocyanosides, de flavonoïdes, de mucilages, de pectines et d'une huile essentielle (eugénol). Ces composants expliquent l'action anti-inflammatoire, adoucissante, antiasthénique, antispasmodique et légèrement laxative de l'hibiscus. On l'utilise pour apaiser l'inflammation des voies respiratoires, les spasmes gastro-intestinaux, lutter contre la fatigue. L'espèce a des vertus amincissantes, tonifiantes grâce à la vitamine C et diurétique. (flore de la Réunion – 2009).

Chapitre II :

Les Métabolites secondaires

I. le métabolite secondaire

I.1.Introduction

On désigne par « métabolite secondaire » toute substance présente chez un organisme et qui ne participe pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Ce concept est historiquement attribué à Kossel (Kossel, 1891) qui l'introduisit par opposition à celui de métabolites primaires, ces derniers étant directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme basal de la cellule. Chez les végétaux, ces composés secondaires regroupent plusieurs dizaines de milliers de molécules différentes, généralement rassemblés en superfamilles chimiques tel que les polyphénols, les terpènes et stérols, les alcaloïdes, les polycétides, etc. Outre la très grande diversité chimique qu'ils représentent, ces métabolites secondaires se caractérisent généralement par de faibles concentrations dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) ainsi que par leur stockage souvent réalisé dans des cellules ou organes dédiés.

Pour ce qui concerne leurs fonctions chez les plantes, les métabolites secondaires exercent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. Ils assurent des fonctions clés dans la résistance aux contraintes biotiques (phytopathogènes, herbivores, etc.) et abiotiques (UV, température, etc.). Sur le plan agronomique, le rôle de ces composés dans la protection des cultures est connu (résistance aux maladies cryptogamiques, aux infections bactériennes, à certains insectes), mais a été relativement peu exploité pour ce qui concerne le développement de variétés résistantes. Ces métabolites secondaires constituent, aujourd'hui, un des leviers d'une possible intensification écologique de l'agriculture, en substituant notamment l'usage d'intrants chimiques par des mécanismes de défense naturelle des plantes.

D'un point de vue pharmacologique, les métabolites secondaires constituent la fraction la plus active des composés chimiques présents chez les végétaux et on estime aujourd'hui qu'environ 1/3 des médicaments actuellement sur le marché contiennent au moins une telle substance végétale (Newman and Cragg, 2012). Cette efficacité pharmacologique des métabolites secondaires s'est traduite par le développement de médicaments majeurs sur les 30 dernières années, tel que le Taxotère (Sanofi-Aventis), ou la Vinorelbine (Pierre Fabre Médicaments) utilisés dans le traitement de certains cancers.

I.2. Synthèse de métabolites secondaires chez les végétaux

De nombreuses familles de métabolites secondaires ont fait l'objet de recherches actives lors des 30 dernières années et certains processus de synthèse sont aujourd'hui bien décrits, comme dans le cas des flavonoïdes (Pfeiffer and Hegedus, 2011; Tanaka *et al.*, 2008), des dérivés d'acide caféique (Weng and Chapple, 2010), des coumarines et furocoumarines, des terpènes et stérols (Lee *et al.*, 2012), ou de certains alcaloïdes (Jirschitzka *et al.*, 2012). Cependant, dans la mesure où les plantes élaborent des dizaines de milliers de composés secondaires, de nombreuses voies restent encore à découvrir aujourd'hui. L'organisation de la synthèse des métabolites secondaires est schématisée au travers de l'exemple des furocoumarines, molécules de défenses bien connues de la famille des Apiacées (céleri, persil, panais, etc.) (Bourgaud *et al.*, 2006). D'une manière générale les stress environnementaux, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, provoquent des cascades réactionnelles conduisant à la transcription de certains.

I.3. Fonctions des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires ne sont pas vitaux pour l'organisme mais jouent nécessairement un rôle important de part la machinerie enzymatique complexe nécessaire à leur production. Ils ont des rôles écologiques (allomone, phéromone...). Ces molécules furent sélectionnées au cours de l'évolution pour l'interaction qu'elles ont avec un récepteur d'un autre organisme. Elles représentent donc une grande source potentielle d'agents thérapeutiques (**Thomas, 2009**).

Ils pourraient jouer un rôle dans la défense contre les herbivores, et dans les relations entre les plantes et leur environnement : plusieurs composés phénoliques participent à la filtration des UV, les pigments floraux sont essentiels aux processus de pollinisation **Bruneton, J., (1999)**.

I.4. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont produits en très faible quantité, il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique en l'occurrence, les terpènes, les alcaloïdes, les composés acétyléniques, les cires, et les composés phénoliques (Cuendet, 1999 ; Vermerris, 2006). On distingue trois classes principales .

I.4.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des plantes, largement distribués possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou non d'autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes (Bahorun, 1997), allant de molécules phénoliques simples de bas poids moléculaire tels que, les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Martin et Andriantsitohaina, 2002). Les composés phénoliques sont des molécules hydrosolubles présentes dans tous les végétaux. Ils ont divers effets sur la physiologie végétale de part leurs actions antibactériennes et anti-fongiques. Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc...). Certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence (Adrian et al, 1991 ; Milane, 2004).

Les fonctions principales attribuées à ces composés chez les végétaux sont la protection contre les pathogènes et les herbivores ainsi que la limitation des dommages dus aux radiations UV. Dans ce cas, ils agissent par effet d'écran et par effet antioxydant (Lebham, 2005).

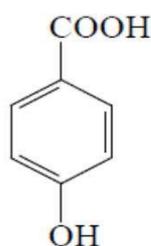
I.4.1.1. Classification des composés phénoliques

I.4.1.1.1. Les acides phénoliques

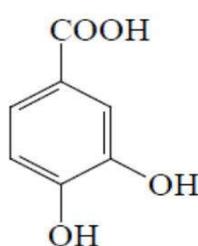
Ils ne possèdent pas de squelette flavane. Ils sont solubles dans l'éther. Ils peuvent être associés à la lignine, présents sous forme d'ester, ou bien localisés dans la partie de la feuille insoluble dans l'alcool (Barboni, 2006). Ils présentent des propriétés biologiques intéressantes: anti-inflammatoires, antiseptiques urinaire, antiradicalaires, cholagogues, hépatoprotecteurs, cholérétiques, immunostimulants (Bruneton, 1999). On distingue : Les dérivés de l'acide benzoïque (constitués d'un squelette à sept carbones). Les dérivés d'esters hydroxycinnamiques (constitués d'une structure de type C6-C3) (Barboni, 2006).

5
➤ Les acides benzoïques

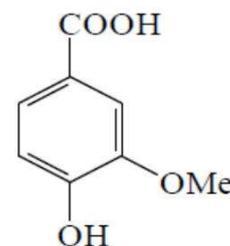
Les acides benzoïques sont formés d'un squelette à sept atomes de carbones. Ils sont principalement représentés par les acides p-hydroxybenzoïques, protocatéchiques, vanilliques, galliques, syringiques, salicyliques, o-hydroxybenzoïques et gentisiques. Les acides protocatéchiques et galliques (Figure4) ont probablement une origine et des fonctions différentes dans la plante. Le premier est très largement répandu, le second est plus rare, on le rencontre dans la nature surtout sous forme de dimère (Ribereau, 1968).



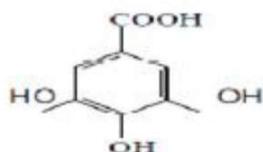
Acide p-hydroxybenzoïque



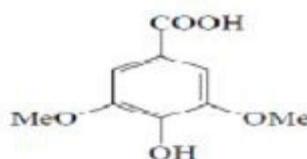
Acide protocatéchique



Acide vanillique



Acide gallique



Acide syringique

Figure 7 : Quelques dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.

➤ Les acides cinnamiques

Ces acides possèdent une structure du type C₆-C₃. Les composés les plus fréquents sont l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide fertarique et l'acide cinnamique (Ribereau, 1968).

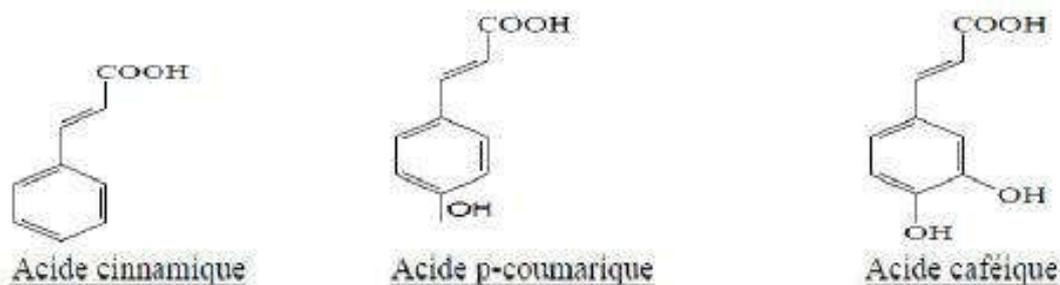


Figure 8: Quelques dérivés de l'acide hydroxycinnamique

I.4.1.1.2. Les coumarines

Les coumarines sont parmi les composés phénoliques les plus connus (Figure 6). Elles sont substituées en C-7 par un hydroxyle. La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6,7-di- et 6,7,8-trihydroxylées.

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Elles sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes (Igor, 2002).

Les coumarines sont connues par leurs activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes (au niveau du cœur), hypotensives, elles sont également bénéfiques en cas d'affections cutanées (Gonzalez et Estevez-Braun, 1997).

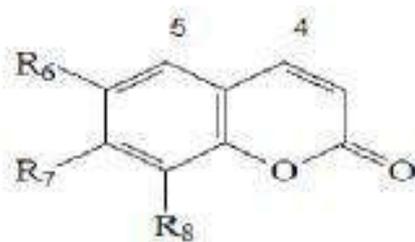


Figure 9 : Structure de base de coumarine

I.4.1.1.3. Les quinones

Ce sont des substances colorées et brillantes, en général rouges, jaunes ou orange et possédant deux fonctions cétones. On trouve les quinones dans les végétaux, les champignons, les bactéries. Les organismes animaux contiennent également des quinones, comme par exemple la vitamine K, qui est impliquée dans la coagulation du sang. Les quinones sont utilisées dans les colorants, dans les médicaments et dans les fongicides **(Kansole, 2009)**.

I.4.1.1.4. Les tanins

Les tanins sont des polyphénols que l'on trouve dans de nombreux végétaux tels que les écorces d'arbre et les fruits (raisin, datte, café, cacao...). Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation **(Hemingway, 1992)**.

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation. Des radicaux tanniques plus stables sont alors formés, ce qui a pour conséquence de stopper la réaction en chaîne de l'auto oxydation des lipides **(Cavin, 1999)**.

Les tanins sont divisés en deux groupes :

- Les tanins condensés, formés de proanthocyanidines (sous forme d'oligomères)
- Les tanins hydrolysables, esters des acides phénols et de glucose.
- Propriétés biologiques :

Ils découlent essentiellement de leurs propriétés à former des complexes avec les macromolécules. Les propriétés biologiques des tannins sont :

- astringente qui correspond à la précipitation des glycoprotéines. Action C'est la propriété la plus importante des tannins."
- Action antidiarrhéique : Les tannins vont imperméabiliser les couches externes de la peau et les muqueuses et surtout la muqueuse intestinale d'où cette action."
- Propriétés « vitaminiques P » qui correspondent à des propriétés veinotoniques communes à tous les polyphénols."

- Effet vasoconstricteur notamment au niveau des vaisseaux superficiels"
- Action antiseptique qui se traduit par des effets antibactériens et antifongiques."
- Piégeurs de radicaux libres comme tous les polyphénols (propriétés anti-oxydantes). En effet, ils vont inhiber la formation d'ions peroxyde et surtout la peroxydation des lipides et ils vont également inhiber la formation des ions superoxydes."

I.4.1.1.5. Les flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. On estime que 2 % environ du carbone organique photo-synthétisé par les plantes, soit quelques 10⁹ tonnes par an, est converti en flavonoïdes (Lhuillier, 2007).

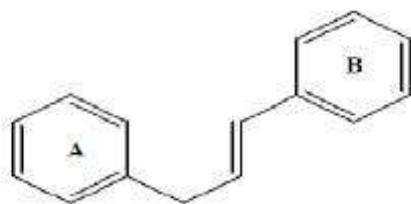
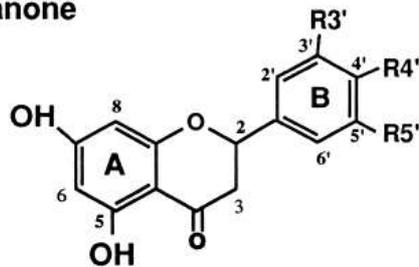


Figure 10 : Structure de base de flavonoïdes.

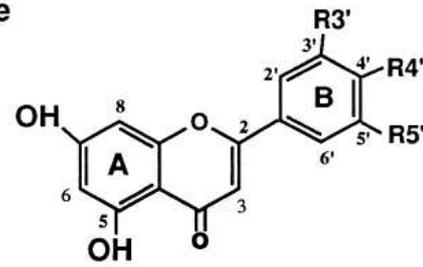
Chapitre II

Les Métabolites secondaires

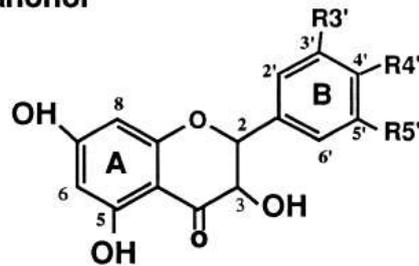
flavanone



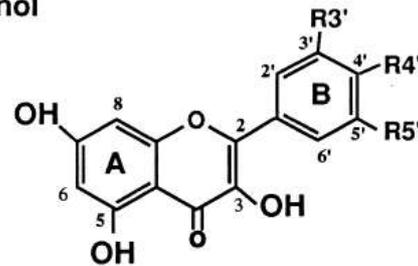
flavone



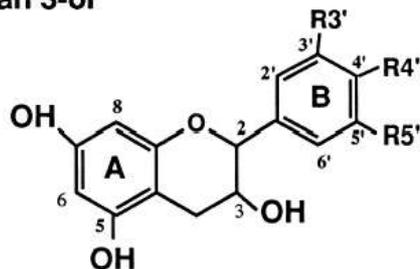
flavanonol



flavonol



flavan 3-ol



isoflavone

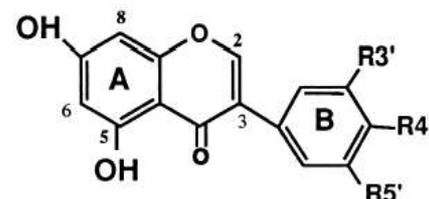


Figure 11: Biosynthèse des flavonoïdes

▪ Propriétés biologiques

La principale propriété initialement reconnue aux flavonoïdes est d'être "veino-actifs", c'est-à-dire capables de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance (Bruneton, 1999).

De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antiallergiques, antioxydantes et anti-cancéreuses. (Middleton et al, 1993).

La famille des flavonoïdes peut se diviser en six classes qui diffèrent par leurs structures chimiques: flavanols, flavones, flavonols, flavanones, isoflavones et anthocyanidines.

I.4.1.1.6. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos*, fleur et *Kuanos*, bleu violet) terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange. Leur présence dans les plantes est donc détectable à l'œil nu. A l'origine de la couleur des fleurs, des fruits et des baies rouges ou bleues, elles sont généralement localisées dans les vacuoles des cellules épidermiques, qui sont de véritables poches remplies d'eau. On trouve également les anthocyanes dans les racines, tiges, feuilles et graines. En automne, les couleurs caractéristiques des feuilles des arbres sont dues aux anthocyanes et aux carotènes qui ne sont plus masqués par la chlorophylle (**Bassas et al, 2007**).

▪ Structures

Leur structure de base est caractérisée par un noyau "flavon" généralement glucosylé en position C₃. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (**Bessas et al., 2007**).

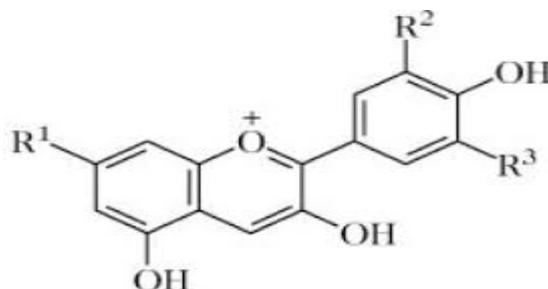


Figure 12: squelette de anthocyanes (Kueny-Stotz, M. (2008) Contribution à la chimie des flavonoïdes).

I.4.2. Terpénoïdes

Les isoprénoïdes sont des composés issus de la condensation d'unités de base à 5 carbones de type isoprène. On parle également de composés terpéniques ou terpenoïdes, l'unité monoterpène correspondant à des molécules à 10 carbones formées à partir de deux unités isoprènes.

De façon analogue à la famille des composés phénoliques, les isoprénoïdes regroupent à la fois des molécules de faibles poids moléculaires, volatiles et composants principaux d'huiles essentielles, et des molécules hautement polymérisées comme par exemple le caoutchouc. Cette voie de biosynthèse donne naissance à de très nombreux métabolites secondaires, mais participe également à la synthèse de composés comme le β -carotène, les chlorophylles, l'ubiquinone ou la plastoquinone, qu'on ne positionne généralement pas dans le métabolisme secondaire (**Harbone, 1998 ; Bruneton, 1999**).

▪ Importance des Terpénoïdes :

Constituants des huiles et des extraits Ingrédients dans les savons , parfums , médicaments ... (l'exemple le plus courant est le camphre disponible à l'état solide , introduit par l'Orient en Europe de puis environ 11 siècles). Agents naturels anti HIV, Insecticides, fongicides, antiappétants pour les insectes, Antitumoraux (taxol) ainsi que des agents modulateurs de la MDR.

Les sesquiterpènes lactones (Asteraceae, Apiaceae) sont particulièrement actifs

*Antifongiques.

*Cytotoxiques.

*Antibactériens.

*Antitumoraux.

* Anti-inflammatoires.

Les triterpènes entrent dans la production de médicaments stéroïdiques ayant Des propriétés : contraceptives, anabolisantes, anti-inflammatoires... (D .dehak k avrile 2013).

II. Activité antioxydants**II.1. Historique**

Radicaux libres, les espèces réactives d'oxygène (ERO), le stress oxydant et antioxydants deviennent des termes de plus en plus familiers pour les professionnels de la santé et même pour le grand public. Ces notions ne sont toutefois pas nouvelles puisqu'il faut rappeler que dans le milieu des années 50, R. Gerschman puis D. Hartman évoquaient déjà la toxicité de l'oxygène et la « free radical theory » pour expliquer le processus du vieillissement. En 1969, les Américains McCord et Fridovich isolent à partir de globules rouges humains un système enzymatique antioxydant la SOD, démontrant ainsi pour la première fois que notre organisme produit bel et bien des ERO dont il doit se protéger. Cette découverte sera le point de départ d'une intense recherche scientifique dans le monde entier sur le stress oxydant et les antioxydants (**Favier, 2003**).

II.2. Définition du stress oxydant

Dans les circonstances quotidiennes normales, des radicaux libres sont produits en permanence et en faible quantité et cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense, d'ailleurs adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces circonstances normales, on dit que la balance antioxydants/pro-oxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé stress oxydant (**Favier, 2003**).

Chaque individu ne possède pas le même potentiel antioxydant selon ses habitudes alimentaires, son mode de vie, ses caractéristiques génétiques ou l'environnement dans lequel il vit (**Diallo, 2005**). L'importance des dommages du stress oxydant dépend de la cible moléculaire, de la sévérité de l'effort et du mécanisme par lequel l'effort oxydant est imposé (**Aruoma, 1999**).

II.3. Définition d'un radical libre

La majeure partie de la toxicité de l'oxygène provient de la formation de radicaux libres, c'est-à-dire, selon la définition proposée par Halliwell et Gutteridge, d'espèces capables d'existence indépendante, contenant un ou plusieurs électrons non appariés dits électrons célibataires, ces radicaux peuvent se former par transferts mono-électroniques ou par scission homolytique de liaison covalente (**Bonnefont-rousselet et al., 2003**).

II.5. Définition d'un antioxydant

On désigne par antioxydant toute substance qui, lorsqu'elle est présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Diallo ,2005**).

II.5.1. Les antioxydants endogènes

La production physiologique d'ERO, est régulée par des systèmes de défense composés d'enzymes (SOD, CAT, hème oxygénase, peroxyrédoxine...), de molécules antioxydantes de petite taille (glutathion, acide urique, bilirubine, ubiquinone, ...) et de protéines (transferrine, ferritine, ...).

Enfin, un système secondaire de défense composé de phospholipases, d'ADN endonucléases, de ligases et de macroxyprotéinases empêche l'accumulation dans la cellule de lipides, d'ADN et de protéines oxydés et participe à l'élimination de leurs fragments toxiques (**Pincemail, 2002**).

II.5.2. Les antioxydants exogènes

Toutes ces défenses peuvent être renforcées par des apports exogènes en :

- **Médicaments**

Ils constituent une source importante d'antioxydants. Actuellement, les classes thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéïnémiques, les bêta bloquants et autres antihypertenseurs ont été évalués pour leurs propriétés anti-oxydantes.

- **Antioxydants naturels**

- ✓ **La vitamine C ou acide ascorbique**

C'est un puissant réducteur. Il joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E.

- ✓ **La vitamine E ou tocophérol**

Prévient la peroxydation des lipides membranaires *in vivo* en capturant les radicaux peroxydes.

- ✓ **Le sélénium**

Les effets bénéfiques de cet oligo-élément sur l'organisme ne sont connus que depuis un quart de siècle. Il neutralise les métaux toxiques (plomb, mercure). Il aurait aussi une action préventive sur certains cancers.

✓ Le β -carotène

Outre l'activité pro vitaminique A, possède la capacité de capter l'oxygène singulet.

✓ Les flavonoïdes

Les relations structure-activités anti-oxydantes des flavonoïdes et des composés phénoliques ont montré que l'activité anti-oxydante était déterminée par la position et le degré d'hydroxylation.

✓ Les tanins

Ces tanins sont des donneurs de protons aux radicaux libres lipidiques produits au cours de la peroxydation.

✓ Les coumarines

Ils sont capables de prévenir la peroxydation des lipides membranaires et de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes.

✓ Les phénols

Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (**Diallo, 2005**).

II.6. Mécanismes d'actions des antioxydants

Les mécanismes d'action des antioxydants sont divers, incluant le captage de l'oxygène singulet et, la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, la réduction de radicaux ou de peroxydes, la chélation des métaux de transition (**Diallo, 2005**).

II.7. Les maladies liées au stress oxydant

La plupart des maladies induites par le stress oxydant apparaissent avec l'âge, car le vieillissement diminue les défenses anti-oxydantes et augmente la production mitochondriale de radicaux.

En faisant apparaître des molécules biologiques anormales et en sur-exprimant certains gènes, le stress oxydant sera la principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, œdème pulmonaire, vieillissement accélère. Le stress oxydant est aussi un des facteurs potentialisant l'apparition de maladies plurifactorielles tel que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (**Favier, 2003**).

III. Activité Antimicrobienne**III.1. Effet antimicrobien**

Ces dernières années, il y a eu un grand intérêt pour la découverte de nouveaux agents antimicrobiens, due à une augmentation alarmante du taux des infections avec les microorganismes résistant aux antibiotiques.

Une des approches courantes pour la recherche des substances biologiquement actives est le criblage systématique des micro-organismes ou les plantes, qui sont des sources de beaucoup d'agents thérapeutiques utiles.

En particulier, l'activité antimicrobienne d'huiles et des extraits de plantes ont formé la base de beaucoup d'applications, y compris, pharmaceutiques, médecine, thérapie naturelle et la conservation des aliments (**Sagdic et al., 2002**).

Le premier rapport des propriétés antimicrobiennes des épices est apparu en 1880 dont lequel les activités de la moutarde, clou de girofle et de la cannelle et leurs huiles ont été décrites (**Prasad et Seenayya, 2000**).

III.2. Mécanisme d'effet antimicrobien des polyphénols

Il est sans doute très complexe, peut impliquer multiples modes d'actions tels que : l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes, la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer, l'inhibition du métabolisme microbien (**Milane, 2004**), dégradation de la paroi cellulaire, perturbation de la membrane cytoplasmique, se qui cause une fuite des composants cellulaires, l'influence de la synthèse de l'ADN et l'ARN (**Zhang et al., 2009**), des protéines des lipides, et la fonction mitochondriale (**Balentine et al., 2006**), ainsi que la formation des complexes avec la paroi (**Gangoué piéboji, 2007**).

Ces mécanismes ne sont pas des cibles séparées, certains peuvent être comme conséquence d'un autre mécanisme. Le mode d'action des agents antimicrobiens dépend également du type de micro-organismes et à l'arrangement de la membrane externe (**Shan et al. , 2007**).

III.3. Caractéristiques des souches bactériennes utilisées***Escherichia coli***

C'est l'espèce dominante de la flore aérobie du tube digestif. *Escherichia coli* est habituellement une bactérie commensale. Elle peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (**Nauciel, 2000**).

Le groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, dit K.E.S, sont rassemblés des *enterobacteriaceae* qui ont en commun les caractères suivants :

La réaction de Voges-Proskauer (VP) est généralement positive.

Ce sont des bactéries pathogènes .

Ces espèces sont souvent multi-résistantes aux antibiotiques.(avril 2000)

Proteus vulgaris

C'est une bactérie ubiquiste qui vit normalement à l'état de saprophyte dans l'eau et le sol humide ou sur les végétaux. Cette bactérie peLes proteus sont souvent en cause dans des infections urinaires (10 % des infections urinaires en ville), infections de plaie, surinfections diverses : tumeurs, voies respiratoires...ut vivre en commensale dans le tube digestif de l'homme et des divers animaux. . (Nauciel, 2000).

Considéré comme une bactérie pathogène opportuniste c'est le germe-type des infections hospitalières ou nosocomiales (AVRIL 2000).

Listiria sp

Les *Listeria*, nommées d'après Joseph Lister, qui les a découvertes, sont des bacilles de petite taille, mobiles à 20 °C (grâce à des flagelles), gram positif. Toutes les espèces sont catalases positives, non sporulées, et anaérobies facultatifs. Ce sont des bactéries ubiquistes qu'on trouve presque partout ; dans le sol, en épiphyte sur les végétaux, l'eau, etc. Très résistantes, elles peuvent survivre aux traitements de nettoyage-désinfection et ainsi persister dans les ateliers de production de l'industrie agroalimentaire. (François Denis al .2002).

Klibsilla pneumoniae

Le genre ***Klebsiella*** (klebsielles), de la famille des entérobactéries, comporte cinq espèces dont l'espèce-type est *Klebsiella pneumoniae* qui est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50 %).Ces bactéries causent jusqu'à 5 % des infections urinaires communautaires et 9 % des nosocomiales. (Elsevier Masson, 2007).

2eme PARTIE

Chapitre 1 :

Matériels et méthodes

I. Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué de fleurs sèches de *Hibiscus S* et des graines de *Lipidum S*, obtenus à partir des phytothérapeutes de wilaya de constantine .



Photos 03 : La plante *Hibiscus Sabdariffa*



Photos 04 : La plante *Lepidume sativum*

I.1. Analyse qualitatives

I.1.1. Criblage des métabolites secondaires

I.1.1.1. Criblage des Flavonoïdes

Se réalise à partir de 10 ml d'extrait hydrométhanolique reparti dans 3 tubes, le premier tube servant de témoin, les deux autres tubes servant les deux tests (test de Wilstater et test de Bate-smith) :

Test de Wilstater : HCl concentré + trois ou quatre tournures de Mg. Le changement de coloration est observé. (*Karumi, 2004*).

Test de Bate-smith : additionner dans le 3^{ème} tube quelques gouttes d' HCl concentré porté au bain marie trente minutes. L'apparition d'une coloration rouge dénoté la présence de leucoanthocyanes.

I.1.1.2. Criblage Des Quinones

Un gramme de matériel végétal sec et broyé est placé dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 heures. La présence de quinones libre est confirmée par l'ajout de quelque goutte de NaOH 1%, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet.

(*Ribérreau, 1968*)

I.1.1.3. Criblage des Anthraquinones

A l'extrait chloroformique de chacun des organes, on ajoute du KOH aqueux 10%. Après agitation, la présence d'antraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse au rouge.

(*Ribérreau, 1968*).

I.1.1.4. Criblage des Tanins

100 mg d'extrait hydrométhanolique sont dissout dans 25 ml d'eau distillée chaude puis additionné de trois à quatre gouttes de NaCl 10%. La solution ainsi obtenue est filtrée. Le filtrat est ensuite reparti dans quatre tubes à ainsi, le 4^{ème} tube servant de témoin :

- ✓ **Tube n°1** : addition de quatre à cinq gouttes de gélatine à 1%.
- ✓ **Tube n°2** : addition de quatre à cinq gouttes de gélatine salée (gélatine 1% + NaCl 10%)
l'apparition d'une précipitation par la gélatine salée signifie la présence de Tanins.
- ✓ **Tube n°3** : addition de quatre à cinq gouttes de FeCl₃ en solution hydrométhanolique.

La couleur vire au bleu noirs en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchique (*Rizk, 1982*).

I.1.1.5. Criblage des coumarines

Protocol: Test de détection: 2 g de matériel végétal en poudre mélangés à 10 ml de CHCl₃. Après un chauffage de quelques min et une filtration, les extraits chloroformiques sont soumis à une CCM, et le solvant étant le mélange toluène / AcEt (36:14). La visualisation du chromatogramme, après migration, se fait à 365 nm.

I.1.1.6. Criblage des Stérols et Triterpènes

Dépigmenter 100 mg d'extrait hydrométhanolique par addition de 10 ml de cyclohexane et agitation pendant 5 min. dissoudre le résidu dépigmenté dans 10 ml de Chloroforme.

Sécher la solution obtenue sur Na₂SO₄ Anhydre, puis filtrer. Répartir le filtrat dans quatre tubes à essais et le 4^{ème} tube servira de témoin. **Tube n°1** : test de Salkowski : incliner le tube à 45°, ajouter 1 à 2 ml de H₂SO₄. Le changement de la coloration est noté immédiatement. Agiter le mélange légèrement et noter le changement graduel de coloration : une coloration rouge indique la présence des Stérols insaturés.

Tube n°2 : test de Libermann-Burschard : additionner trois gouttes d'Anhydride acétique puis agiter légèrement. Ajouter une goutte de Na₂SO₄ concentré. Le changement de la coloration est observé pendant un heur : une coloration bleu-vert indique la présence des Stéroïdes tandis que rouge-violet à rose dénote la présence de triterpène.

Tube n°3 : test de Badjet-Kedde : additionner quelques grains d'Acide picrique. L'apparition d'une coloration orange est due aux stéroïdes lactoniques. (*Bruneton, 1993*).

I.2.Préparation de l'extrait brut l'espèce *Lepidum Sativum L* et *Hibiscus Sabdariffa L*

La quantité du matériel végétal obtenue (640g) de *Hibiscus S* et (500)de *Lepidum S* a subi une macération dans un mélange hydroalcoolique (Méthanol / eau : 70 / 30 : V / V).

qui est porté à ébullition, le tout par la suite est filtré sur papier Whatman, l'extraction est refaite plusieurs fois avec renouvellement du solvant. Le solvant est éliminé du filtrat par évaporation rotative dans un rotavapor (BÜCHI).



Figure14 : Filtration de l'extrait par Rotavapeur de
L'espèce *Hibiscus Sabdariffa* .

Figure15 : Filtration de l'extrait par Rotavapeur de
L'espèce *Lepidum Sativum*.

I.3. Etude analytique par chromatographie sur couche mince(CCM)**Protocole expérimentale**

On a utilisé 3 systèmes solvants (S1, S2, S3) de différentes polarités pour mieux connaître le contenu flavonique de ces extraits méthanolique de l'espèce *Lepidum S. et Hibiscus S.*

Système 1: Butanol / Acide acétique / Eau (6:1,5 : 2,5).

Système 2: Acétate d'éthyle / Méthanol / Eau (10: 1: 0,5).

Système 3: Acétate d'éthyle / 2-Butanone /Acide formique (5: 3 :1 :2).

Visualisation sous UV à longueur d'onde: 254 nm et 366 nm. On prépare la phase mobile et on met dans la cuve chromatographique et on ferme la cuve avec un couvercle pour la saturation par la vapeur des solvants.

Chaque constituant migre d'une certaine distance, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (Rf) :

$$Rf = \frac{\text{Distance de la tache}}{\text{Distance du front du solvant}}$$

Chaque tache correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin.



Photo 05: l'observation des CCM en UV 254 et 366 nm et en lumière blanche



Photo 06: HPTLC : high-performance thin layer chromatography

II. Evaluation des activités biologiques

II.1. Activité antibactérienne

Le principe de la méthode repose sur la diffusion du composé antibactérienne en milieu solide (MHA, Chapman..) dans des boites de pétrie, après un certain temps de contact entre le produit et les microorganismes cible. L'effet du produit antibactérien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition. (Hellal, 2011).

L'évaluation de l'activité antibactérienne de notre extrait de la plante *Hibiscus sabdariffa* et de la plante *Lepidume sativum* ont été faite sur 4 souches bactériennes.

Les microorganismes testés sont: Escherichia coli

: Gram négative.

Proteus vulgaris : Gram négative.

Klebsiella pneumoniae : Gram négative.

Listeria : Gram positive .

On a réalisé l'activité au niveau de laboratoire 13 de Ecologie .

Protocole expérimentale

Des disques de 5 mm de diamètre, préparés avec des papiers Whatman n°1 puis sont placés dans l'autoclave pendant 20 min à 120°C, et stockés à une température ambiante (le tube à essai est hermétiquement fermé), ces disques stériles sont plongés dans l'extrait hydrométhanolique.

Dans des boîtes de pétri stériles le milieu Muller Hinton est coulé puis laissé 15 min pour se solidifier. Les bactéries sont déposées etensemencées à l'aide d'un écouvillon stérile, l'ensemencement s'effectue de telle sorte pour assurer une distribution homogène des bactéries.

Les disques remplis d'extrait sont déposés à la surface de la gelose contaminée et l'antibiogramme est fixé au milieu de la boîte de pétrie. L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'une zone d'inhibition de la croissance microbienne produite autour des disques après 24 heures d'incubation à 37°C (Treki, 2002).



Photo 07 : Tests des activités antibactériennes

II.2. Activité antioxydante

Les antioxydants sont définis comme étant des substances qui peuvent retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques (McAnalley, 2003), ce sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs (Vansant,G. 2004).

Plusieurs substances pouvant agir en tant qu'antioxydants in vivo ont été proposées, elles incluent le bêta-carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E, etc. ...

Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (**Hampson, 1999**).

II.2.1.Méthodes de détermination de l'activité antioxydante

Il existe une grande diversité de méthodes physico-chimiques pour évaluer l'activité antioxydante des extraits naturels. Plusieurs méthodes s'intéressent à l'analyse des étapes distinctes du processus d'oxydation comme par exemple la mesure :

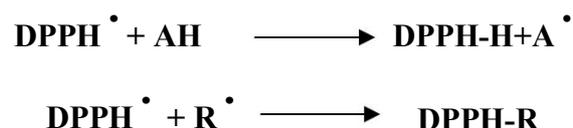
- a) Affaiblissement du substrat, et /ou la consommation de l'oxygène au cours de l'oxydation.
- b) La formation des produits d'oxydation ;
- c) La capacité à piéger les Radicaux libres en différentes phases.

Citons quelques méthodes connues :

- ✓ Méthode TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity)
- ✓ Méthode de SR - TBA (Substances Reactive Acid Thiobarbuturic)
- ✓ Méthode par résonance paramagnétique électronique (RPE)
- ✓ Test DPPH (1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)
- ✓ Test de Crocine
- ✓ Détermination de l'indice de peroxyde (IP)
- ✓ Détermination des diènes conjugués
- ✓ Test DPPH (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl)

Le potentiel antiradicalaire d'une substance peut être évalué à l'aide d'une méthode colorimétrique en utilisant des radicaux de substitution tels que le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl appelé DPPH.

En effet, à température ambiante et en solution, le radical DPPH • présente une coloration violette intense. Son passage à la forme non radicalaire, après saturation de ses couches électroniques s'accompagne d'une disparition de la coloration violette (figure 18).



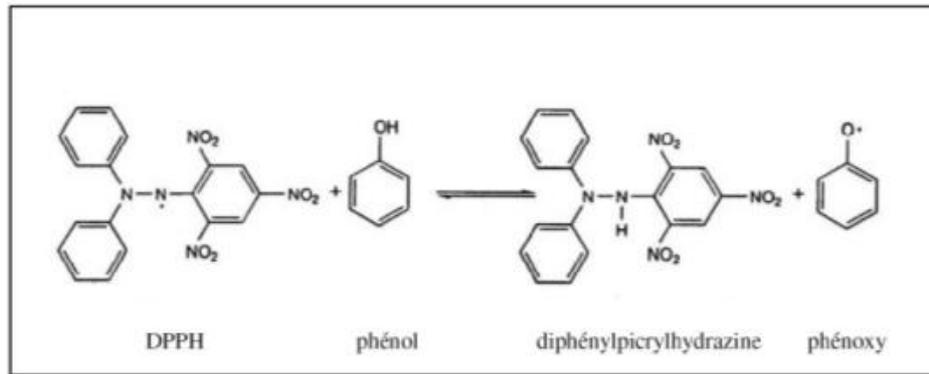


Figure 16 : Réduction du DPPH par le phénol (Hilali, 2006).

Par cette méthode, on considère que l'activité antioxydante n'est autre que la capacité des antioxydants d'agir comme piègeurs des radicaux libres. Ils agissent en transférant un atome d'hydrogène ce qui conduit à la réduction du DPPH au cours de la réaction et à un changement de coloration dans la solution initiale qui devient jaune pâle. L'avancement de la réaction est suivi par spectrophotométrie à 517 nm (Linssen, 2002).

II.2.2. Evaluation de l'activité antiradicalaire par le test de DPPH

Protocole expérimental

a. Préparation de la solution DPPH

0.004g de DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$; Mr : 394.33), est solubilisé dans 100 ml de MeOH absolu pour avoir la concentration de 0.4g/l.

b. Préparation des solutions mères de concentration 5mg/ml

On mélange 0.05g de l'extraits des plantes (*Lipidum S et Hibiscus S*), avec 10 ml de MeOH absolu dans 02 tubes a essais (Solutions mères).

c. Préparation des dilutions des extraits

L'expérience effectuée sur 5 concentrations différentes d'échantillon de l'ordre décroissant, dilués dans le méthanol Tableau 4 :

Tableau 1 : Les différentes concentrations des extraits

Concentration finale (mg/ml)	V de SM (ml)	V de MeOH (ml)
3	3	2
2	2	3
1	1	4
0.5	0.5	4.5
0.25	0.25	4.75

- ✓ On mélange 03ml de la solution méthanolique du DPPH préparé avec 30 μ l de chaque extrait.
- ✓ Laisser a l'abri de la lumière et a température ambiante pendant 30 minutes.
- ✓ On mesure l'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre à 517nm.
- ✓ Finalement on mesure l'absorbance de chaque concentration par rapport à un blanc constitué uniquement par le méthanol pur (30 μ l) et le DPPH (3ml).
- ✓ On trace la courbe de la cinétique de disparition du DPPH en présence de l'échantillon à tester en fonction du temps pour déterminer le temps de stabilisation de la réaction et pour effectuer la lecture de l'absorbance du produit.



Figure 17: Solution methanolique DPPH



Figure 18: Le DPPH poudre

II.3. Dosage des composés phénoliques totaux

A partir de la solution mère (1 mg/ml) des extraits méthanoliques des graines de lepiduim s.et fleurs de hibiscus s Nous avons préparé deux répétitions d'une même concentration (125 µl) avec la méthode suivante :

Une prise de 125 µL de l'extrait dilué (SM) est mélangée avec 500 µL d'eau distillée et 125 µL de réactif de Folin-Ciocalteu. Après une agitation vigoureuse du mélange suivie d'un repos de 3 minutes, une prise de 1250 µL de Na₂CO₃ de 2 à 7% est additionnée. Enfin le mélange obtenu est ajusté par de l'eau distillée à 3 ml.

Après un repos de 90 minutes à l'obscurité, la lecture de l'absorbance est effectuée à une longueur d'onde de 760 nm (**Heilerová et al, 2003**).

La gamme étalon est préparée avec de l'acide gallique a des concentrations variables de 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg.l⁻¹. Les teneurs en polyphénols sont exprimées en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg/EAG.g⁻¹ MS), (**Singleton et al, 1999**).

Chapitre II :

Résultats et discussion

I.1. Métabolites secondaires :**I.1. 1. Criblage des Flavonoïdes**

La mise en évidence des flavonoïdes dans l'extrait méthanolique de les plantes (*lipidumS et hibiscus S*) est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge intense en contact avec les tournures de Mg.

Tableau 02: Résultats de criblage des flavonoïdes.

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L.sativum</i>	Test de Wilstater Extrait m étherique	Graines	+++
<i>H.sabdariffa</i>	+	fleurs	+++
	HCl Cc.et Mg		

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L.sativum</i>	Test de Bate-smih : Extrait Methanolique	Graines	+++
<i>H.sabdariffa</i>	+	fleurs	+++
	HCL Cc Bain marie 30 min		

I.1.2. Criblage des Quinones

Le criblage phytochimique des Quinones a montré que les espèces étudiées (*Lipidum S* et *Hibiscus S*). ne contiennent pas des quinones (Tableau 12)

Tableau 03: Résultats de criblage des Quinones

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L. sativum</i>	Extrait etherique + NaOH	Graines	-
<i>H. sabdariffa</i>		fleurs	-

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.1.3. Criblage des Anthraquinones

Le réactif KOH utilisé pour la détection des Anthraquinones a démontré que Les espèces (*Lipidum S et Hibiscus S*) . ne contient pas des anthraquinones.

Tableau 04: Résultats de criblage des Anthraquinones

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L.saivum</i>	Extrait Methanolique et eau distillée +	Graines	-
<i>H.sabdariffa</i>	KOH	fleurs	-

I.1.4. Criblage des Tanins

Les tanins sont présents avec une intensité importante dans l'extrait méthanoliques. Sa présence est confirmée par une réaction positive avec la solution de chlorure ferrique en donnant une coloration bleu verdâtre dans L'espèce *Lipidum S* , il s'agit donc des tanins catéchiques. Et l'espèce *Hibiscus S* ne contient pas de les tanins .

Tableau 05: Résultats de criblage des Tanins

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L.sativum</i>	Extrait Methanolique +	Graines	+++
<i>H.sabdariffa</i>	gélatine à 1%	fleurs	-

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L.sativum</i>	Extrait Methanolique +	Graines	+++
<i>H.sabdariffa</i>	gélatine salé (gélatine à 1% +NaCl à 10%)	fleurs	-

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L. sativum</i>	Extrait Methanolique +	Graines	+++
<i>H.sabdariffa</i>	Fe Cl 3	fleurs	-

Réaction fortement positive : +++

Réaction moyennement positive : ++

Réaction faiblement positive : +

Réaction négative : -

I.1 .5. Criblage des Anthocyanes

Les tests phytochimiques réalisés montre la présence des anthocyanes dans les espèces (*Lipidum S et Hibiscus S*). L'apparition d'une couleur rouge qui vire au bleu-violacé par l'addition d'ammoniac a confirmé leur présence.

Tableau 06: Résultats de criblage des Anthocyanes

Espèce	Tests	Organes	Réactions
<i>L. sativum</i>	Extrait Methanolique +	Graines	++
<i>H.sabdariffa</i>	HCl Cc (Incubation 30 min)	fleurs	+++

Photo 08 : criblages des polyphénole

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -

I.1 .6. Criblage des coumarines

L'apparition d'une fluorescence sous une lumière ultra-violet indique la présence des coumarines uniquement dans les tiges mais à une faible intensité.

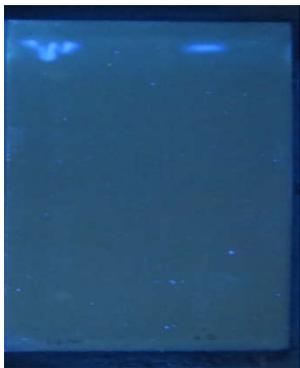
Tableau 07: Résultats de criblage des coumarines.

Espèce	Organes	Résultats
<i>Hibiscus sabdariffa</i>	Fleurs	++
<i>Lipidium sativum</i>	Grains	+

Résultat positive: + (présence)

Résultat négative: - (absence)

Tableau 08: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce *Hibiscus sabdariffa L* et *lepidume sativumL*.

Espèce	Photographie du résultat	
	Observation par UV 254	Observation par UV 366
<i>Hibiscus sabdariffa</i>		
<i>Lipidium sativum</i>		
	HB LS	HB LS

I.2 .è. Criblage des stérols et triterpènes

Le test positif des stérols et triterpènes nous a montré leur présence dans chaque partie de la plante avec une apparition d'un anneau rouge brun et une couche surnageant de couleur verte.

Tableau 09: Résultats de criblage des triterpènes et stéroïdes

La plante	Teste	Réaction
Hibiscus Sabdariffa	H ₂ SO ₄ (pendant h1)	+++
	Gélatine %	++
	Acide pecrique	-

<i>Lepidium sativum</i>	Tests	Réaction
<i>Lepidium sativum</i>	H ₂ SO ₄ (pendant h1)	+++
	Gélatine 10%	++
	Acide pecrique	++

Réaction fortement positive: +++

Réaction moyennement positive: ++

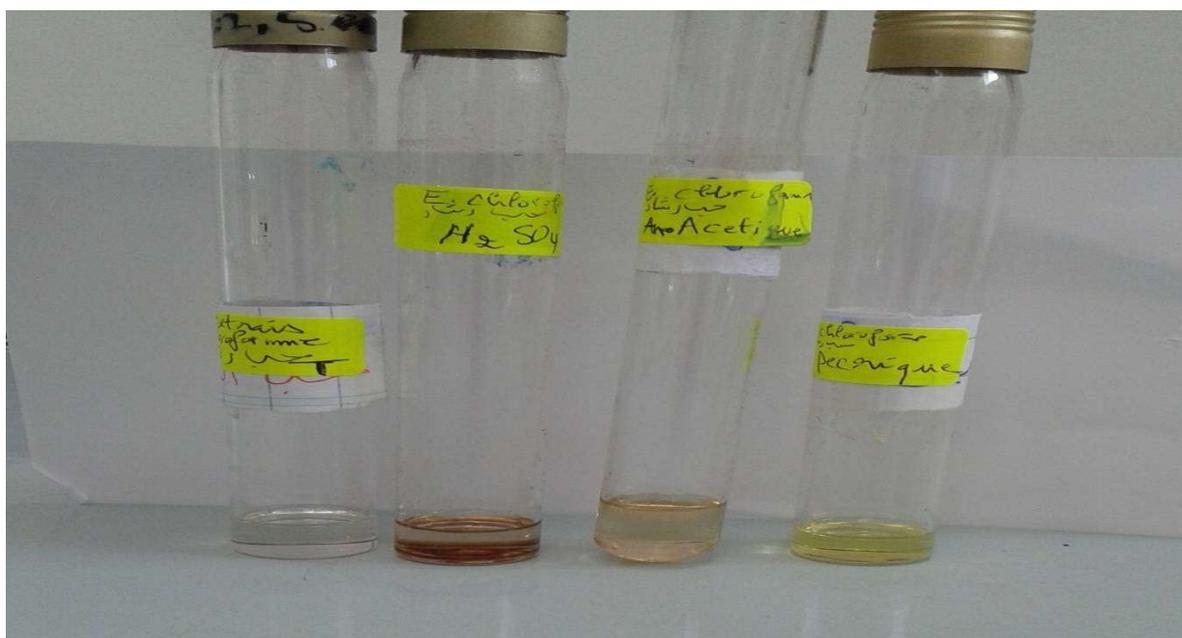
Réaction faiblement positive: +

Réaction négative: -



terpens de

Figure 19 : criblage des *l'hibiscus sabdariffa*



terpens de

Figure 20 : criblage des *lepidume sativum*

Duscusion :

D'après les résultats du screening phytochimique nous constatons que :

Aucun de nos extraits ne contient ni de quinones ni d'antraquinones, tandis que ces même extraits des fleures *Hibiscus sabdariffa L* et *Lepidume S* contiennent des flavonoïdes types flavan3,4diols, flavonols, flavanones, des tannins et des coumarines en quantités très importantes par rapports aux autres métabolites secondaires.

En contre partie, nos résultats viennent confortés ceux de (Seydou TANGARA., 2003) qui ont trouvé que l'extrait méthanolique du *Hibiscus Sabdariffa L* et riche en Antocynes ,flavonoïde ,tannis ,terpens et les coumarine .

I.3.Obtention des extraits secs

Les extractions des différents composés phénoliques les plus abondant dans notre plante nous permis de déterminé la quantité de chaque extrait notamment les extraits méthanoliques, acétate d'éthyle et 1-butanol par rapport à 40 g de matériel végétal sec et broyé. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 22:

Tableau 10: Les extraits obtenus à partir des deux parties de la plante.

Les extraits	Les solvants utilisés	Quantité (g)	
		H.sabdariffa	L.sativum
Extrait brut	Méthanol	135,03	45,32

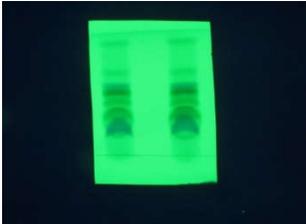
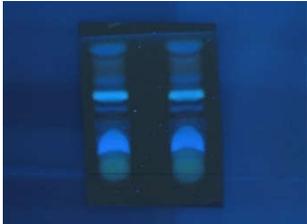
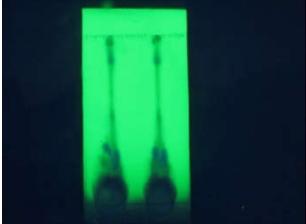
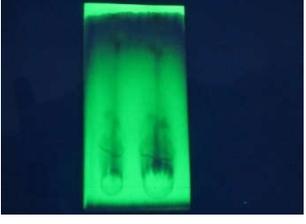
Les résultats obtenus pour les extraits méthanoliques, montrent que la quantité la plus élevé est celui de l'extrait des fleurs de *Hibiscus sabdariffa L*(135,03g) qu'a des grains de *Lepidume sativum* (45,32)g.

I.4. Les analyses chromatographique

I. 4.1. Chromathographie sur couche mince

CCM de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

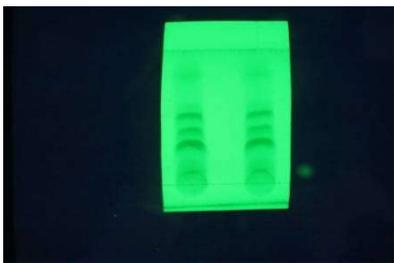
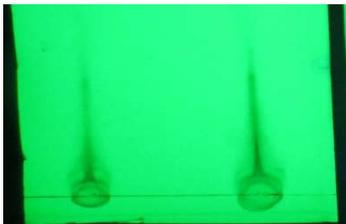
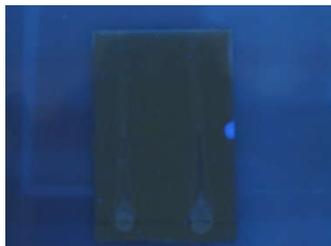
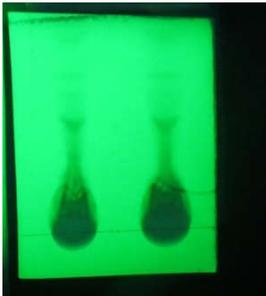
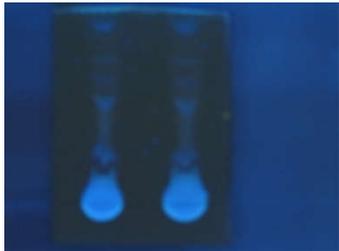
Tableau 11: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce *Hibiscus sabdariffa* L.

Système solvant	Photographie des résultats	
	Observation par UV 254	Observation par UV 366
S1:Butanol /Acide acétique /eau 6/1,5/2,5		
S2 :Acétate d'ethyle / Méтанол/eau		
S 3 :Acétate d'ethyle / 2- Butanol/ Acide formique 5/3/1/1		

L'étude analytique des extraits méthanolique par CCM de l'espece *Hibiscus sabdariffa* L .on a utilisé les systèmes suivants (Tableau 23) visualisée avec la lompe UV : 254 et 366 nm, montre que la fleurs d'*hibiscus Sabdariffa* L. sont riche en métabolites secondaire surtout flavonoïdes et terpènes ce qui confirme les résultats obtenu par les criblages précédents. La CCM de l'extrait hydromethanolique de *Hibiscus Sabdariffa* L.

CCM de l'espèce *Lepidume Sativum* L.

Tableau 12: Résultats des plaques de CCM prise après la révélation à lumière UV (254 nm-366nm) pour des extraits de l'espèce *Lepidume sativum* L.

Système solvant	Photographie des résultats	
	Observation par UV 254	Observation par UV 366
S1 :Butanol/Acide Acétique /eau 6/1.5/2.5		
S2 :Acétate d'ethle/méthanol/eau 10/1/0.5		
S3 :Acétate d'ethyle/butanol/Acide formique 5/3/1/1		

S 1 : Butanol /Acide acétique / eau :



Figure 21 : chromatogramme photographié

S2 : Ac étate d'ethyle/Méthanol/Eau



Figure 22 :chromatogramme photographié

Discution :

La coloration jaune des taches, oriente vers les flavonoïdes, et la coloration rouge vers les anthocyanes et la coloration noire des taches, oriente vers des substances polyphénoliques, spécifiquement les tanins.

La coloration violette et bleue des taches visible à l'oeil nu oriente vers les anthocyanes.

Les figures 29,30 permettent une meilleure appréciation des différents chromatogrammes.

II. Dosage des polyphénols

Le dosage des phénols totaux a été effectué par la méthode spectrophotométrique adaptée de Singleton et Ross (1965) avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par gramme de la matière végétale sèche (mg GAE/g), en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage tracée de l'acide gallique.

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique est représentée dans la figure 23 :

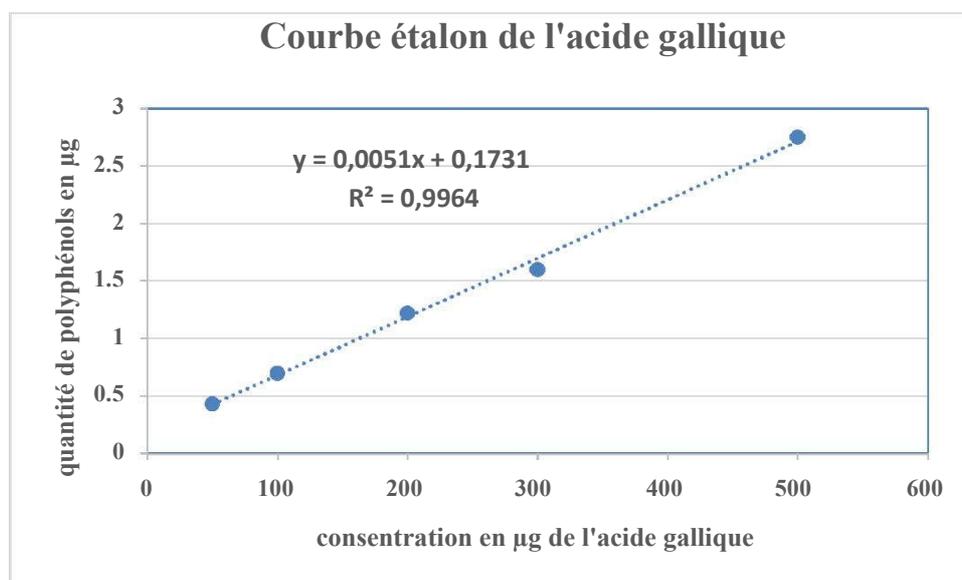


Figure 23 : La courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

La valeur de la densité optique (DO) mesurée de chaque échantillon est mentionnée dans le tableau :

Tableau 13: La DO des EMHS et EMLS.

		EMHS	EMLS
DO (nm)	1 ^{ere} expérience	0,911	0,856
	2 ^{eme} expérience	0,257	0,274

Le pourcentage des composés polyphénoliques indiqué dans le tableau 27 est calculé selon la relation suivante :

$$Y = 0.0051X + 0.1731$$

Tableau 14 : Le taux des polyphénols totaux calculés des feuilles et graines.

	Mp (mg)	DOext (nm)	Quantité de polyphenols en (mg/g d'extrait)
EMHS	1	0,911	444,5
	2	0,856	417
EMLS	1	0,257	117,5
	2	0,274	126

La figure 24 montre les résultats de la quantité des polyphénols, ces quantités sont exprimées en mg d'équivalents d'acide gallique par gramme d'extrait.

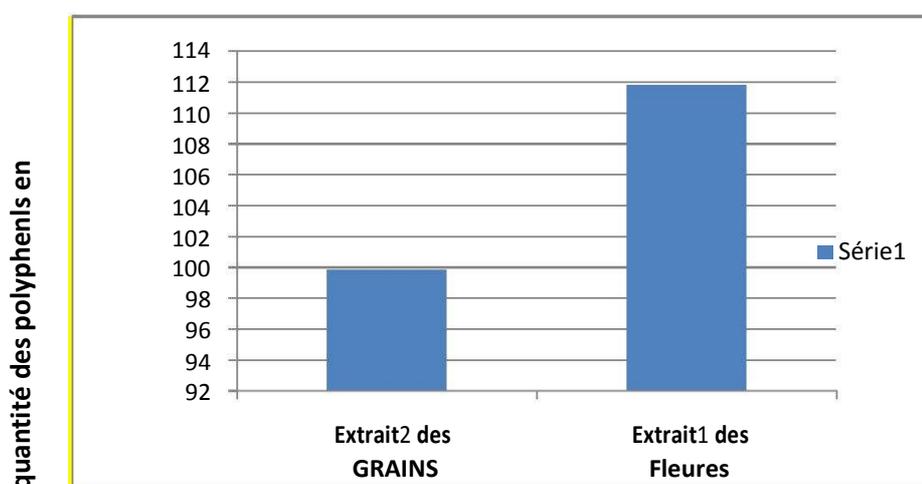


Figure 24 : Teneur en polyphénols totaux(en mg/g d'extrait)

Ces résultats indiquent que la richesse de la plante en polyphénols est importante.

On remarque que la teneur en polyphénol la plus élevée a été enregistrée avec les deux extraits EMHS et EMLS. Mais elle est supérieure dans l'extrait EMHS ce qui est en accord avec les résultats de l'activité antioxydante où l'extrait EMHS a montré une meilleure activité antioxydante.

Les taux de polyphénols totaux existant dans les extraits méthanoliques de feuilles et fruits calculés sont présents dans le tableau 15 :

Tableau 15 : Les taux de polyphénols totaux existant dans les EMHB et EMLS

Echantillon	Taux de polyphénols
EMHB	430,75 ± 19,44
EMLS	121,75 ± 6,01

Il apparaît que les deux extraits sont riches en polyphénols totaux

III. Evaluation des activités biologique

III.1. Activité antibactérienne

Tableau 16 : Taux d'inhibition de l'extrait hydrométhanolique de la plante *Hibiscus sabdariffa* .

Souche bactériennes	Diamètre de la zone d'inhibition (cm)			
	La dilution de l'extrait de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.			
	1mg/ml	0,75mg/ml	0,5 mg/ml	0,25mg/ml
<i>Escherichia coli</i>	1.6	1.5	1.2	0.9
<i>Proteus vulgaris</i>	1.3	1	0.8	0.6
<i>Klibseilla pneumoniae</i>	1.9	1.7	1.4	1.2
<i>Listeria sp</i>	1.6ez	1.3	1.1	0.6

(Diamètre du disque est inclus) les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ±SD.

Tableau 17: La sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les extraits du *Hibiscus sabdariffa* L .

Souches bactériennes	La Sensibilité
<i>Escherichia coli</i>	+++
<i>Proteus vulgaris</i>	++
<i>Klibseilla pneumoniae</i>	+++
<i>Listeria sp</i>	++

Non sensible (-), Sensible (+), Très sensible (+ +), Extrêmement sensible (+++)

Tableau 18 : Taux d'inhibition de l'extrait hydrométhanolique de la plante *Lepidume sativum* .

Souche bactérienne	Diamètre de la zone d'inhibition (cm)			
	La dilutions de l'extrait <i>Lepidume sativum</i> L			
	1mg/ml	0.75mg/ml	0.5mg/ml	0.25mg/ml
<i>Listeria Sp</i>	0.45	0.3	0.27	0.1

Tableau19 : La sensibilité des souches bactériennes vis-à-vis les extraits du *Lepidume sativum* L .

Souches bactériennes	La Sensibilité
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Klibseilla pneumoniae</i>	-
<i>Listeria sp</i>	+

Non sensible (-), Sensible (+), Très sensible (+ +), Extrêmement sensible (+++).

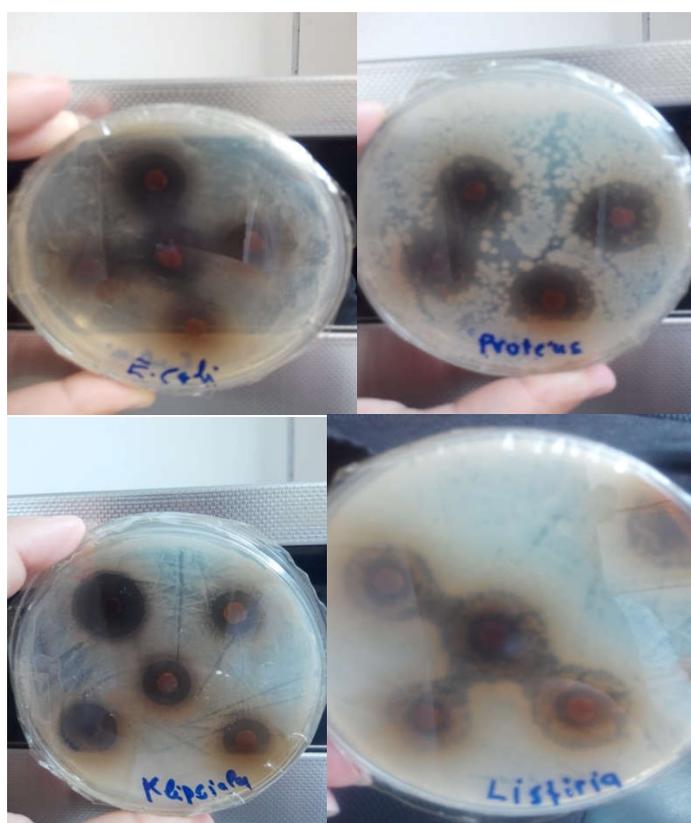


Figure25 : l'effet de l'extrais *H.sabdariffa* L sur les souche bactérienne



Figure26 :L'effet de l'extrais L.sativum L sur la bacterie *listiria* sp

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne influe aussi les résultats (Natarajan *et al.*, 2005) et (Fazeli *et al.*, 2007) ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques de Hydro-méthanoliques de *Hibiscus sabdariffa* et que la méthode de diffusion en milieu gélosé .

Plusieurs classes de polyphénols telles que les acides phénoliques, flavonoïdes et les Terpenes servent de mécanisme de défense des plantes contre les micro-organismes, les insectes, et les herbivores pathogènes (Falleh *et al.*, 2008). Les Polyphénols, sont des substances antibactériennes importantes.

Nous avons constaté qu'il n'y a pas une corrélation entre le contenu phénolique des extraits du *Hibiscus sabdariffa* et l'activité antibactérienne .

Nos résultats n'indiquent que le *Hibiscus sapdariffa L* est une plante nécessite une importance dans ce domaine, parce que l'extraits de cette plante a montré une activité forte contre *Escherichia coli* (1.6 cm), *proteus vulgaris* (1.3 cm), *Lesteria Sp* (1.6 cm) ,et *Klebseilla pneumoniae* (1.9 cm).

En contre partie, nos résultats viennent confortés ceux de (Shan *et al.*, 2003) qui ont trouvé que l'extrait méthanolique du *Hibiscus sabdariffa* a une activité contre *Escherichia coli*, *Lesteria Sp* , *Klebseilla pneumoniae* (20 mm).

Nos résultats n'indiquent que la plante *Lepidume Sativum* est une plante qui ne nécessite pas une importance dans ce domaine , n'a aucune activité contre les souches (*Escherichia coli* ,*porteus vulgaris* ,*klebsilla pneumoniae*)

, tandis que celui s'est révélé actif contre *Listeria sp. aureus* avec une zone d'inhibition égale à 0.4 cm

En conclusion, Les présents résultats n'ont pas révélé une synergie d'action, entre les extraits méthanoliques des deux plantes, par contre (Shan *et al.*, 2003) ont observé un effet antimicrobien fort d'un mélange d'extrait éthanolique du *Hibiscus sabdariffa L* et celui de la réglisse qui peut être un résultat des effets synergiques des composés spécifiques dans ce mélange d'extraits. Et La richesse du *lepidume sativum L* en flavonoïdes n'a pas amélioré son effet antibactérien, peuvent être attribuées aux plusieurs facteurs tels que les facteurs inhérents (variété, conditions ambiantes, facteurs écologiques, variations saisonnières), les méthodes d'extraction , préparation de l'extrait, solvant utilisé, la sensibilité des bactéries , et finalement l'organe de la plante utilisé

(Natarajan *et al.*, 2005). En conclusion, la différence de l'activité anti-oxydante et antimicrobienne des extraits des deux plantes semble être directement lié la diversité quantitative et/ou qualitative des composés qui présents dans ces extraits.

III.2. Activité antioxydante :

Selon les mesures effectuées sur les deux extraits EHS et ESL de les plantes *H.sabdariffa* *L.sativum* L. On calcule le pourcentage d'inhibition de DPPH selon la formule indiquée dans la partie précédente.

Les pourcentages d'inhibition sont présentés dans le tableau 30.

Tableau 20 : Taux d'inhibition des extraits EHS et ELS du DPPH

Concentration (µg/ml)	1	10	50	100	200	500
% d'inhibition EHS	7,58	35,72	49,24	65,63	78,90	85,91
% d'inhibition ELS	7,02	23,57	43,36	48,42	70,91	77,93

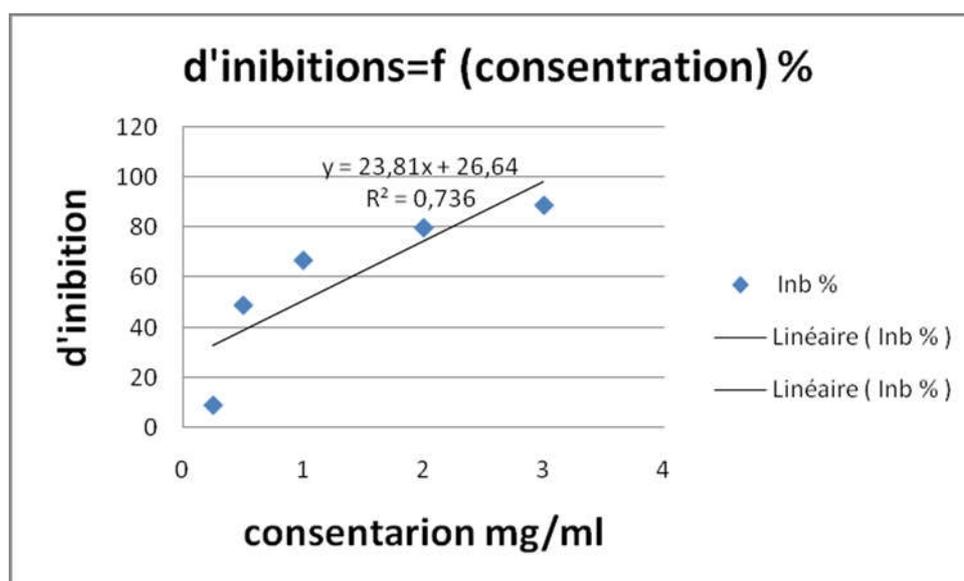


Figure 27 : Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de EHS .

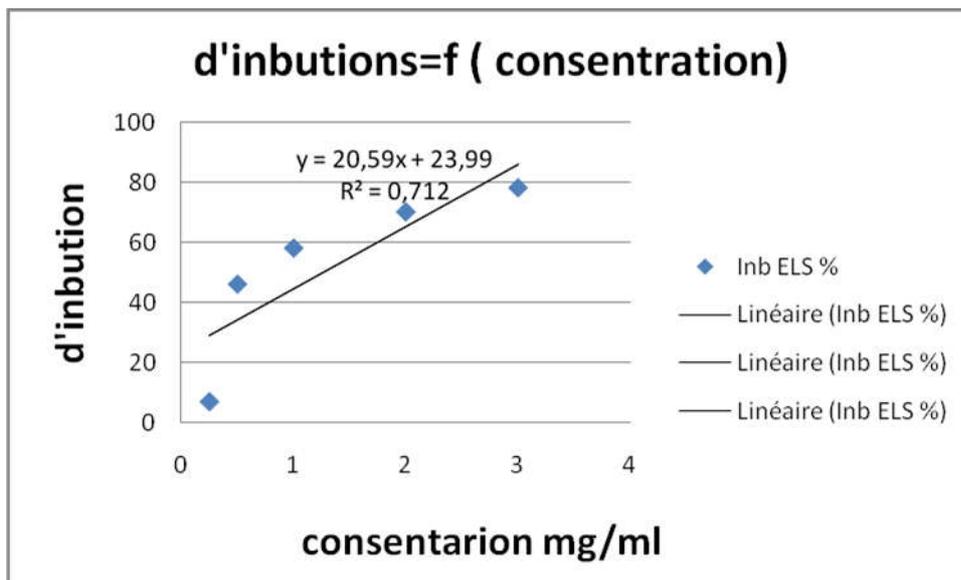


Figure 28 : Evaluation de l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de ELS .

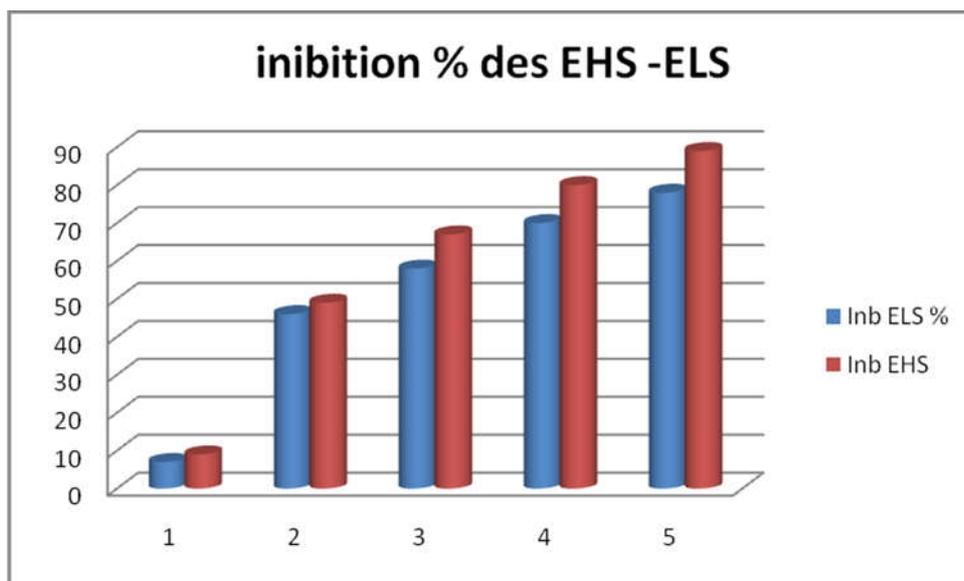


Figure 29 : Histogramme représentatif de % d'inhibition du DPPH par l'extrait méthanolique de *Hibiscus sabdariffa* (EHS) et *Lepidume sativum* (ELS)

Conclusion

Conclusion :

Ces dernières années, il y a eu un intérêt croissant pour l'utilisation des antioxydants et des antimicrobiens naturels. De nombreux chercheurs ont été intéressés par les composés biologiquement actifs isolés des extraits de plantes.

Ce travail avait pour objectifs d'évaluer l'activité anti-oxydante et antimicrobienne des extraits (EMHSet EMLS) du *H.sabdariffa* et du *L.sativum*, relativement à leur teneur polyphénolique.

Le dosage quantitatif des polyphénols totaux, par le réactif de Folin-Ciocalteu a révélé que *Hibiscus sabdariffa* est plus riche en polyphénols que le *Lepidume sativum*.

L'EAcOEt du

H.sabdariffa a montré l'activité la plus importante avec un taux d'inhibition égale à 85,91%.

Le coefficient de corrélation ($R^2 = 0.736$) entre la teneur en polyphénols des extraits du *Lepidume sativum* et l'activité anti-oxydante a indiqué que les composés phénoliques interviennent dans l'activité anti-oxydante des ces extraits, tandis qu'il ya une corrélation moins .($R^2 = 0.712$)

La teneur en polyphénols totaux des extraits du *Hibiscus sabdariffa* et du *Lipidum sativum* s'est corrélée significativement ($R^2 = 0.911$, $R^2 = 0.274$) avec leurs activités anti-radicales.

L'activité antimicrobienne a été évaluée sur 4 souches bactériennes et 4 souches fongiques, par la méthode de diffusion sur milieu gélosé. Les résultats biologiques obtenus tout au long de ce test ont montré que : les extraits du *H.sabdariffa* ont présenté une activité antibactérienne contre tout les souche utilisé et s'est révélé le plus actif, alors que seul l'EMLS du *L.sativum* qui était actif contre *Listiria sp.*

Les extraits du l'*H.sabdariffa* ont témoigné d'une activité antibactérienne intéressante surtout contre la bactérie multi-résistante *Entérobacter sp.* Les mécanismes de l'action de chaque composé phénolique contre diverses bactéries sont très compliqués, il serait donc nécessaire d'étudier plus loin et de comprendre le rapport entre l'activité antibactérienne et anti-oxydante et la structure chimique du composé phénolique dans les extraits examinés.

Nous pensons montrer à travers ce travail que les plantes constituent un réservoir très intéressent pour la recherche dans le futur.

Références bibliographiques

Bibliographie

- [1] **LEGUMES:** G J H Grubben OA Denton foundation PROTA 2004 , collection ressources vegetales de l’afrique tropical2 p 1. 3.
- [2] **the useful plant of west tropical africa volum 6** par Brukill .h . m 1985
- [3] **Janson P.C.M spices condiments and medicinal plants**
- [4] **Schippers R.R 2000** african indigenous vegetables an overview of the cultivated species.
- [5] **jonsel B 1982** cruciferae flore de Madagascar des comores familles. P 4. 6
- **USDA2002** united states departement of agriculture offices of communication agriculture fact book 2002 p7

TELA BOTANICA Association, 2014-04-01. Benoît Bock & al. Référentiel des trachéophytes de France métropolitaine p 11

. **Kerharo J. & Adam J. G.** — La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle. ... Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée Année **1974** Volume 21 p 11

- **after Wood et al., 1979**, for (A) **Clydesdale** Formation, (B) Arbuckle Brook Formation, (C) Bears Brook/Dunn Point formations, and (D) McArras.p12

Wong et *al.*, 2002, Tsai, 1995, Mazza et Miniati, 2000, Du C.T et Francis, 1973 ; Palé et *al.*, 2004, Francis, 1990 p14

- **Seaforth et Tikasingh 2005 , Pouget et al., 1 990 , McClintock et al., 2004** flore de la Réunion – 2009 , p15

- **Thus Newman and Cragg (2012)** showed of anticancer agents developed from the 1940s to 2006 are natural products or derived directly from natural. P16

- **Troisième laboratoire pharmaceutique français**, les Laboratoires **Pierre Fabre** sont spécialisés dans le **médicament**, la santé et la dermo-cosmétique P16.

- **Bruneton, J., (1999)**. Pharmiognosie, phytochimie, plantes médicinales, 2eme édition, Paris : Editions médicales internationales, *Tec et Doc Lavoisier*, p 17 p23

- **Cavin, A., (1999)**. Investigation phytochimique de trios plantes Indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinos poracispa* (Menispermacées),

Merremia emarginata (Convolvulacées) et *Oropea enneanda* (Annonacées). Thèse de doctorat Lausanne, p .

- **Cuendet, M., (1999)**. Recherche de nouveaux composés capteurs de radicaux libres et antioxydants à partir d'une plante d'Indonésie : « *Fagraea blumei* » (Loganiaceae) et de trois plantes d'altitude : « *Bartsia alpina* » (Scrophulariaceae), « *Loiseleuria procumbens* » (Ericaceae) et Camp, Thèse de doctorat, p 18.

- **Adrian et. Frangne, 1991 ;Milane, 2004**. 2.1.1. Classification des composés phénoliques p18

- **Bruneton, 1999**). Dans une étude faite par Aniya et al (2000) l'activité antioxydante de l'extraï p17 19 p25

- **Bonnefont-rousselet et al., 2003**). 8. Marqueurs du stress oxydant et pathologie cardiovasculaire. Les maladies coronariennes représentent p26 p27

- **Koechlin-Ramonatxo,2006**). I-2-1.Radicaux libres et Stress oxydatif. I-2-1. Radicaux libres. Un radical libre p27

- **Hemingway, R.W., (1992)**. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In: Lpant polyphenols: synthesis, proprieties, significande. Laks P.E, Hemingway R.W New York p21

- **Pincemail, 2008**). Si l'hypothèse de l'implication des espèces oxygénées activées dans le développement du cancer est fondée p28

-**GERHARD R.,(1993)**.Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie, 526 pages, Presses polytechniques et universitaires Romandes. Lausanne

- **Gonzalez, A. G ; Estevez-Braun, A., (1997)**. Coumarins, *Nat. Prod. Reprod*, 14 : p 465-475.

- **Gravot, A., (2008)**. Introduction au métabolisme secondaire chez les végétaux. Equipe pédagogique Physiologie Végétale, UMR 118 APBV. Université de Rennes 1 – L2.

- .

-**J BRUNETON., (2009)**. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales (4ème édition)

- **J-L. GUIGNARD.,(2000)**. Biochimie végétale. Edition Dunod .

- **Milane, H ; (2004)**. La quercétine et ses dérivés : molécules à caractère pro-oxydant ou capteurs de radicaux libres, études et applications thérapeutiques. Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en science. Université Louis Pasteur. Strasbourg.p 30
- **Singleton, V.L ; Rossi, J.A., (1965)**. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, p 40.

Etude phytochimique , évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'espèce: *Myrtus commuins* L.

Résumé

Le but de ce travail était l'étude de la plante *Lepidium sativum* L et *Hibiscus sabdariffa* L. appartenant à la famille Brassicaceae et malvaces .

Pour cela nous avons réalisé des tests de screening sur l'extrait hydro-alcoolique, les tests sur la plante à l'étude nous ont donné une idée générale sur le métabolisme secondaire qu'elle contient. D'après les résultats la plante apparait riche en flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, en polyphénols et les terpènes.

La détermination des composés phénoliques totaux via le test FC met en évidence que l'extrait méthanolique des fleurs est riche en composés phénoliques par rapport à l'extrait méthanolique des graines.

L'extrait methanolique des fleurs (*Hibiscus sabdariffa*) a montré une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait methanolique des grains(*Lepidium sativum*), en utilisant la méthode du DPPH.

Le dosage de polyphénols totaux dans l'extrait hydro-alcoolique des fleurs a révélé une plus grande richesse en polyphénols (en utilisant la méthode de Folein- Ciocalteu) comparé à l'extrait hydro-alcoolique des grains.

Notre investigation phytochimique et biologique a montré que *Hibiscus sabdariffa* L et *Lepidium sativum* L. possède des potentialités , anti-microbienne et anti-oxydante.

Mots clés : *Lepidium sativum* L.,*Hibiscus sabdariffa* L., flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, polyphénols terpènes.huiles essentielles, activité antioxydante, activité antibactérienne ,DPPH.

**Etude phytochimique , évaluation des activités antioxydante et anti bactérienne de
l'espèce :*Hibiscus sabdariffa* et *Lepidium sativum*.**

المخلص:

الهدف من دراستنا للصنفين *Hibiscus sabdariffa* et *Lepidium sativum* هو:
إجراء تجارب على هاتين النباتتين و هذه التجارب تعطينا فكرة عامة حول مركبات الأيض الثانوي التي تحتويها. و من
خلال هذه الدراسة وجدنا أن هتين النباتتين غنية ب الفلافونويدات ، التانينات، التربينات،ستيروول، ستيرويد و
بوليفينول.

لتحديد المركبات الفينولية من المستخلص الكحولي المائي للأزهار و الحبوب بينت أنها غنية بالمركبات الفينولية

مستخلص الكحولي المائي للأزهار بينت أنها مضادة للأكسدة افضل مقارنة بمستخلص الكحولي المائي للحبوب. عن
طريق استعمال الطريقة DPPH.

التحديد الإجمالي لعدد الفينول من المستخلص الكحولي المائي للأزهار بين أنها غنية جدا بعدد الفينول و هذا مقارنة
بالمستخلص الكحولي المائي للحبوب . (استعملنا طريقة Folein- Ciocalteu).

أظهر لنا التحقيق الكيميائي النباتي و البيولوجية *Hibiscus sabdariffa* ، و *Lepidium sativum* مضادة
للميكروبات خاصة البكتريا *listiria sp* ومضادة للأكسدة.

الكلمات المفتاحية: *Hibiscus sabdariffa* et *Lepidium sativum* الفلافونويدات ، التانينات،
التربينات،ستيروول، ستيرويد و بوليفينول. ، مضادة للميكروبات ومضادة للأكسدة. DPPH

Etude phytochimique , évaluation des activités antioxydante et anti-inflammatoire de l'espèce :*Hibiscus sabdariffa* et *Lepidium sativum*.

Abstract:

The goal of conducting this research on *Hibiscus sabdariffa* et *Lepidium sativum*. is :

Making experiments on this plant to gain a general understanding about which secondary metabolism complexes it contains . Thus, it is found to be rich in flavonoids, tanins, sterols ,steroids, in polyphenol and terpene.

While investigation phenoliques using FC test, the leafs have been found to be richer in phenoliques complex in comparison to its percentage in the fruits.

The ethyle acetate extract from leafs have a higher antioxydant activity in comparison with the butanolique extract from the leafs. DPPH method has been used for this purpose.

The total dosage of the phenoliques complex derived the extract from the hydroalcolic of the fruits (the Folein Ciocalteu method has been utilized).

Our investigation show that *Lepidium sativum* L. has anti-inflammation, antimicrobial (*listiria sp*) and antioxydant potentials.

Key word: *Lepidium sativum* L., *Hibiscus sabdariffa* L . ,flavnoids, tanins, stérols, stéroïds,poluphenols and terpenes, essential oil, antioxydant activity, and antimicrobial,DPPH.

Etude phytochimique et évaluations des activités anti-oxydantes et anti-bactériennes des espèces : *Hibiscus sabdariffa* L. et *Lepidium sativum* L.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Métabolisme secondaire et molécules bioactives.

Le but de ce travail était l'étude de la plante *Lepidium sativum* L et *Hibiscus sabdariffa* L. appartenant à la famille Brassicaceae et malvaces .

Pour cela nous avons réalisé des tests de screening sur l'extrait hydro-alcoolique, les tests sur la plante à l'étude nous ont donné une idée générale sur le métabolisme secondaire qu'elle contient. D'après les résultats la plante apparait riche en flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, en polyphénols et les terpènes.

La détermination des composés phénoliques totaux via le test FC met en évidence que l'extrait méthanolique des fleurs est riche en composés phénoliques par rapport à l'extrait méthanolique des graines.

L'extrait methanolique des fleurs (*Hibiscus sabdariffa*) a montré une meilleure activité antioxydante par rapport à l'extrait methanolique des grains(*Lepidium sativum*) , en utilisant la méthode du DPPH.

Le dosage de polyphénols totaux dans l'extrait hydro-alcoolique des fleurs a révélé une plus grande richesse en polyphénols (en utilisant la méthode de Folein- Ciocalteu) comparé à l'extrait hydro-alcoolique des grains.

Notre investigation phytochimique et biologique a montré que *Hibiscus sabdariffa* L et *Lepidium sativum* L. possède des potentialités , anti-microbienne et anti-oxydante.

Mots clés : *Lepidium sativum* L.,*Hibiscus sabdariffa* L., flavonoïdes, les tanins, stérols, stéroïdes, polyphénols terpènes.huiles essentielles, activité antioxydante, activité antibactérienne ,DPPH .

Laboratoire de recherche : ...Laboratoire de biologie-écologie végétale.....

Jury d'évaluation :

Président du jury :	<i>CHAIB</i>	<i>GHANIA</i>	(MCA - UFM Constantine).
Rapporteur :	<i>CHIBANI</i>	<i>SALIH</i>	(MCA - UFM Constantine).
Examineurs :	<i>KEBAILI</i>	<i>ZOUBIR</i>	(MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : 19/06/2016