



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

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et Santé*

Intitulé :

**Recherche des métabolites secondaires du
champignon Algérien *Pleurotus eryngii*
et évaluation de leur activité antibactérienne.**

Présenté et soutenu par : BRAMKI Mouna

Le : 20/06/2016

NEKIA Abdessamie

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mr CHIKHI A. (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : Mme TENIOU S. (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

Examineur : Mr MOKRANI E. H. (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Remerciements

Louange à dieu qui nous donné la force, le courage et l'espoir nécessaire pour réaliser ce travail est surmonter l'ensemble des difficultés.

Nous tenons à remercier vivement :

Notre encadreur madame **TENIOU S** pour les conseils et son suivi durant la réalisation de notre travail.

A monsieur **CHIKHI A** et monsieur **MOKRANI E H.** qui ont bien voulu faire partie du jury.

Nous remercions aussi les personnes qui nous ont aidé et encouragé le long de ce travail.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....1

Partie bibliographique

1. Généralités.....3

1.1 La mycologie.....3

1. 2. Le règne fungi.....3

1.3. Les champignons.....3

2. Présentation du champignon.....4

2. 1. *Pleurotus eryngii*4

2. 2. Taxonomie et classification.....5

2.3. Comment le reconnaître?5

2. 4. Répartition géographique.....7

2. 5. L'usage traditionnel du *Pleurotus eryngii*7

2.6. L'intérêt thérapeutique du *Pleurotus eryngii*7

3. Métabolites secondaires	9
3.1. Définition et fonction.....	9
3.2. Classification des métabolites secondaires.....	9
3.2.1. Les composés phénoliques.....	9
3.2.1.1. Les acides phénoliques simples (C6-C1 ou C6- C3).....	10
3.2.1.2. Les flavonoïdes.....	11
3.2.2. Les tanins.....	13
3.2.3. Les terpénoïdes.....	14
3.2.4 Les hétérosides.....	15
3.2.5 Les saponosides.....	15
3.2.6 Les alcaloïdes.....	15
4. Activité antibactérienne.....	17
4.1. Généralités.....	17
4.2. Activité antibactérienne de <i>Pleurotus eryngii</i>	17
4.3. Souches bactérienne utilisées dans ce travail.....	17
4.3.1. <i>E. coli</i>	17
4.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
4.3.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
4.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18

Partie matériel et méthodes

1. Matériel fongique.....	19
1.1. Identification du champignon.....	19

1. 2. Récolte du matériel.....	19
1. 3. Conservation du champignon.....	20
2. Méthodes.....	20
2.1. Criblage des métabolites secondaires.....	20
2. 1.1. Préparation de l'infusé pour le Criblage des flavonoïdes, les polyphénols et les tanins.....	20
2.1.2. Criblage des tanins catéchiques.....	21
2. 1.3. Criblage des triterpènes.....	21
2. 1.4. Mise en évidence des saponosides.....	22
2. 1.5. Mise en évidence des quinones.....	23
2.1.6. Mise en évidence des alcaloïdes.....	23
2. 1.7. Les Dérivés Anthracéniques.....	24
2. 1.7.1 Dérivés anthracéniques libres.....	24
2. 1.7.2 Dérivés anthracéniques combinés.....	24
2. 2. Extraction	25
2. 2.1. Préparation des extraits	25
2. 2.2. Détermination du rendement.....	27
2. 3. Chromatographie sur couche mince.....	27
2. 4. Etude de l'activité antibactérienne.....	29
2. 4.1. Objectif	29
2. 4.2. Test de l'activité inhibitrice.....	29

Partie résultats et discussion

1. Criblage des métabolites secondaires.....	33
1.1. Recherche des flavonoïdes	33
1. 2. Recherche des polyphénols.....	35
1.3. Recherche des tanins condensés.....	35
1. 4. Recherche des tanins catéchiqes.....	36
1.5. Recherche des triterpènes.....	36
1.6. Recherche des saponosides.....	37
1.7. Recherche des quinones.....	37
1.8. Recherche des alcaloïdes.....	38
1. 9. Recherche des anthracéniques libres.....	39
1. 10. Recherche des anthracéniques combinés.....	39
2. Extraction et détermination des rendements.....	42
3. Mise en évidence des extraits par la chromatographie sur couche mince.....	44
4. Test d'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait brut.	45
Conclusion.....	49

Références bibliographiques.

Résumé.

Liste des figures

Figure 01 : Champignon <i>Pleurotus eryngii</i>	4
Figure 02 : Description du <i>Pleurotus eryngii</i>	4
Figure 03: Structure des Coumarines.....	11
Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes.....	11
Figure 05: Structure de base des Tanins galliques et Tanins ellagiques.....	13
Figure 06: Structure de tanins condensés.....	14
Figure 07: Structure de base des terpénoïdes.	14
Figure 08 : <i>Pleurotus eryngii</i>	19
Figure 09 : Carte géographique de la Zone de récolte.....	19
Figure 10 : Chauffage à relax	25
Figure 11 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des métabolites secondaires du <i>Pleurotus eryngii</i>	26
Figure 12 : Le développement du chromatogramme.....	28
Figure 13 : Illustration de la méthode de diffusion de disque.....	32
Figure 14 : Le résultat de Flavone.....	34
Figure 15 : Le résultat des Flavonole et flavanole.....	34
Figure 16 : Le résultat des polyphénols	34
Figure 17 : Le résultat des tanins condensés.....	35
Figure 18 : Le résultat des tanins catéchiques.....	36

Liste des figures

Figure 19 : Le résultat des Triterpènes.....	36
Figure 20 : Le résultat des saponosides.....	37
Figure 21 : Le résultat des quinones.....	37
Figure 22 : Le résultat des Alcaloïdes.....	38
Figure 23 : Le résultat des anthracéniques libres.....	39
Figure 24 : Le résultat des anthraquinones.....	40
Figure 25 : Le résultat des hétérosides à génines réduites.....	40
Figure 26 : Le résultat des hétérosides.....	41
Figure 27 : Les extraits obtenus dans le <i>Pleurotus eryngii</i>	42
Figure 28 : Histogramme du rendement de l'extraction.....	4
Figure 29 : Chromatogramme sur couche mince des extraits du <i>Pleurotus eryngii</i>	44
Figure 30 : Les histogrammes des diamètres des zones d'inhibitions des fractions de l'extrait brut du <i>Pleurotus eryngii</i> contre les différentes bactéries.....	46
Figure 31 : Aspect d'inhibition des souches bactériennes par les extraits du <i>Pleurotus eryngii</i>	47

Liste des tableaux

Tableau 01 : Classification de <i>Pleurotus eryngii</i>	5
Tableau 02 : Activités de <i>Pleurotus eryngii</i>	8
Tableau 03 : Les différentes classes des composés phénoliques.....	10
Tableau 04 : Les principales classes des flavonoïdes.....	12
Tableau 05 : Les principaux cycles azotés des alcaloïdes.....	16
Tableau 06 : Gamme de dilution décroissante du décocté pour la mesure de l'indice de mousse.....	22
Tableau 07 : Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.....	28
Tableau 08 : Les concentrations réalisées des trois fractions.....	30
Tableau 09 : Mise en évidence des flavonoïdes de type «Flavone ou Flavonone » dans le <i>Pleurotus eryngii</i>	33
Tableau 10 : Mise en évidence des flavonoïdes de type «flavonole et flavanole ».....	34
Tableau 11 : La mise en évidence des polyphénols.....	35
Tableau 12 : La mise en évidence des tanins condensés.....	35
Tableau 13 : La mise en évidence des tanins catéchique.....	36
Tableau 14 : La mise en évidence des Tritéropènes.....	36
Tableau 15 : La mise en évidence des saponosides.....	37
Tableau 16 : La mise en évidence des quinones.....	37
Tableau 17 : La mise en évidence des alcaloïdes.....	38
Tableau 18 : La mise en évidence des anthracéniques libres.....	39
Tableau 19 : La mise en évidence des anthraquinones.....	39

Liste des tableaux

Tableau 20 : La mise en évidence des hétérosides à génines réduites.....	40
Tableau 21 : La mise en évidence des hétérosides	41
Tableau 22 : Les résultats du criblage des métabolites secondaires.....	41
Tableau 23 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.....	43
Tableau 24 : Diamètres en mm des zones d'inhibition dès l'extrait du <i>pleurotus eryngii</i>	45

Liste des abréviations

ATCC : *American Type Culture Collection*.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

ChCl₃ : Chloroforme.

EP : Ether de pétrole :

EtOAc : Acétate d'éthyle.

EtOH : Ethanol.

FeCl₃ : Chlorure de fer.

FSNV : Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

HCl : Acide chlorhydrique.

HMG-CoA : Hydroxy-Méthyl-Glutaryl-Coenzyme A.

LDL : *Low Density Lipoprotein*.

MeOH : méthanol.

MH : Mueller-Hinton.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

n-BuOH : n-Butanol.

NH₄OH : Hydroxyde d'ammoniaque.

UV : Ultraviolet.

V/V : Volume par volume.

A decorative frame with a green border and a yellow inner border. On the left side, there are three mushrooms: a large purple one with orange spots, a smaller green one with yellow spots, and a small yellow one. On the right side, there are two butterflies (one green, one yellow) and a pink and green circular object. The word "Introduction" is written in bold black text across the center of the frame.

Introduction

Introduction

L'émergence de nouvelles maladies, le développement de résistances aux médicaments, l'apparition de virus mortels, les complications liées aux transplantations d'organes et l'augmentation de l'incidence des infections fongiques, ainsi que les risques de toxicité associé à l'utilisation excessive des médicaments et des antibiotiques de synthèse, poussent les chercheurs à explorer différentes sources naturelles afin d'obtenir de nouveaux médicaments qui seraient efficaces, possédant une faibles toxicité et ayant un impact mineur sur l'environnement.

Les métabolites secondaires regorgent d'une importante réserve à caractère médicinal, occupant une place importante dans la pharmacopée algérienne. Véritable renouveau de la pharmacopée mondiale, la mycothérapie (soins par les champignons) apparaît comme une révolution non verte: ni végétaux, ni animaux, partout et totalement indispensables au processus de vie et de mort, les champignons comestibles, vrais alicaments possèdent également des propriétés médicinales étonnantes dans le traitement de certains cancers, de pathologies dégénératives mais aussi de pathologies moins lourdes. Elle est une branche essentielle de la phytothérapie, depuis 2000 ans (expérience des praticiens asiatiques, recherche dans les hôpitaux chinois et mondiale actuellement) [1].

A cet effet le champignon "*Pleurotus eryngii*" communément appelé Pleurote du panicaut du nord-est Algérie retient d'avantage notre attention. Cette espèce est reconnue par sa richesse nutritive, et par ses propriétés curatives particulières bénéfiques pour la santé humaine [2-3-4]. Ceci révèle l'importance de réaliser une étude sur des métabolites secondaires provenant de l'espèce *Pleurotus eryngii*.

Les travaux que nous avons effectués sur notre champignon dans ce cadre sont reportés dans les étapes suivantes :

Dans la première étape, sont reportées des études bibliographiques effectuées sur le *Pleurotus eryngii* et les métabolites secondaires.

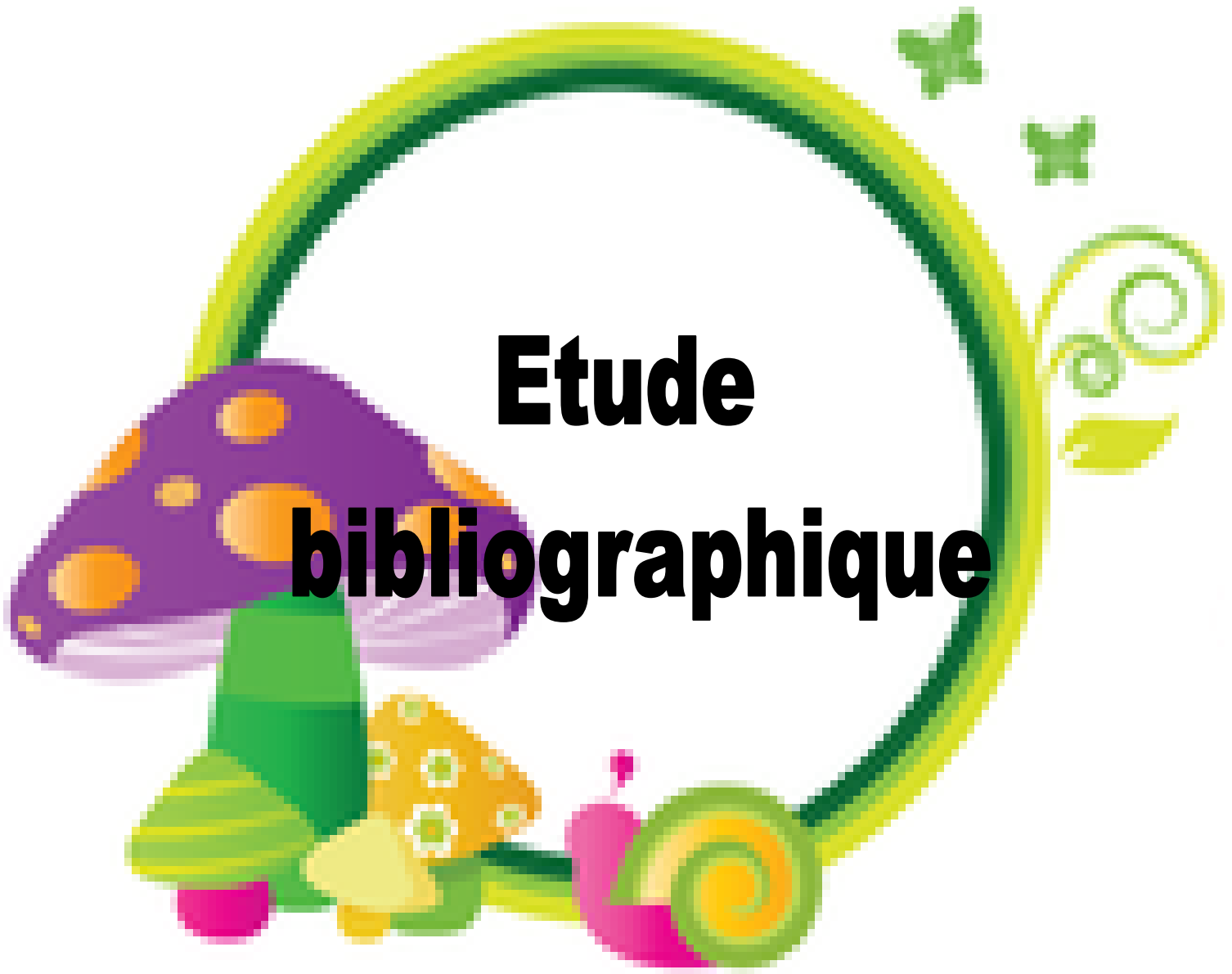
La deuxième étape est consacrée sur un criblage des différents métabolites du notre extrais du champignon *Pleurotus eryngii*.

Dans la troisième étape, une extraction générale des métabolites secondaires a été effectuée en utilisant trois solvants d'extraction : Ether de pétrole, Acétate d'éthyle et le n-butanol.

Dans la quatrième étape, nous avons vérifié la présence de ces métabolites dans les trois fractions par une chromatographie analytique sur couche mince.

Enfin une évaluation de l'activité antibactérienne des fractions précédentes a été réalisée sur quatre souches pathogènes.

Etude bibliographique



1. Généralités

1.1. La mycologie

La mycologie est une science relativement récente. Cependant les champignons sont apparus depuis le début de la vie sur terre il y a environ 4,5 milliards d'années et la plupart datent du Crétacé et du tertiaire, dont on peut voir les vestiges dans certains fossiles et surtout dans l'ambre. Les premiers fossiles ressemblant aux champignons actuels remontent au Silurien, soit environ 410 millions d'années. Certains ascomycètes ont été reconnus du Carbonifère. On dénombre actuellement plus de 400 genres issus des fossiles trouvés sur notre planète [5].

1.2. Le règne de Fungi

Les champignons appartiennent au règne des Fungi, un groupe qui se distingue nettement des végétaux, des animaux et des bactéries. Il leur manque la caractéristique principale des végétaux : la capacité d'utiliser directement l'énergie du soleil grâce à la chlorophylle. Ils doivent donc assurer leur alimentation à partir d'autres organismes, en absorbant les substances nutritives du matériel organique dans le quel ils vivent [6].

L'organisme vivant des Fungi est un mycélium constitué d'un fin réseau de filaments appelés hyphes. Sous certaines conditions, les hyphes sexuellement compatibles fusionnent et forment des spores. Les structures les plus grandes (supérieures à 1 mm) produisant des spores sont appelées champignons. C'est la partie que l'on remarque le plus dans la nature, mais elle ne constitue qu'une fructification. La partie la plus importante se trouve sous le sol ou à l'intérieur du bois [7].

1.3. Les champignons

Le mot « champignon » vient du latin « *campaniolus* » (qui signifie : produit de la campagne), qui a évolué vers 1350 en « *champineul* », pour aboutir en 1398 au mot actuel.

Les champignons, appelés aussi Fungi ou Mycètes, constituent un règne à part entière, au même titre que les procaryotes (bactéries et archaebactéries), les protistes (eucaryotes unicellulaires), les végétaux, les animaux. Ils constituent un ensemble très diversifié, que l'on estime entre 2,5 et 50 millions d'espèces. Heureusement le nombre d'espèces impliquées en pathologie humaine est bien inférieur, entre 300 et 500 espèces. Ce sont des eucaryotes, uni-

ou pluricellulaires, immobiles. Ils sont dépourvus de pigments assimilateurs de type chlorophylle et sont donc incapables de photosynthèse. Il s'agit d'organismes hétérotrophes dont la nutrition carbonée est dépendante de la présence de matière organique préformée. Les champignons se nourrissent par absorption : ils sécrètent des enzymes protéolytiques qui transforment le substrat, sur lequel ils se développent, en sous-unités plus petites et donc assimilables (glucose, maltose). Ces composés sont ensuite stockés sous forme de glycogène et de lipides [5].

Le règne des champignons comprend 5 embranchements « *phyla* » *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Basidiomycota*, et « *Deuteromycotina* ou *Deuteromycetes* » [8].

2. Présentation de champignon

2.1. *Pleurotus eryngii*

Pleurotus eryngii « communément appelé Pleurote du panicaut » est un champignon comestible largement cultivé. Teneur en eau est d'environ 90 % de champignons frais.

Il appartenait au genre du Pleurote et il arrive à être le plus important dans cette famille. Il a un petit capuchon, mais sa tige est épaisse et charnue. Une fois récolté le champignon ne va pas mal rapidement.

C'est un champignon avec des quantités généreuses de nutriments, y compris des glucides, des protéines, des vitamines, des minéraux et des fibres. Cela ressemble beaucoup à une alimentation équilibrée et le champignon est tenu de garder les gens en bonne santé [9].



Figure 01 : Champignon *Pleurotus eryngii*.

2.2. Taxonomie et classification

Tableau 01 : Classification de *Pleurotus eryngii*.

<u>Règne :</u>	<u>Fungi</u>
<u>Division :</u>	<u>Basidiomycota</u>
<u>Classe :</u>	<u>Agaricomycetes</u>
<u>Sous-classe :</u>	<u>Agaricomycetidae</u>
<u>Ordre :</u>	<u>Agaricales</u>
<u>Famille :</u>	<u>Pleurotaceae</u>
<u>Genre :</u>	<u>Pleurotus</u>
<u>Nom binominal :</u>	<i>Pleurotus eryngii</i>

2.3. Comment le reconnaître ?

Au long de l'année, de nombreuses espèces de champignons poussent dans nos régions. Vous les trouverez dans les bois, dans les prés, au bord des fossés, ou encore au pied de vieux murs. Mais comment reconnaître les bons champignons ? Voici quelques conseils pour repérer un champignon appelé Pleurote du panicaut [10] :

➤ Description

Le chapeau de ce champignon mesure de cinq à dix centimètres, il est dissymétrique et de couleur beige à brun. La marge est enroulée. Les lames sont espacées et de couleur blanc crème. Le pied est souvent excentré, il est courbé et blanc.

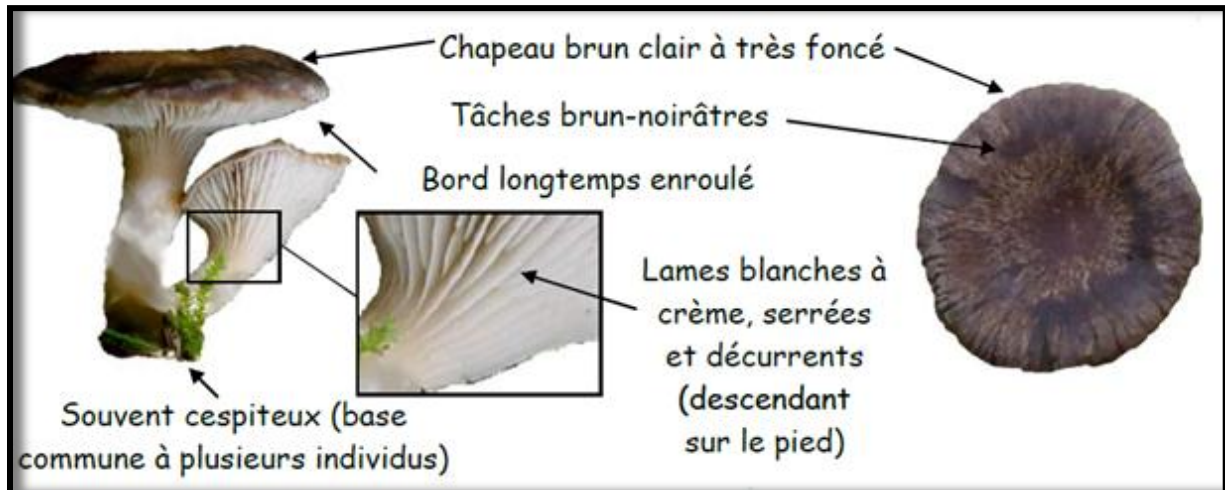


Figure 02 : Description du *Pleurotus eryngii*.

➤ Écologie

Le Pleurote du panicaut pousse dans les lieux non cultivés, les landes, et partout où pousse le chardon panicaut. Il peut également pousser sur le littoral près de chardons maritimes.

➤ Périodicité

Le Pleurote du panicaut se cueille du printemps à l'automne. Elle est assez commune dans le Midi, le centre et sur les littoraux.

➤ Comestibilité

Ce champignon est un excellent comestible car sa chair est très parfumée. C'est la meilleure des Pleurotes, elle est même considérée comme l'un des meilleurs champignons.

2.4. Répartition géographique

Pleurotus eryngii originaire des rives de la Méditerranée. Il se trouve donc dans le Moyen-Orient et les régions dans la partie nord de l'Afrique. Ce champignon se trouve aussi en Asie où ils sont cultivés. D'autres pays qui ont entrepris de cultiver ce champignon dans le commerce comprennent le Japon, la Corée du Sud, l'Italie, l'Australie, l'Afrique du Sud et aux États-Unis [11].

2. 5. L'usage traditionnel du *Pleurotus eryngii*

Les *Pleurotus eryngii* a d'autres usages qui ont un impact sur la santé, mais d'une manière indirecte. Pleurote du panicaut est un champignon lignolytique qui est en mesure de remédier à l'agriculture par des produits ou déchets réels pour devenir consommables sains pour les animaux domestiques. Cela garantit que les agriculteurs peuvent élever des animaux pour la viande ou le lait à un prix avantageux. Cela contribue à augmenter la santé des gens lorsque les aliments nutritifs deviennent abordables pour de nombreux peuples .Dans la même lumière, le champignon, grâce à ses propriétés ligninolytiques, aide à débarrasser l'environnement des produits par ailleurs dangereux. Parmi le matériel rendu inoffensif par les puissances de ce champignon sont des contaminants qui sont un produit de l'activité industrielle. D'autres sont des polluants organiques. Xénobiotiques sont pris en charge par le champignon *Pleurotus eryngii* de la même manière [11].

2. 6. l'intérêt thérapeutique du *Pleurotus eryngii*

Sur les 15 000 espèces de champignons supérieurs qui existent sur terre, environ 700 possèdent des propriétés médicinales. Pourtant, les chercheurs pensent que l'on pourrait découvrir un intérêt thérapeutique sur plus de 1 800 espèces de champignons au total [12].

La mycothérapie a pour objet la thérapie médicale par les champignons dont certaines espèces parmi les dizaines de milliers existantes sont reconnues pour leur propriété curative. La mycothérapie regroupe l'étude de la biologie des champignons, leur toxicologie et leur propriété thérapeutique [13].

- Pleurote du panicaut est riche en fibres, en stérols végétaux, en protéines, oligo-éléments et sa faible valeur calorique, accompagne les régimes de prévention des maladies cardio-vasculaires.

- c'est aussi un excellent hypocholestérolémiant, Il est capable de synthétiser la « mévinoline » naturelle, le puissant inhibiteur du HMG-CoA réductase dans la biosynthèse de cholestérol. En deux mois, un apport de 4 g du Pleurote en poudre, ramène au dessous de 40% le taux de cholestérols LDL dans le sang, soit un résultat rivalisant avec les meilleurs médicaments disponibles [14].
- Les polysaccharides extraits du Pleurote se sont révélés propres à renforcer l'activité du système immunitaire [15].
- Le Pleurote permet de stopper presque complètement la croissance des cellules en culture du cancer du sein. « avec le champignon Pleurote du panicaut ajouté la prolifération et 9% » [16].

Ce champignon possède autres propriétés qui sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 02 : Propriétés thérapeutiques du *Pleurotus eryngii*.

champignon	Activité	Référence
<i>Pleurotus eryngii</i>	Antiallergique	[2]
	Anti-inflammatoire	[3]
	Antifongique	[17]
	Anti-bactérie	[18]
	Anti-levure	[19]
	Anti-dermathophyte	[20]
	Anti-tumorale	[4]
	Anti-oxydante	[21]

3. Métabolites secondaires

3.1. Définition et fonction

Les métabolites secondaires sont souvent considérés comme n'étant pas essentiels à la vie de la plante. Ils sont bio synthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème. Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus [22].

En général, les termes, métabolites secondaires, xénobiotiques, facteurs antinutritionnels, sont utilisés pour déterminer ce groupe, il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques, leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections viral...), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement soit dose ou structure dépendant [23].

3. 2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires qui sont classés selon leur structure chimique en quatre groupes majeurs sont :

- ❖ Les composés phénoliques ou aromatiques.
- ❖ Les terpénoides.
- ❖ Les hétérosides.
- ❖ Les alcaloïdes.

3.2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une vaste classe des substances organiques cycliques très variées, d'origine secondaire qui dérivent du phénol C_6H_5OH qui est un monohydroxybenzène. Les composés phénoliques sont fort répandus dans le règne végétal ; on les rencontre dans les racines, les feuilles, les fruits et l'écorce. La couleur et l'arome, ou l'astringence des plantes dépendent de la concentration et des transformations des phénols. Dans la nature, ces composés sont généralement dans un état lié sous forme d'esters ou plus généralement d'hétérosides. Ils existent également sous forme de polymères naturels (tanins). Le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes [24].

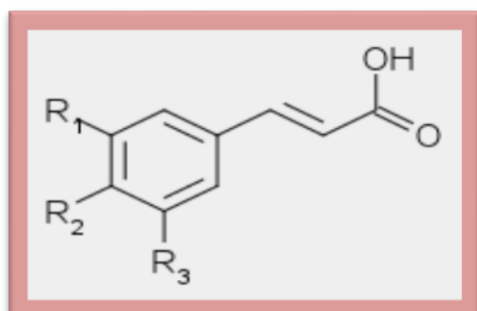
Plusieurs classes de composés polyphénoliques sont définies selon le squelette de base :

Tableau 03: Les différentes classes des composés phénoliques [25].

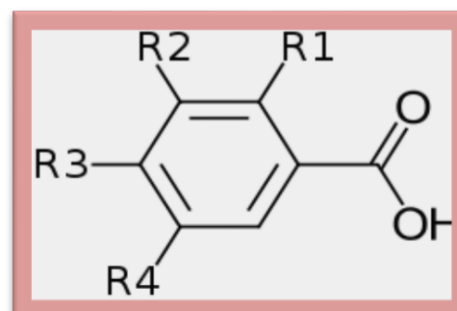
Squelette carbonée	Classes de composés phénoliques
C ₆	Phénols simples et benzoquinones
C ₆ -C ₁	Acides phénoliques
C ₆ -C ₂	Acétophénones et les acides phenylacétiques
C ₆ -C ₃	Acides hydroxy-cinnamiques, coumarines, phénylpropènes, chromons
C ₆ -C ₄	Naphthoquinones
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones
C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes et anthraquinones
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes et isoflavonoïdes
(C ₆ -C ₁) ₂	Tannins hydrolysables
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes et néolignanes
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoïdes
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines
(C ₆) _n	Catéchols
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tannins condensés

3. 2.1.1. Les acides phénoliques simples (C6-C1 ou C6-C3)

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts qui sont les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques [26].



Acides hydroxycinnamiques (C6-C3)



Acides hydroxybenzoïques (C6-C1)

❖ Coumarines C6-C3

Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale. Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique [27].

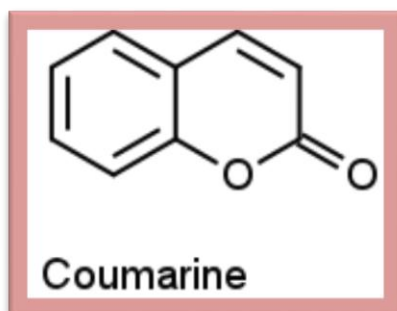


Figure 03: Structure des Coumarines.

3.2.1.2. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques qui représentent un large groupe des métabolismes secondaires.

Leur structure comprend de deux cycles aromatiques (A et B) reliées par une trois chaîne carbonée, généralement organisé comme une hétérocyclique oxygéné (C).

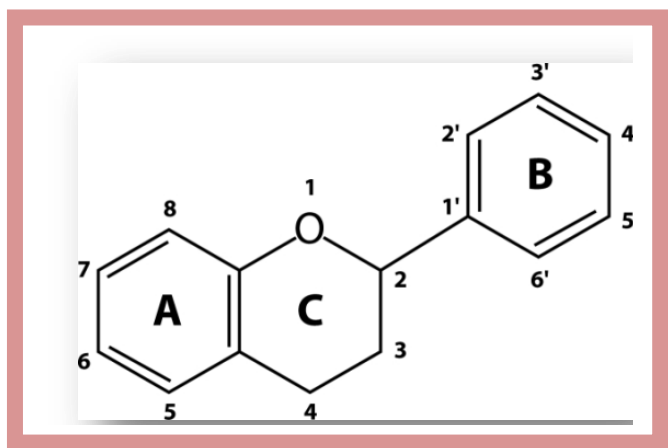


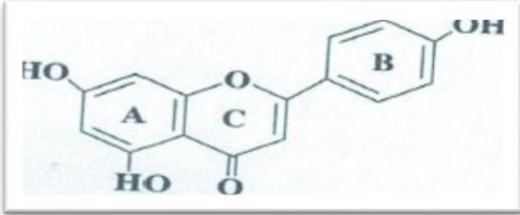
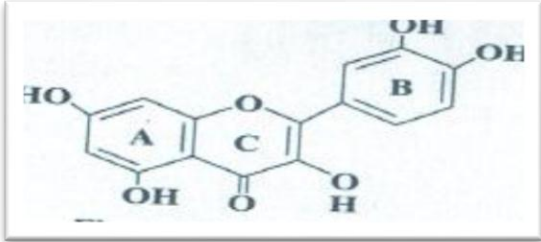
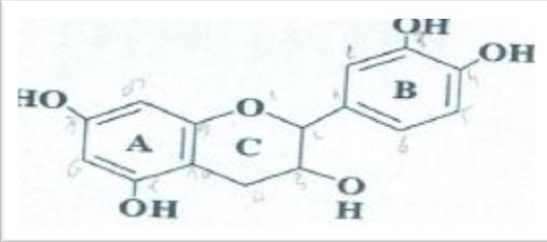
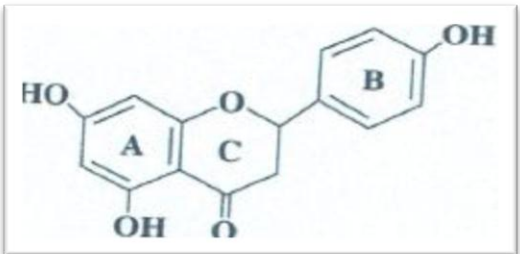
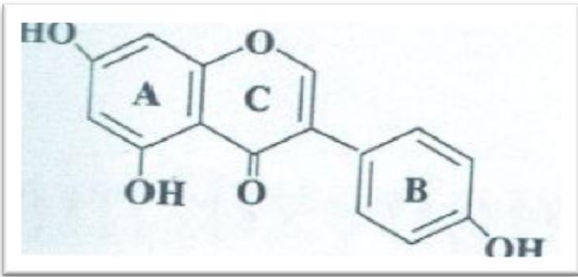
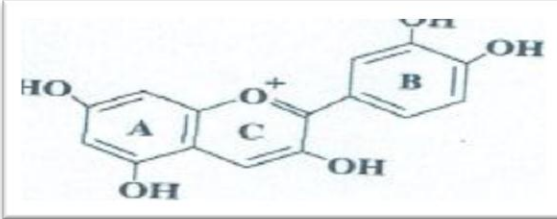
Figure 04 : Structure de base des flavonoïdes [28].

➤ Classification des flavonoïdes

Plus de 5000 variétés des flavonoïdes ont été identifiés et peuvent classer selon leur structure sur la base du degré de substitution et l'oxydation [29].

Les flavonoïdes prédominants sont le plus souvent divisés en six sous-classes : Les flavones, les flavonols, flavan-3-ols, les flavanones, les isovlavones et anthocyanidines [28].

Tableau 04 : Les principales classes des flavonoïdes [28].

Classe	Structure	Exemple
Les flavones		Apigénine
Les flavonols		Quercétine
Flavan-3-ols		Catéchine
Les flavonones		Naringénine
Isoflavonones		Génistéine
Anthocyanidines		Cyandine

3.2.2. Les tanins

Ils sont définis comme étant des composés poly-phénoliques, hydrosolubles de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 KD (polymères) ayant la propriété de tanner la peau c'est-à-dire de la rendre imputrescible (l'empêche de pourrir), propriété liée à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines), à précipiter les alcaloïdes et la gélatine [30].

❖ Types et structures

Selon la structure, on a deux types de tanins : les tanins hydrolysables et les tanins condensés, dits aussi : proanthocyanidines [31].

a) Tanins hydrolysables

Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tanases en oses et en acide phénol, selon la nature de celui-ci on distingue: les tanins galliques, et les tanins ellagiques .

➤ Tanins galliques (Gallo tanins)

Ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.

➤ Tanins ellagiques (Ellagitanins)

Ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagique.

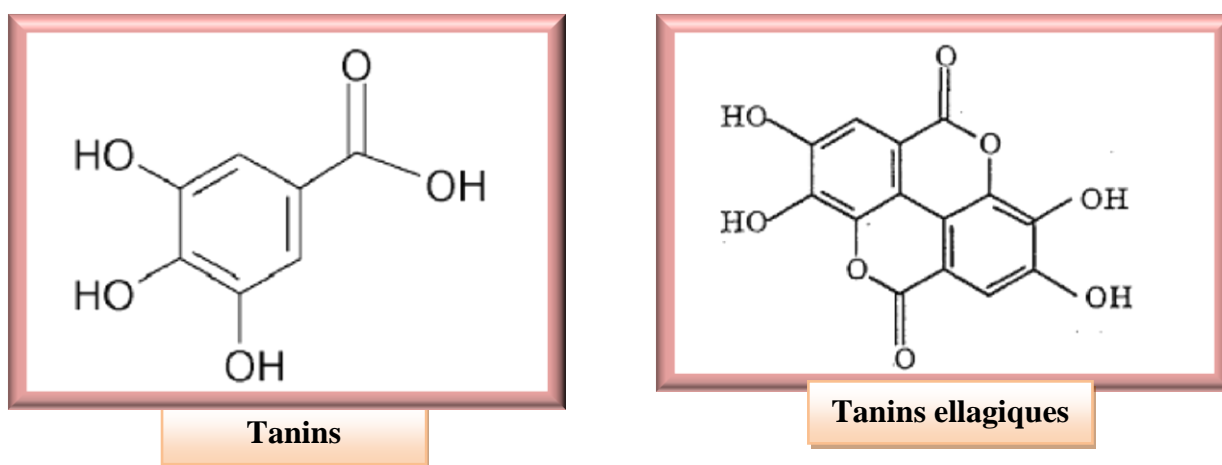


Figure 05: Structure de base de Tanins galliques et Tanins ellagiques.

b) Les tannins condensés

Ce sont des proanthocyanidines. C'est-à-dire, des composés polyphénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5-flavanols, 5-deoxy-3-flavanols et flavan-3,4-diols. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absence de sucre [31].

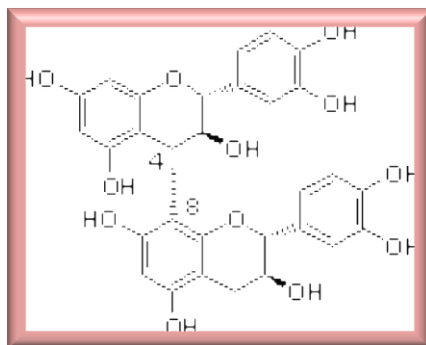


Figure 06 : Structure de tanins condensés.

3.2.3. Les terpénoïdes

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons, insectes) [32].

Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique[33].

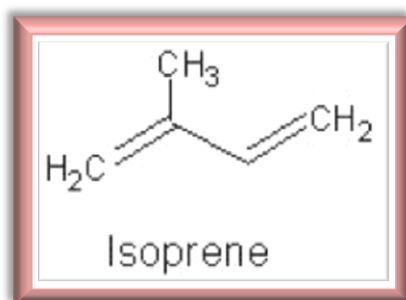


Figure 07: Structure de base des terpénoïdes.

Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-methylbutadiène, appelées unités isopréniques (C₅H₈) n. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux. De ce fait les terpènes sont classifiés comme suit [22]:

Terpènes	Unités isopréniques	Atomes de carbone
Monoterpénoïdes	2	10
Sesquiterpénoïdes	3	15
Diterpénoïdes	4	20
Sesterterpénoïdes	5	25
Triterpénoïdes	6	30

3. 2.4. Les hétérosides

Les hétérosides ou glycosides sont des molécules formées par combinaison d'oses et de substances non glucidique appelées aglycones ou génines .Ce sont le secondaire le plus anciennement connues .Il forment des substances de réserve localisées dans les vacuoles cellulaires .Les hétérosides se différencient entre eux par leurs génines qui appartiennent à tous les groupes de métabolisme secondaire (flavonoïde, saponosides, et tanins) et par le mode de liaison entre le génine et l'ose ainsi que par la nature de la partie glucidique. Ils sont classés selon la nature de la liaison en C-, N, O-, S- hétérosides [35].

3. 2.5. Les saponosides

Les saponines sont des métabolites secondaires hétérosidiques, fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs en particulier chez les Dicotylédones (racines, fruits, écorces, tiges, feuilles ou graines), mais sont synthétisés également par certains animaux marins tels que les concombres de mer ou les étoiles de mer.

Le nom saponoside est dérivé du mot latin *sapo* qui veut dire savon, qui évoque le caractère moussant de leur solution aqueuse. Ce pouvoir tensio-actif est dû au caractère amphiphile des molécules, à la fois lipophile (la partie aglycone ou génine) et hydrophile (la partie osidique).

Les saponosides sont des composés, pour la plupart, très polaires et sont souvent retrouvés sous forme de mélanges complexes dans la plante. Ils possèdent en outre un large spectre de propriétés biologiques et pharmacologiques notamment des propriétés immunomodulatrice, immunoadjuvante, cytotoxique, antitumorale et hypocholestérolémiant [34].

3. 2.6. Les alcaloïdes

➤ Définition

Les alcaloïdes sont des substances organiques naturelles composés de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote. Typiquement comme les amines primaires, secondaires, ou tertiaires et cela confère la basicité à l'alcaloïde, en facilitant leur isolement et purification comme sels solubles dans l'eau formés en présence des acides minéraux. Ils peuvent être présents dans tous organes Leur teneur est très variable, généralement comprise entre 0.1% et 2 à 3 % du poids sec de la drogue.

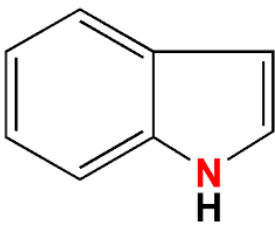
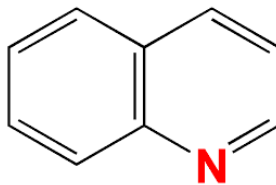
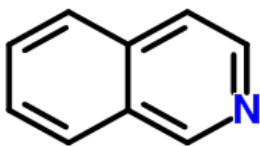
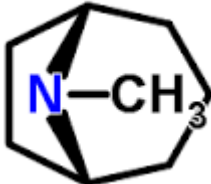
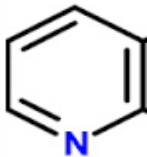
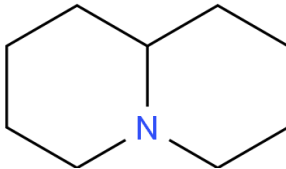
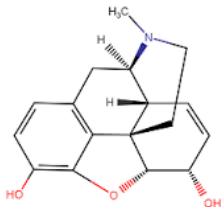
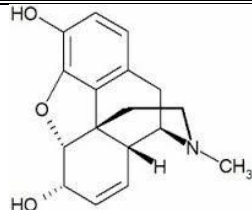
Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tanins [35].

➤ **Fonctions et propriétés**

Les alcaloïdes sont des molécules très intéressantes au point de vue biologique car certaines sont le principe actif de plusieurs extraits de plantes anciennement utilisés comme médicaments, comme poisons ou encore comme psychotropes. Insolubles ou fort peu solubles dans l'eau; ils sont solubles dans l'alcool plus à chaud qu'à froid, l'éther, les acides et dans l'ammoniaque [35].

Les principaux cycles azotés des alcaloïdes sont de type a, b, c, d, e, f, g et h :

Tableau 05: Les principaux cycles azotés des alcaloïdes [35].

 <p>Indole (a)</p>	 <p>Quinoline (b)</p>
 <p>Isoquinoline (c)</p>	 <p>Tropane (d)</p>
 <p>Pyridine (e)</p>	 <p>quinolizidine (f)</p>
 <p>morphine (g)</p>	 <p>Solanidine(h)</p>

4. Activité antibactérienne

4.1. Généralités

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique (produit par un microorganisme ; champignon microscopique ou bactérie...), synthétique ou semi-synthétique, qui agit sélectivement à faible concentration et en quelques heures sur une étape du métabolite bactérien sans exercer habituellement un effet toxique pour les organismes supérieurs [36].

4. 2. Activité antibactérienne de *Pleurotus eryngii*

Macrofungi ont longtemps été utilisé comme une source de nourriture précieuse et médecines traditionnelles du monde entier depuis l'antiquité, en particulier au Japon et en Chine. D'après la bibliographie notre champignon *Pleurotus eryngii* a des propriétés antibactériennes, dont il existe de très nombreuses maladies qui sont causées par des bactéries, y compris le choléra et le tétanos [37].

4.3. Souches bactérienne utilisées dans ce travail

4. 3.1. *E. coli*

Escherichia coli est un bacille à gram négatif [38], de forme non sporulée, de type anaérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm [39].

Les bactéries appartenant à l'espèce *E. coli* constituent la majeure partie de la flore microbienne aérobie du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Certaines souches sont virulentes, capables de déclencher spécifiquement chez l'homme ou chez certaines espèces animales des infections spontanées des voies digestives ou urinaires ou bien encore des méningites néo-natales. D'autres souches appartiennent à la flore commensale peuvent être responsables d'infections opportunistes variées, surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies [38].

4. 3.2. *Staphylococcus aureus*

Les espèces *Staphylococcus aureus* sont des *cocci* à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0.8 à 1 μm . Elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* produisent un pigment jaune doré [38]. *S. aureus* représente est la cause de méningite, ostéomyélite et la diarrhée [39].

4.3.3. *Klebsiella pneumoniae*

Les *Klebsiella* sont des bacilles à Gram négatif, toujours immobiles, de dimensions comparables à celles d'*Escherichia coli*, très souvent encapsulés. Cette capsule de nature polysaccharidique contient des acides hexuroniques (acides glycuronique et galacturonique), et de 2 à 4 sucres (galactose, glucose, mannose, rhamnose) [40].

4.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Les espèces *Pseudomonas aeruginosa* sont des bacilles à Gram négatif, ces bactéries fines sont de 1.5 à 3 μm de long et 0.5 à 0.8 μm de large. Elles sont mobiles grâce à une ciliature de type polaire monotriche.

P. aeruginosa ne forme ni spores ni sphéroplastes. Elle est responsable de 10 % de l'ensemble des infections nosocomiales, occupant le 3^{ème} rang après *E. coli* et *S. aureus*, mais le 1^{er} rang pour les infections pulmonaires basses et le 3^{ème} rang pour les infections urinaires [41].



**Matériel
et
Méthodes**



Matériel et méthodes

1. Matériel fongique

1.1. Identification de champignon

La partie expérimentale de ce travail a porté sur le champignon comestible *Pleurotus eryngii* « Pleurote du panicaut », qui a été identifié par Mr LOUNIS YOUSEF KHODJA, maître assistant « A » : laboratoire de mycologie de biotechnologie et de l'activité microbienne, département de biologie appliquée FSNV. Université des Frères Mentouri Constantine.



Figure 08 : *Pleurotus eryngii*.

1.2. Récolte de matériel

Le champignon a été récolté durant la période allant du mois de SEPTEMBRE 2015 au mois d'OCTOBRE 2015, dans la région d'Aïn Fakroun, située dans la wilaya d'Oum El Bouaghi au nord-est d'Algérie.



Figure 09 : Carte géographique de la Zone de récolte.

1. 3. Conservation du champignon

Les échantillons *Pleurotus eryngii* fraîchement récoltés sont nettoyés puis laisser sécher à 45⁰C et pulvérisés puis conservés [42]

2. Méthodes

2.1. Criblage des métabolites secondaires

Le criblage des métabolites secondaires est un test qualitatif qui permet de mettre en évidence les composés chimiques, tel que : Les alcaloïdes ; Les saponines ; Les poly phénols ; Les flavonoïdes ; Les quinones ...

2. 1.1. Préparation de l'infusé pour le criblage des flavonoïdes, les polyphénols et les tanins

Nous avons broyé 5g du champignon, dans un bécher, nous avons introduit le broyat dans 100ml d'eau distillée puis nous avons agité vigoureusement.

Le mélange a été introduit dans un bain marie à 90°C pendant 15 min. La suspension a été filtrée afin d'obtenir un infusé concentré a 5% [43].

a) Criblage des flavonoïdes

❖ Réaction à la cyanidine

-Test 01

Dans un tube à essai contenant 2 ml de l'infusé nous avons introduit 5 ml d'HCL concentré à 50% dans l'EtOH (alcool chlorhydrique). Ensuite, nous avons ajouté 1 ml de l'alcool iso-amylque puis 1 ou 2 rognure de magnésium.

La présence d'une coloration rose orange (flavone) ou rose violacé (flavonone) ou rose cerise indique la présence de flavonoïde libre.

-Test 02

A 5 ml de l'infusé, nous avons ajouté 5 ml d'une solution d'HCL concentré à 50% dans l'EtOH. Ensuite, ajouter 1 ml de l'alcool iso-amylque. Après 15 min de

chauffage au bain marie, l'apparition d'une coloration rouge (rouge cerise) est caractéristique de la présence des flavonols et flavanols (leucoanthocyanes).

b) Mise en évidence des polyphénols

❖ Test au Chlorure Ferrique

Un volume de 2.5 ml de l'infusé et 0.5 ml d'une solution aqueuse de FeCl_3 concentré à 1 % sont mélangés. La présence de composé phénolique provoque la formation de couleur noirâtre.

c) Mise en évidence des tanins condensés

❖ Révélation par le réactif de stiasny

La mise en évidence des tanins condensés a été effectuée par l'utilisation du réactif de stiasny (10ml de formaldéhyde et 5 ml d'acide chlorhydrique concentré) dont le principe est le suivant : à 10 ml de l'infusé nous avons ajouté 5ml du réactif de stiasny. L'apparition d'un précipité rouge confirmerait la présence des tanins dans le milieu.

2.1.2.1. Criblage des tanins catéchiques

5g du champignon a été broyé et introduit dans un bécher contenant 20 ml de MeOH, le mélange a été agité pendant 15 min. Dans tube à essai, nous avons introduit 2.5ml de l'extrait obtenu et 1 ml d'une solution de FeCl_3 à 1% (1g de FeCl_3 et 100 ml de MeOH).

L'apparition d'une coloration verdâtre est caractéristique de la présence des tanins catéchiques [44].

2.1.3. Criblage des triterpènes

❖ Réaction de Lieberan-Burchard

Le criblage des triterpènes est fondé sur la réaction de Lieberan-Burchard. L'extrait est tout d'abord réalisé à partir d'une macération pendant 24 heures de 1g de poudre de l'échantillon dans 20ml d'éther éthylique. Nous avons additionné 10 ml du macéré évaporé dans 1ml de CHCl_3 , après dissolution les solutions sont transférées dans des tubes à essais auxquels sont ajoutés 2ml d' H_2SO_4 .

La réaction est effectuée à froid. La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet, traduit la présence de triterpène [45].

2.1.4. Mise en évidence des saponosides

Après broyage d'1 g du champignon, le broyat est introduit dans un erlenmeyer contenant 100 ml d'eau distillée. Le mélange est placé au bain marie à 90°C pendant 30min. Le décocté obtenu est filtré à l'aide d'un papier filtre [45].

❖ Indice de mousse (Im)

La caractérisation des saponosides est basée sur l'apparition des mousses après agitation des extraits. L'indice de mousses (Im) est la technique la plus abondante pour la confirmation de la présence des saponosides.

Dans une série de 11 tubes à essais sont introduites successivement les mêmes quantités selon le tableau :

Tableau 06: Gamme de dilution décroissante du décocté pour la mesure de l'indice de mousse.

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Décocté (ml)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Eau (ml)	10	9.5	9	8.5	8	7.5	7	6.5	6	5.5	5

Après une agitation vigoureuse pendant 15 secondes d'un tube à essai contenant quelque millilitre d'extrait aqueux. On laisse les tubes au repos pendant 10 min; il se forme une mousse persistante en présence des saponosides.

L'hauteur de la mousse permet de calculer l'indice de mousse (Im) :

$$Im = \text{inverse } C \times D$$

C : concentration initiale de l'extrait.

D : dilution dans le tube ou la mousse >1

2.1.5. Mise en évidence des quinones

1g du champignon sec est broyé et placé dans des tubes avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole après agitation et un repos de 20 heures, les extraits sont filtrés.

La présence de quinones libre est confirmée par l'ajoute de quelques gouttes de NaOH (1/10), lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge au violet [47].

2.1.6. Mise en évidence des alcaloïdes

❖ Préparation de la solution à analyser

Introduire 5g du champignon sec et finement pulvérisé dans un erlenmeyer. Ajouter 25 ml d'acide sulfurique concentré H_2SO_4 dilué au 1/10 avec de l'eau distillée puis boucher. Agiter et laisser macérer 24 h à la température du laboratoire.

Filtrer sur papier et laver à l'eau de manière à obtenir 25ml de filtrat. [48]

❖ Réactions de caractérisation

Introduire 1 ml du filtrat dans 5 tubes à essais, y ajouter 5 gouttes de chacun des réactifs suivants ont été préparé comme suit :

-Réactif de Mayer : Chlorure de mercure 1.36g, Iodure de potassium 5g, l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

- Réactif de Wagner : d'iode 1.27g, d'iode de potassium 2g, d'eau distillée jusqu'à 100ml.

- Réactif de Hager : acide picrique 1.5g, l'eau distillée jusqu'à 100 ml

- Réactif de Dragendorff : Il s'agit d'un mélange (v/v) de deux solutions A et B : « **solution A** : (Nitrate de bismuth 1.7g, Acide tartrique concentré 20g, l'eau distillée jusqu'à 100 ml) + **solution B** : (Iodure de potassium 10g, L'eau distillée 100 ml

Selon les travaux de PIERRE.L, la formation d'un précipité indique la présence des alcaloïdes

[49]. Avec la réaction de Mayer la présence des alcaloïdes est remarquée avec la formation d'un précipité « blanc-jaunâtre », et un précipité « rouge brique foncé » avec la réaction de Wagner, la réaction Hager donne un précipité jaune en présence des alcaloïdes et avec Dragendorff un précipité rouge-orangé.

2.1.7. Les Dérivés Anthracéniques [49]

- ❖ **Extrait chloroformique :** A 1 g du champignon sec en poudre, ajouter 10 ml de chloroforme et chauffer au bain-marie pendant 3 min, filtrer à chaud et compléter à 10 ml si nécessaire.
- ❖ **Hydrolysât :** A une partie du résidu de la poudre du champignon épuisée par le chloroforme, ajouter 10 ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentré. Maintenir le tube à essai dans le bain-marie bouillant pendant 15 min. Refroidir sous un courant d'eau et filtrer. Compléter à 10 ml avec l'eau distillée.
- ❖ **Caractérisation :**

2.1.7.1. Dérivés anthracéniques libres

1 ml d'extrait chloroformique plus 1 ml de NH_4OH dilué puis agitation; la coloration plus ou moins rouge indique la présence d'antraquinones libres.

2. 1.7.2. Dérivés anthracéniques combinés

a) O-hétérosides (anthraquinones)

Prélever 5 ml d'hydrolysât et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué. Agiter, la présence d'antraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense.

b) O-hétérosides à génines réduites

5 ml d'hydrolysât plus 3 à 4 gouttes de FeCl_3 à 10 %, chauffer pendant 5 min au bain-marie. Refroidir, agiter avec 5 ml de chloroforme. Soutirer la phase chloroformique et l'introduire dans un tube à essai, ajouter 1 ml de NH_4OH dilué et agiter. En présence de produits d'oxydation, la coloration rouge est plus intense.

c) C-hétérosides

Reprendre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides par 10 ml d'eau distillée et ajouter 1 ml de FeCl_3 à 10%. Maintenir le tube à essai dans un bain-marie bouillant pendant 30 min, refroidir et agiter avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique dans un tube à essai. Ajouter 1 ml de NH_4OH dilué et agiter. Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines de C-hétérosides.

2.2. Extraction

2.2.1. Préparation des extraits

Le champignon *Pleurotus eryngii* a été séché et broyé sous forme d'une poudre fine (100g) et mis à macérer dans un méthanol à l'aide d'un chauffage à reflux pendant 8 heures.

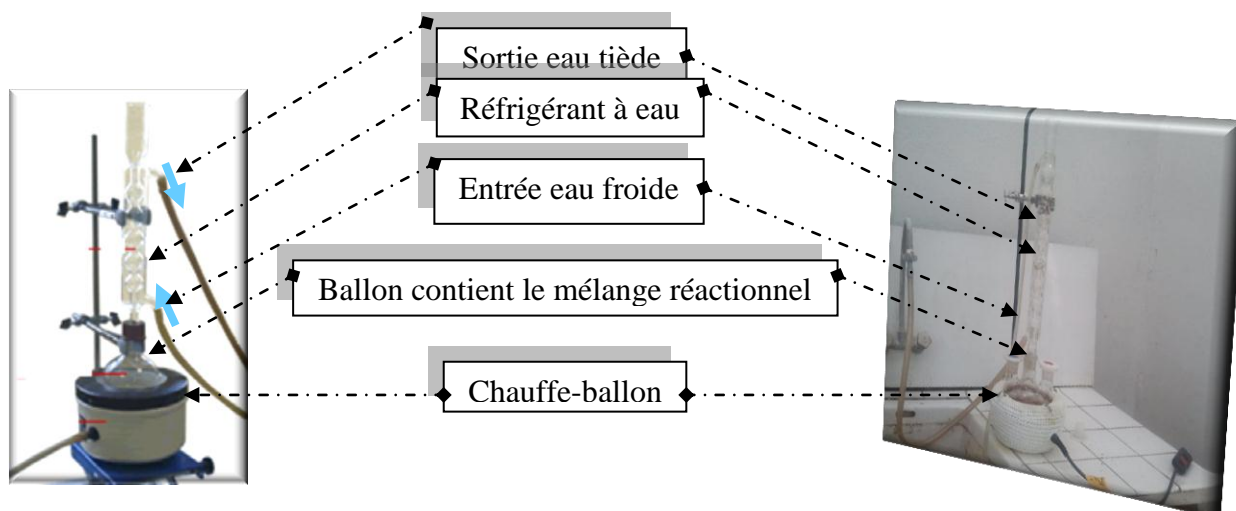


Figure 10 : Chauffage à reflux .

Après filtration sous vide ; le filtrat obtenue à été resuspendu dans l'eau distillé et épuisée successivement par une extraction liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants non miscible à l'eau avec une polarité croissante en commençant par : Ether de pétrole « utilisé pour extraire les composés non phénolique : acide gras ; les huiles.. » ; Puis l'acétate d'éthyle « utilisé pour extraire les composés moyennement polaire tell que les terpènes ;les alcaloïdes ; les acides phénolique ; flavonoïdes aglycone et les mono-glucosides » ; et le dernier solvant est le n-butanol « cette extraction entraine le reste des composés polaire tel que les flavonoïdes di-o et tri-o glycosides et les C glycosides.

Les trois phases organique récupérées « phase d'éther de pétrole ; d'acétate d'éthyle et la phase de n-butanol » sont évaporés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à des températures « 50°C.40°C ; 60°C » successivement.

Nous avons récupéré les trois extraits sec par le méthanol afin de savoir leurs profils chromatographique et évaluation leur pouvoir antibactérien [42]

Ce protocole est résumé dans le planning suivant qui montre les différentes étapes d'extraction :

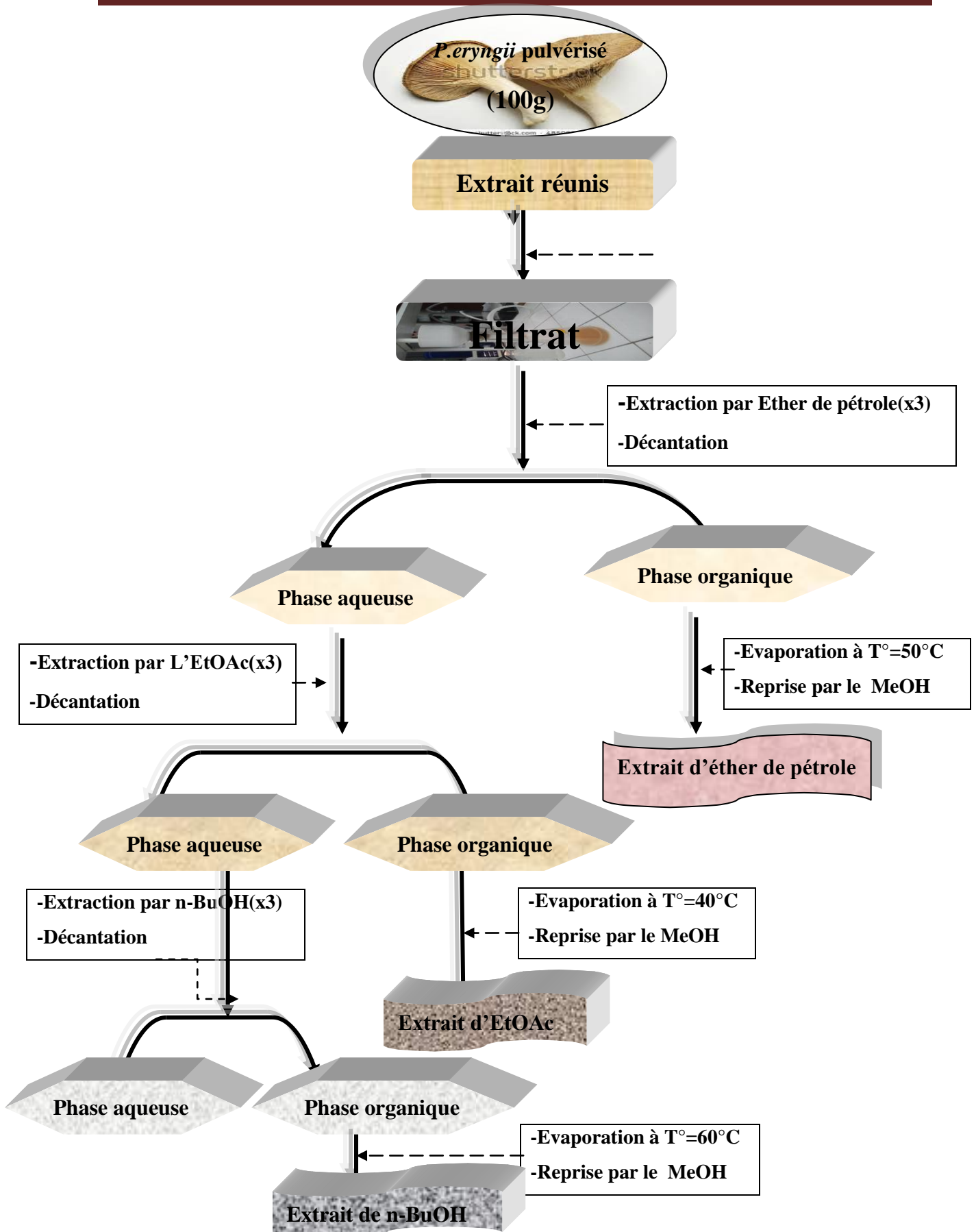


Figure 11 : Organigramme récapitulatif des étapes d'extraction des métabolites secondaires du *Pleurotus eryngii*.

2.2.2. Détermination du rendement

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale du champignon soumise à l'extraction [42].

$$R\% = \frac{\text{masse d'extraction}}{\text{masse de l'extrait sec}} \times 100$$

2.3. Chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites [50].

-Principe

Elle repose principalement sur le phénomène sélectif des composants, la migration (verticale) est fonction de la polarité des substances, de la polarité de l'éluant (phase mobile) et du pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire [52]. De ce fait nous avons utilisé cette technique pour la mise en évidence des différents métabolites extraite à partir du notre échantillon *Pleurotus eryngii*.

-Protocol expérimentale

Mettre en évidence des métabolites à partir des trois extraits « Ether de pétrole ; Ether d'acétique ; n-butanol » ; nous avons réalisé la séparation par CCM suivant les étapes décrites ci-dessous :

- Les plaques de gel de silice (60 F 254, Merck), sont découpées selon les dimensions suivantes ; 10cm de largeur pour 20cm de hauteur.
- Nous avons tracé au crayon gris, délicatement, la ligne de dépôt, à environ 1.5 cm du bord inférieur de la plaque à chromatographie. On repère la position des dépôts à effectuer sur la ligne tracée précédemment par des lettres qui désignent les extraits, (Ex1, Ex2, .Ex3) en veillant à les espacer régulièrement.
- Introduit l'éluant (système solvant) dans la cuve à chromatographie, de manière à ce que son niveau atteigne une hauteur d'environ un centimètre. On couvre la cuve avec un couvercle hermétique. « Plusieurs systèmes solvants, tirées à partir de la

bibliographie, ont été utilisés pour mieux séparer les différents composés métaboliques éventuellement présents dans les extraits (Tableau 07) ».

- Déposer, à l'aide d'une micropipette (capillaire) sur la ligne de dépôt une goutte de chaque extrait de gauche à droite « Ether de pétrole ; Ether d'acétique ; n-butanol ». les dépôts sont espacés régulièrement afin d'éviter leur chevauchement lors de la migration. On peut concentrer les dépôts si nécessaire en répétant plusieurs fois les dépôts.
- L'éluant (système solvant) remonte par capillarité le long de la plaque. Lorsqu'il arrive à environ 1 cm du bord supérieur (front du solvant), on fait sortir la plaque de la cuve et on la sèche.
- Après ces étapes, on procède à la révélation des chromatogrammes sous lampe UV à 254nm.

Tableau 07: Les différents systèmes solvants utilisés pour la CCM de gel de silice.

	Systèmes solvants	Proportions	Références
Systèmes essayés	Chloroforme/Méthanol	(60/44 ; V/V)	[43]
		(50/50 ; V/V)	
		(30/70 ; V/V)	
		(70/30 ; V/V)	
Système choisis	Chloroforme/Méthanol	(90/10 ; V/V)	



● **Ex1** : Ether de pétrole

● **Ex2** : Ether d'acétique

● **Ex3** : n-butanol

Figure12 : Le développement du chromatogramme.

2.4. Etude de l'activité antibactérienne

2.4.1. Objectif

L'évaluation de l'activité antibactérienne d'un extrait passe par la méthode de diffusion sur disque (antibiogramme) qui est simple et pas coûteuse, et la plus utilisée en routine dans les laboratoires de bactériologie pour les tests de sensibilité aux antibiotiques [51].

Le but de cette manipulation est la recherche du pouvoir antibactérien des trois extraits obtenus « Éther de pétrole, Acétate d'éthyle et n-Butanol » de notre champignon *Pleurotus eryngii*.

L'activité antibactérienne a été testée vis-à-vis de quatre bactéries référencées provenant de l'*American Type Culture Collection* (ATCC). Et aimablement fournies par l'institut Pasteur à Alger. Il s'agit de trois bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC25923), et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) et *Klebsiella pneumoniae* (ATCC) ; et une bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC43300).

2.4.2. Test de l'activité inhibitrice

L'étude du pouvoir antibactérien par cette technique est identique à celui de l'antibiogramme, la seule différence c'est le remplacement des antibiotiques par des extraits obtenus [51].

Cette manipulation comporte plusieurs étapes :

➤ Préparation des dilutions

Les trois solutions ont été préparées en solubilisant les extraits secs d'éther de pétrole, d'acétate d'éthyle et le n-butanol dans (1ml, 20ml et 5 ml) du méthanol successivement afin d'obtenir les concentrations suivantes : 83.7mg/ml, 100mg/ml et 84.74mg/ml.

Nous avons testé l'activité antibactérienne des quatre concentrations différentes de chaque solution, dont nous avons réalisé des dilutions pour avoir des concentrations décroissantes. Les concentrations sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau08 : Les concentrations réalisées des trois fractions.

Les extraits méthanoliques	Ether de pétrole			Ether d'acétique			n-butanol		
	Concentration des solutions mère mg/ml	83.7			100			84.74	
Dilution	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
Concentration des dilutions mg/ml	41.9	20.9	10.5	50	25	12.5	42.4	21.2	10.6

➤ Préparation du milieu

-Le milieu standard utilisé est le Mueller-Hinton. l'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4mm répartie uniformément.

- Les boîtes sont pré-séchées avant l'emploi.

➤ Préparation des disques

- On utilise, dans cette méthode, le papier watman N°3 découpé sous forme de disque circulaire environ 6mm, afin d'obtenir une zone d'inhibition facile à mesurer.

-On place les disques dans un tube à essai autoclavé (20 min à 120°C).

➤ Préparation des inoculums

-Dans la zone septique du bec bunsen et à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement gélose MH, nous avons raclé à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester puis nous avons suivi les étapes suivantes :

- Décharger l'anse dans 5 ml d'eau distillée stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.
- L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ **Ensemencement et dépôt des disques**

Nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne, puis nous l'avons essoré en le pressant fermement(en le tournant) sur la paroi interne du tube, ensuite frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées. Cette opération a été répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement s'est achevé en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Nous avons rechargé l'écouvillon à chaque fois dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

- Des disques de papier Whatman de 6 mm de diamètre sont imprégnés ensuite dans 20µl de chaque dilution de l'extrait à étudiées puis déposés sur la surface de la gélose Mueller-Hinton par une pince stérile.

- Les boîtes de Pétri sont d'abord laissées pendant 1h à température ambiante pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h.

➤ **Lecture des antibiogrammes**

La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition, qui sont représentées par une auréole claire formée autours de chaque disque, elle a été réalisée à l'extérieur de la boîte pour les milieux MH. . Les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité [52] :

- ◆ (-) souche résistante ($D < 8$ mm).
- ◆ (+) souche sensible ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$).
- ◆ (++) souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm).
- ◆ (+++) dextrement sensible ($D > 20$ mm).

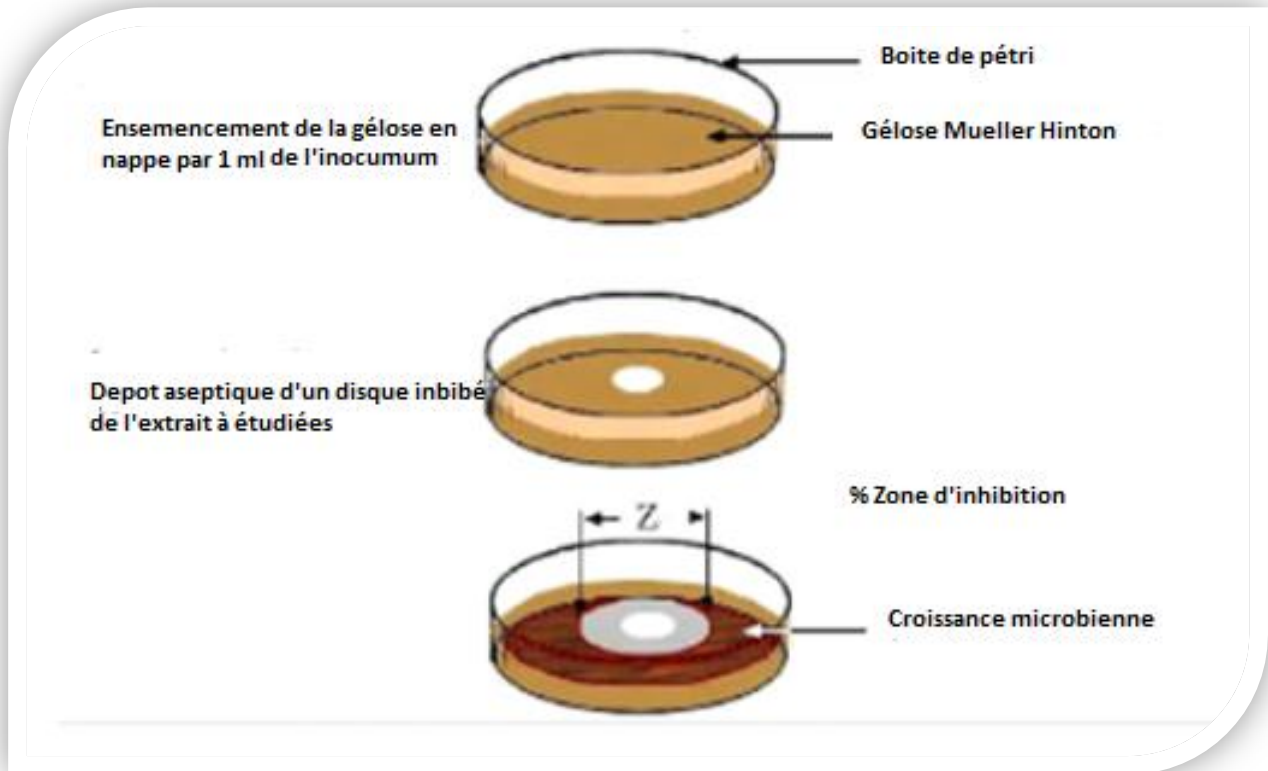


Figure 13 : Illustration de la méthode de diffusion de disque.



Résultats et Discussion



Résultats et Discussion

1. Criblage des métabolites secondaires

La mise en évidence de divers groupes de substances existants dans le champignon étudié a été basée sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactions spécifiques. Les tests de précipitation ont permis de mettre en évidence des différents métabolites secondaire successivement les tanins et les alcaloïdes tandis que les tests de coloration en solution pour mettre en évidence les flavonoïdes, les anthocyanes, les terpénoïdes et les quinones.

Les résultats de criblage des métabolites secondaires sont classés en fonction des différents critères d'observation, entre autre :

- Réaction positive : (+++) Très abondant.
- Réaction moyennement positive : (+) faible.
- Réaction négative :(-) absent.

Les résultats sont consignés dans les tableaux ci-dessous.

1.1. Recherche des flavonoïdes

➤ Test 01

Tableau 09: Mise en évidence des flavonoïdes de type «Flavone ou Flavonone » dans le *Pleurotus eryngii*.

Composés Résultats	Flavone	Flavonone	Test
Coloration	Rose orange	Rose violacés	Infusé+HCl +alcool iso amylique + rogneur de mg.
Résultats	(+)	(-)	

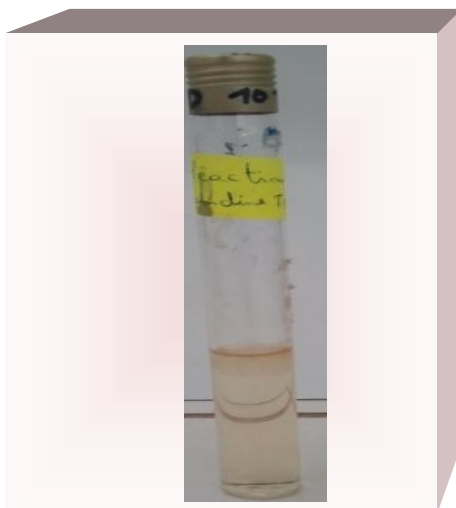


Figure 14 : Le résultat de Flavone.

➤ **Test 02**

Tableau 10 : Mise en évidence des flavonoïdes de type «flavonole et flavanole ».

Composés	Flavanole, flavonole	Test
Résultats	Rouge cerise	Infusé+HCl +alcool iso-amylque
Résultats	(-)	



Figure 15 : Le résultat des Flavonole et flavanole.

1.2. Recherche des polyphénols

Tableau 10: La mise en évidence des polyphénols.

Composés	Polyphénols	Test
Résultats	Noirâtre	Test au chlorure de ferrique
Coloration	(+)	



Figure 16 : Le résultat des polyphénols.

1.3. Recherche des tanins condensés

Tableau 11 : La mise en évidence des tanins condensés.

Composés	Tanins condensés	Test
Résultats	Précipité rouge	Infusé + réactif destiasny
Coloration	(-)	



Figure 17 : Le résultat des tanins condensés.

1.4. Recherche des tanins catéchiques

Tableau 12 : La mise en évidence tanins catéchiques.

Composés	Tanins catéchiques	Test
Résultats	Verdâtre	Extrait méthanolique + FeCl ₃
Résultats	(-)	

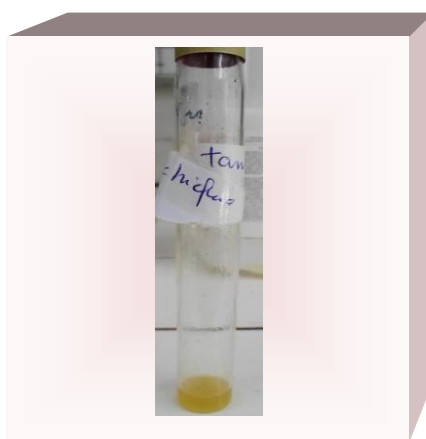


Figure 18: Le résultat des tanins catéchique.

1.5. Recherche des triterpènes

Tableau 13 : La mise en évidence des Triterpène.

Composés	Triterpène	Test
Résultats	anneau rouge brunâtre	Test de Lieberan-Burchard
Résultats	(+++)	

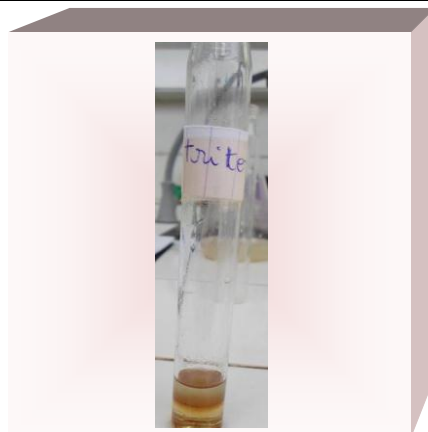


Figure 19 : Le résultat des Triterpènes.

1.6. Recherche des saponosides

Tableau 14 : La mise en évidence des saponosides.

Composés	Saponosides	Test
Résultats		
Coloration	Un mousse de 1cm	Décocté + eau
Résultats	(-)	



Figure 20 : Le résultat des saponosides.

1.7. Recherche des quinones

Tableau 15: La mise en évidence des quinones.

Composés	Quinones	Test
Résultats		
Coloration	jaune, rouge ou violet	quelque gouttes de NaOH(1/10)
Résultats	(-)	



Figure 21: Le résultat des quinones.

1.8. Recherche des alcaloïdes

Tableau 16: La mise en évidence des alcaloïdes.

Composés Résultats	Alcaloïdes	Test
Coloration	Précipite blanc-jaunâtre	réactif de Mayer
Résultat	(+++)	
Coloration	Précipite rouge –brique foncé	réactif de Wagner
Résultat	(+++)	
Coloration	précipite jaune	réactif de Hager
Résultat	(+++)	
Coloration	précipite rouge-orangée	réactif de Dragendorff
Résultat	(+++)	

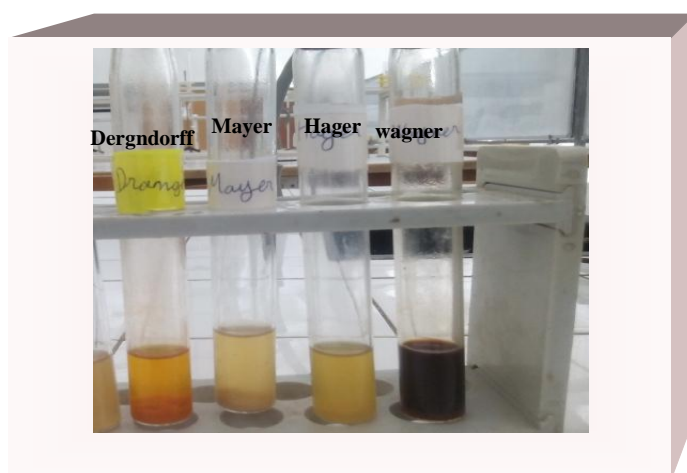


Figure 22: Le résultat des Alcaloïdes.

1.9. Recherche des anthracéniques libres

Tableau 17: La mise en évidence des anthracéniques libres.

Composés	anthracéniques libres	Test
Résultats		
Coloration	rouge	1 ml de NH ₄ OH dilué
Résultats	(-)	



Figure 23: Le résultat des anthracéniques libres.

1.10. Recherche des anthracéniques combinés

➤ O-hétérosides (anthraquinones):

Tableau 18: La mise en évidence des anthraquinones.

Composés	anthraquinones.	Test
Résultats		
Coloration	rouge	1 ml de NH ₄ OH dilué
Résultats	(-)	



Figure 24 : Le résultat des anthraquinones.

➤ O-hétérosides à génines réduites

Tableau 19: La mise en évidence des hétérosides à génines réduites.

Composés	hétérosides à génines réduites	Test
Résultats	rouge	1 ml de NH ₄ OH dilué
Résultats	(+)	



Figure 25 : Le résultat des hétérosides à génines réduites.

➤ C-hétérosides

Tableau 20: La mise en évidence des hétérosides.

Composés	hétérosides	Test
Résultats		
Coloration	rouge	1 ml de NH ₄ OH dilué
Résultats	(-)	

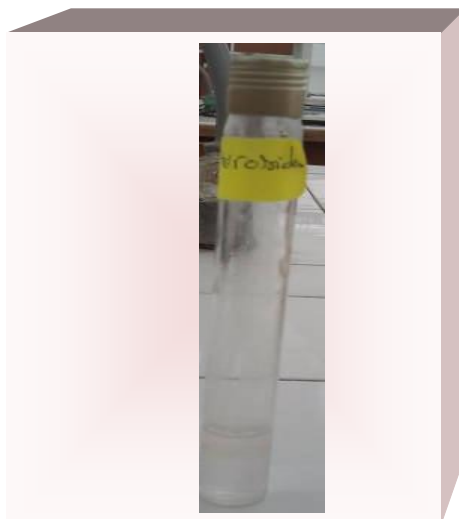


Figure 26 : Le résultat des hétérosides.

Nous avons résumé les résultats du criblage des métabolites secondaires obtenus à partir du notre champignon, dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Les résultats du criblage des métabolites secondaires.

Métabolites secondaires testé sur <i>Pleurotus eryngii</i>	Résultats
Triterpènes	(+++)
Alcaloïdes	(+++)
Flavone	(+)
Polyphénols	(+)
Hétérosides à génines réduites	(+)
Flavonone	(-)
Flavonole,flavanol	(-)
Tanins condensés	(-)
Tanins catéchique	(-)
Saponosides	(-)

Quinones	(-)
Antraquinones	(-)
Antracéniques libres	(-)

La recherche, des flavonones, des tanins, des saponosides, des quinones, des antracénique libre et même les hétérosides a été négative.

Il est à signaler que les flavones, les polyphénols et les hétérosides à génine réduite sont présents en faible quantité dans ce champignon. D'autre part nous avons aussi noté la présence des triterpènes et les alcaloïdes en quantités importantes dans l'échantillon.

Nos résultats concordent aussi avec les travaux de (Zhahui Xue et *al*, 2015) qui montre que le *Pleurotus eryngii* est riche en triterpènes [42].

2. Extraction et détermination des rendements

Rappelons que la préparation des extraits à partir du *Pleurotus eryngii* a été effectuée par des solvants à polarité croissante il s'agit d'éther de pétrole, acétate d'éthyle et le n-butanol

Cette extraction a permis d'obtenir trois extraits bruts (L'extrait d'éther de pétrole (EP), l'extrait d'acétate d'éthyle (AcOEt), l'extrait de n-butanol (n-BuOH)) qui ont été récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids.

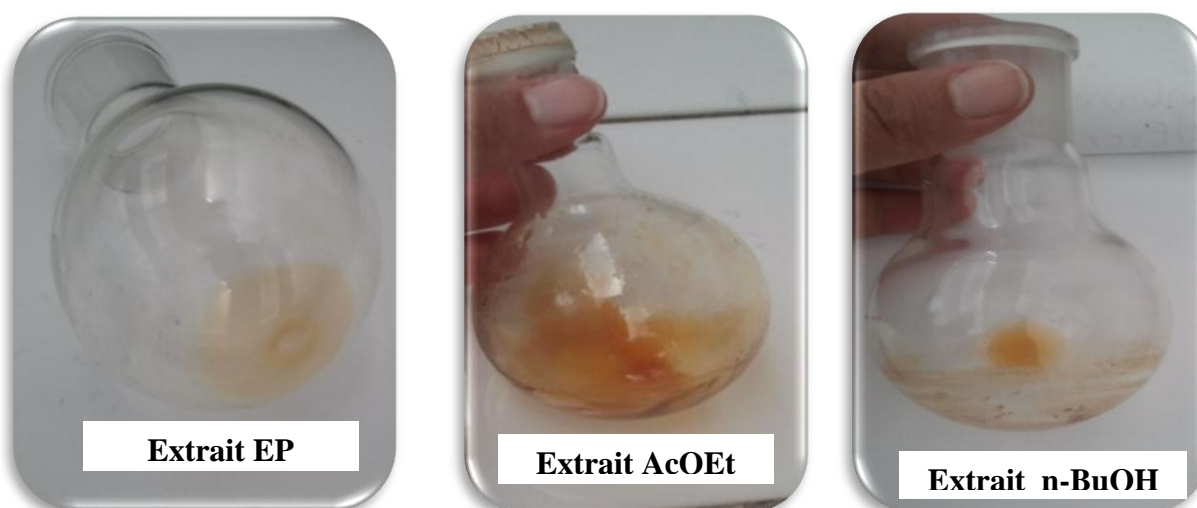


Figure 27 : Les extraits obtenus dans le *Pleurotus eryngii*.

Le rendement d'extraction désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant. Il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de 100g, ont été déterminés par la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{masse d'extraction}}{\text{masse de l'extrait sec}} \times 100$$

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 22 : Tableau récapitulatif regroupant les rendements des différents extraits.

Extrait	Poids (g)	Rendement %
éther de pétrole	0.0837	0.0837
acétate d'éthyle	2	2
n-butanol	0.4237	0.4237

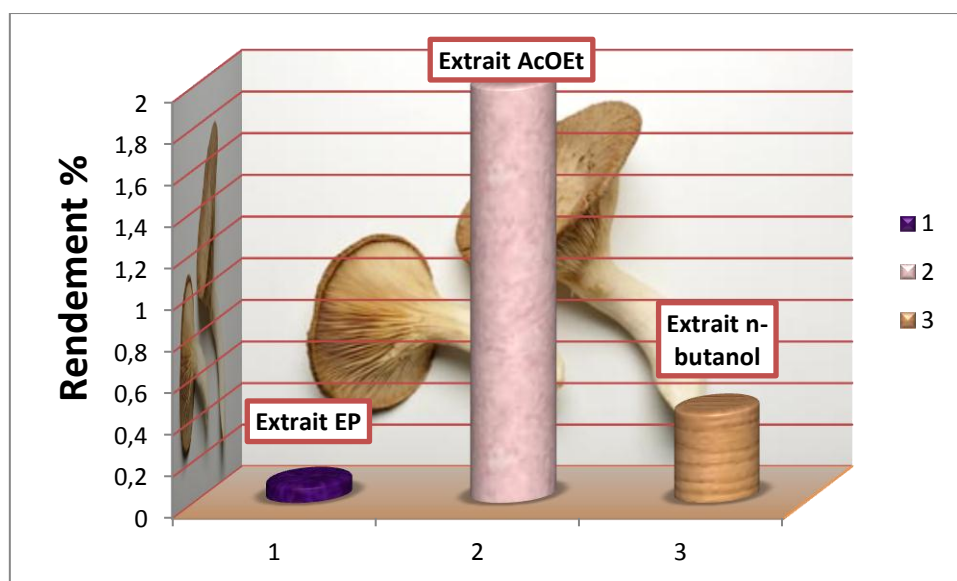


Figure 28 : Histogramme du rendement de l'extraction.

Les résultats obtenus pour les extraits bruts montrent que le rendement le plus élevé (2%) a été enregistré dans la phase Acétate d'éthyle, suivi par n-butanol (0.4237%), et finalement l'éther de pétrole (0.0837%) qui est le plus faible rendement.

3. Mise en évidence des extraits par la chromatographie sur couche mince

Pour avoir les empreintes des composants de nos extraits obtenus précédemment, et avoir une idée sur leurs compositions chimiques, une chromatographie analytique sur couche mince a été réalisée en utilisant un système solvant à différentes polarités. Sous lumière UV à 254 nm Les différentes taches de produits qui se présentent sur les chromatogrammes ont été délimitées.

Parmi les systèmes solvants testés, le système solvant (Chloroforme/Méthanol, (90/10 ; V/V)) a permis d'avoir une bonne séparation chromatographique et une visibilité acceptable des spots comme l'indique la figure 23.

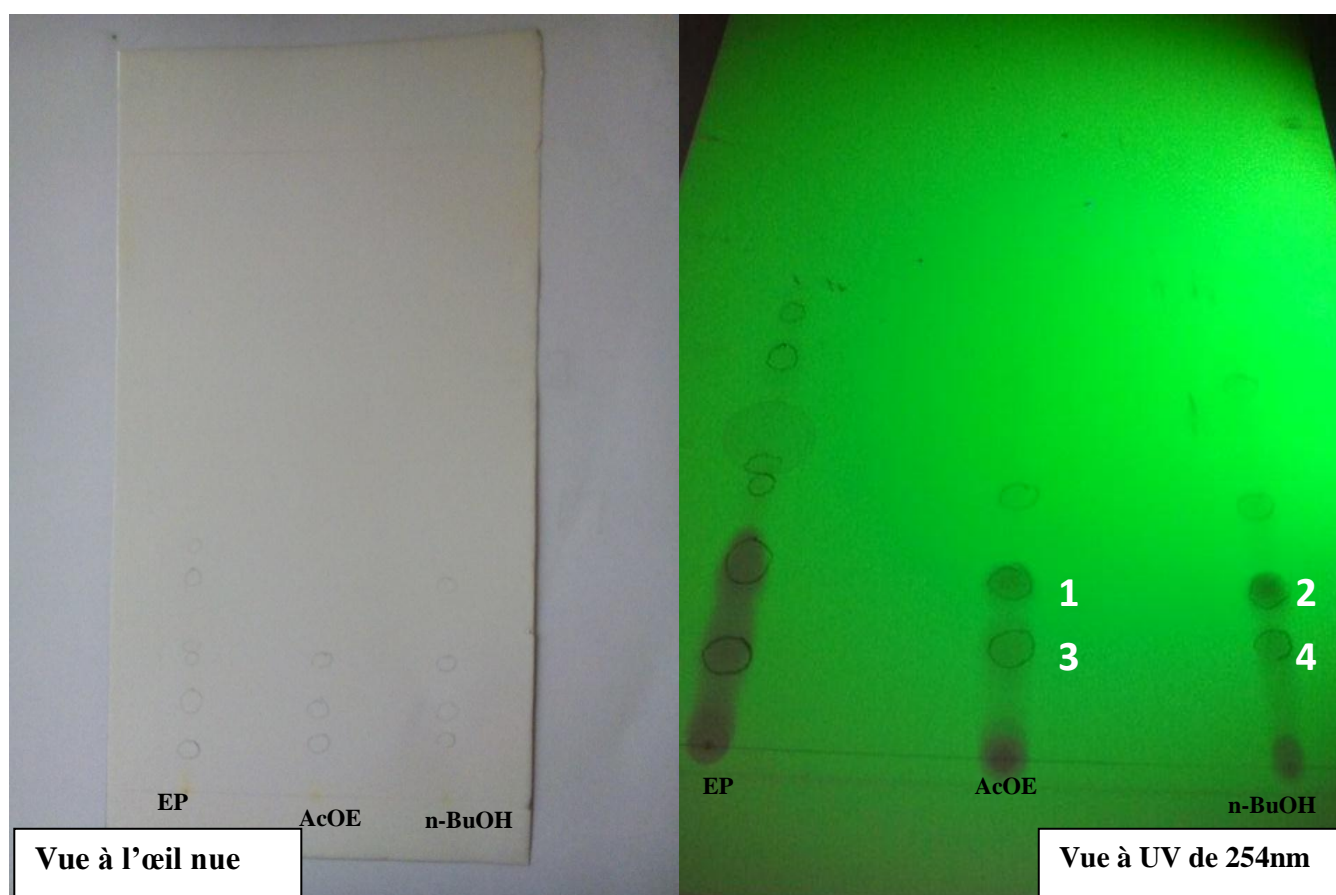


Figure 29: Chromatogramme sur couche mince des extraits du *Pleurotus eryngii*.

Suite à l'observation sous la lampe UV (254 nm), les résultats de CCM confirment la présence des métabolites secondaires dans les trois extraits extraire à partir du notre champignon *Pleurotus eryngii*.

Pour chaque extrait, on observe différents métabolites qui ont été migré selon leur polarité avec l'éluant (Chloroforme/Méthanol 90/10 ; V/V). Remarquant l'apparition des spots majoritaires pour les trois extraits, cela reflète l'existence d'une quantité importante des produits dans chaque tache.

D'après le chromatogramme on remarque aussi l'apparition des spots dans les mêmes niveaux pour les fractions AcOET et n-BuOH (1 et 2, 3 et 4 figures 25), cela est expliqué par l'existence de quelques métabolites dans les deux fractions à la fois.

4. Test d'activité antibactérienne des différentes fractions de l'extrait brut

Nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des extraits (éther de pétrole, acétate d'éthyle, n-butanol) par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosé solide (Muller Hinton) [52].

L'activité antibactérienne de nos extraits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les extraits du *Pleurotus eryngii* à tester vis-à-vis de quatre bactéries utilisées, après 24 heures d'incubation à une température adéquate de 37°C.

Les résultats obtenus sont dressés dans le tableau suivant :

Tableau 23 : Diamètres en mm des zones d'inhibition des l'extrait du pleurotus eryngii.

Souches bactériennes	Zones d'inhibition (mm)											
	Extrait éther de pétrole				Extrait acétate d'éthyle				Extrait n-butanol			
	SM	D ₁	D ₂	D ₃	SM	D ₁	D ₂	D ₃	SM	D ₁	D ₂	D ₃
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25923)	-	-	-	-	15	-	-	-	10	9	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC)	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	-	-
<i>klebsiella pneumoniae</i> (ATCC)	-	-	-	-	17	18	9	8	10	9	9	8
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC43300)	-	-	-	-	-	19	15	15	9	7	-	-

SM : solution mère de la concentration initial.

Résultats et Discussion

Pour mieux élucider le pouvoir antibactérien des différentes fractions des extraits méthanoliques de notre champignon, les diamètres de la zone d'inhibition sont représentés graphiquement sur des histogrammes suivants :

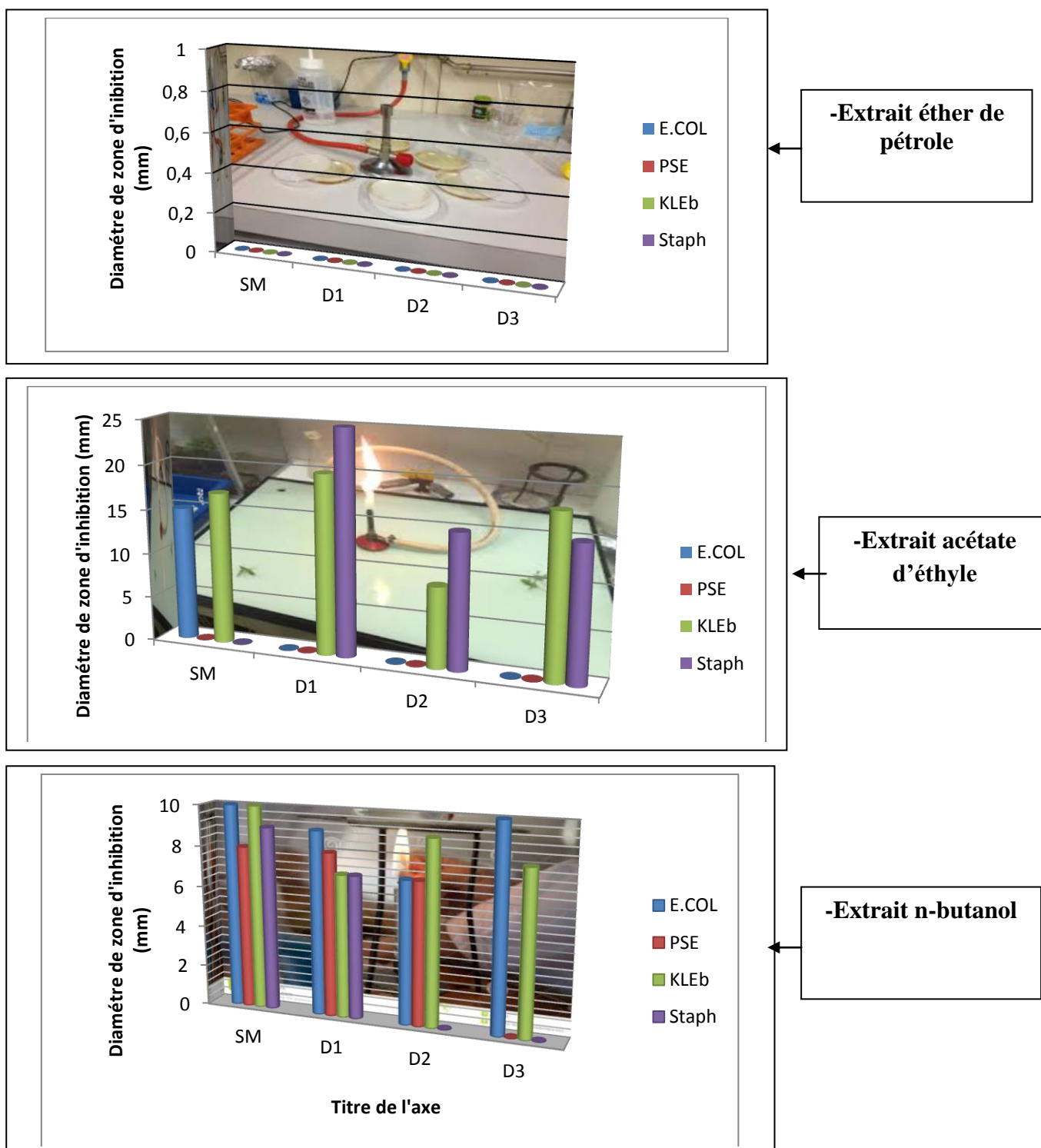


Figure 30 : Les histogrammes des diamètres des zones d'inhibitions des fractions de l'extrait brut du *Pleurotus eryngii* contre les différentes bactéries.

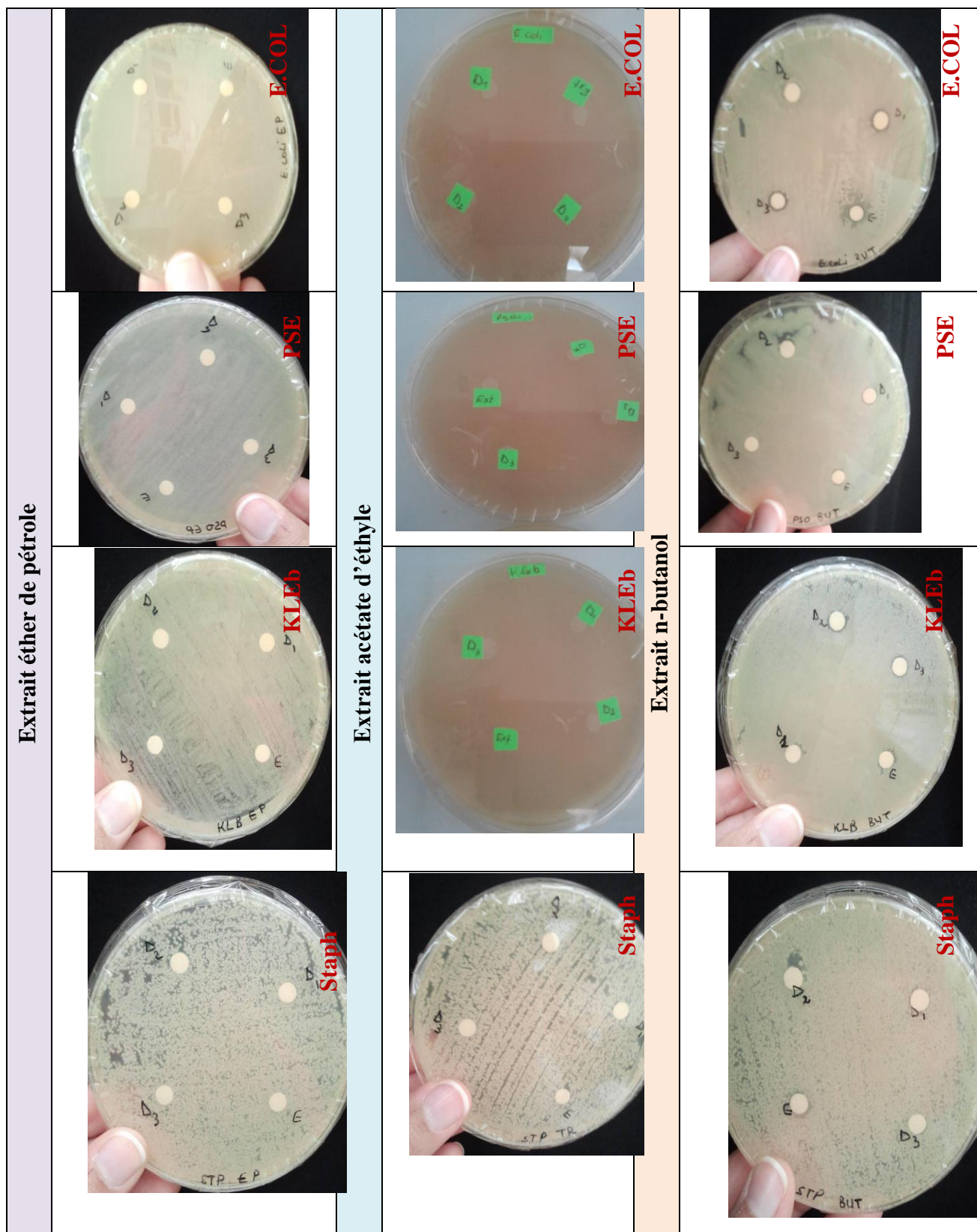


Figure 31 : Aspect d'inhibition des souches bactériennes par les extraits du *Pleurotus eryngii*.

Cette méthode a permis de déterminer l'action des trois fractions sur les bactéries, *Escherichia coli* (ATCC25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) et *klebsiella pneumoniae* (ATCC) et *Staphylococcus aureus* (ATCC43300). Cette action se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier préalablement imprégné d'extrait. Rappelons que les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité (partie matériel et méthodes page : 29).

D'après les résultats obtenus aucune zone d'inhibition autour des disques vis-à-vis les quatre bactéries, montre que ces bactéries possèdent un potentiel de résistance très élevés contre l'action antibactérienne de l'extrait d'éther de pétrole, même observation concernant la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* contre les métabolites extraire avec l'acétate d'éthyle, pour les trois autre bactéries (*Escherichia coli* ,*klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*),on observe des d'inhibition qui se différent par la concentration de l'extrait (AcOET),dont la meilleure activité est observé contre *Staphylococcus aureus* Gram positif avec une zone d'inhibition de 19 mm, on observe aussi une activité vis-à-vis *klebsiella pneumoniae* avec toutes les concentration testés.

La fraction de n-Butanol présente un pouvoir d'inhibition contre les quatre bactéries, le meilleur pouvoir est remarqué contre *klebsiella pneumoniae*, sachant que nous avons observé une zone d'inhibition avec les quatre concentrations.

Selon la littérature scientifique, la concentration de l'extrait à tester peut influencer son activité antibactérienne [54], pour cela nous avons testé l'activité des quatre concentrations pour chaque fraction, afin de ressortir la concentration présentant la meilleur zone d'inhibition.



Conclusion

Conclusion

En Algérie et par tout dans le monde, les médicaments traditionnels sont utilisés pour traiter les maladies chroniques et aiguës, dans les zones rurales et urbaines. L'intérêt pour les thérapeutiques traditionnelles n'est pas nouveau, mais il s'est accru ces dernières années du fait des progrès introduits notamment grâce aux nouvelles stratégies incluant des disciplines nouvelles telles que : l'ethnopharmacologie les criblages biologiques robotisés et l'accès aux bases de données bibliographique, et du renouveau d'intérêt pour les ressources renouvelables et pour la médecine traditionnelle.

Dans ce travail, notre intérêt s'est porté sur une étude des métabolites secondaires du champignon *Pleurotus eryngii* connu sous le nom du Pleurote du panicaut du nord-est Algérie. A coté des plantes médicinales les champignons représentent une source inépuisable de composés naturel bioactifs.

Les résultats du criblage des métabolites secondaires indiquent que le *Pleurotus eryngii* est riche en alcaloïdes et les triterpènes, nous avons remarqué aussi la présence des flavones, des polyphénols et les hétérosides à génine réduite en faible quantité.

Après avoir réalisé le criblage, une extraction générale des métabolites a été effectuée sur 100g du champignon, en utilisant trois solvants d'extraction qui se diffèrent par leur polarité : Ether de pétrole, Acétate d'éthyle et le n-butanol dont le rendement de chaque fraction est de : 0.0837%, 2% et 0.4237% respectivement.

Les résultats de l'analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (CCM) ont montré également la présence de ces composés dans les trois fractions.

Enfin nous avons étudié *in vitro* le pouvoir antibactérien des trois fractions, par la méthode de diffusion contre quatre bactéries référenciés (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*), la fraction dont le solvant d'extraction est le n-butanol présente une activité inhibitrice vis-à-vis les quatre souches bactériennes, la fraction d'acétate d'éthyle présente une activité antibactérienne contre trois souches, (*Escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*) et aucune activité inhibitrice remarquée sur les quatre bactéries avec l'extrait d'éther de pétrole.

Sur la base de ces résultats préliminaires, nous envisageons d'approfondir l'étude sur les métabolites secondaires du champignon *Pleurotus eryngii*, en réalisant une purification des

produits extraits par différentes méthodes chromatographiques, et concernant l'étude biologique, nous sommes intéressés de tester l'activité anticancéreuse des composés éventuellement isolés par ce champignon.

Liste des références

- [1] **Garcia S. (2009)**. Propriétés thérapeutiques des champignons comestibles. *La phytothérapie européenne*. **52** : 11-15.
- [2] **Han E., Hwang Y., Kim H., Choi J Et Yang J. (2011)**. *Inhibitory effect of Pleurotus eryngii extracts on the activities of allergic mediators in antigen-stimulated mast cells. Food and Chemical Toxicology*.**49** :1416-1425.
- [3] **Kyung H., Trung K., Kyung R L Et Tae S. (2014)**. *Appraisal of Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Various Extracts from the Fruiting Bodies of Pleurotus florida. Journal of Molecules*.**19** :3310-3326.
- [4] **Yang Z., Xu J., Fu Q., Song B. (2013)**. *Antitumor activity of a polysaccharide from Pleurotus eryngii on mice bearing renal cancer. Carbohydrate Polymers*. **95** : 615-620.
- [5] **Kerfez K., Brik O. (2015)**. Culture et clonage d'un tissu de champignon de paris (*Agaricus bisporus*) .mémoire de master. Université constantine1.
- [6] **Pomerleau R. (1980)**.La Flore des Champignons du Québec. Éditions La Presse, Montréal. 653.
- [7] **Pete O. (2005)**.La culture des champignons à petite échelle.Agrodog . a journal Van Nieuwenhuijzen Bram.**40** :79.
- [8] [http://www.memoireonline.com/.../Bioconversion enzymatique des composes phenoliques des effluents issus de l'extraction d'huile .html](http://www.memoireonline.com/.../Bioconversion_enzymatique_des_composes_phenoliques_des_effluents_issus_de_l_extraction_d_huile.html) .consulté le : 23/03 /2016.
- [9] [http : // www.phytobiotech.in/brochure/pleurotus.pdf](http://www.phytobiotech.in/brochure/pleurotus.pdf) . Consulté le : 22/03/2016.

[10] [http:// www.commentfaiton.com/.../comment reconnait on une pleurote](http://www.commentfaiton.com/.../comment_reconnait_on_une_pleurote). Consulté le : 02/04/2016.

[11] <http://www.medicalmushrooms.net/pleurotus-eryngii/>. consulté le : 30/03/2016.

[12] [http://www.soignez-vous.com/.../champignons médicinaux la phytothérapie](http://www.soignez-vous.com/.../champignons_medicinaux_la_phytotherapie).consulté le : 05/04/2016.

[13] <http://fungi-natura.fr/content/23-mycotherapie>.consulté le : 08/04/2016.

[14]<http://champignon-contre-metastase.e-monsite.com/pages/les-pleurotus-ou-pleurotes.html>. Consulté le : 15/04/2016.

[15] <http://coffeemillionaire.patrickgermano.com/?paged=5>. Consulté le 15/04/2016.

[16] http://old.seniorweb.fr/IMG/pdf/Anti_KC_David_S-S_PDF.consulté le 15/04/2016.

[17] **Wang H. (2004)**. *Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom Pleurotus eryngii*. *Peptides*. **25** : 1-5.

[18] **Akyuz M., Kirbag S. (2009)**. *Antimicrobial activity of Pleurotus eryngii var. ferulae grown on various agro-wastes*. *EurAsian Journal of BioSciences*. **3** : 58-63.

[19] **Akyuz M., Kirbag S. (2010)**. *Effect of various agro-residues on nutritive value of Pleurotus eryngii (DC. ex Fr.) Quel. Var. ferulaeLanzi*. *Journal of Agricultural Sciences*. **16** : 83-88.

[20] **Akyuzm., Onganer A., Erecevit P et Kirbag S. (2010).** *Antimicrobial activity of some edible mushrooms in the eastern and southeast Anatolia region of Turkey. Gazi University Journal of Science.* **23(2)** : 125-130.

[21] **Oke., F. Aslim B. (2011).** *Protective effect of two edible mushrooms against oxidative cell damage and their phenolic composition. Food Chemistry.***128** : 613-619.

[22] **Boudjerda Z. (2013).** Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires de *Achillea ligustica* (Anthemideae) , et *Ranunculus cortusifolius* (Ranunculaceae) .Diplôme de Doctorat d'Etat En Chimie Organique Option: Phytochimie .Université Mentouri-Constantine. 40_41.

[23] **Makkar S., Siddhuraju P Et Becker K. (2007).** *Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology; Ed: HUMANA PRESS.* **393**: 67-111.

[24] **Walton N., Brown D. (1999).** *Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products; Ed: world scientific.***43** :1-14.

[25] **Daayf F., Lattanzid V. (2008).** *Recent Advances in Poly phenol Research 1; Ed: Wiley-Blackwell.***31**:1- 24.

[26] **Lamarti A., Badoc A., Deffieux G et Carde J. (1994).** Biogénèse Des Monoterpènes La Chaîne Isoprénique. Bull. Soc. Pharm. Bordeaux. **133** : 79 – 99.

[27] **Crozier A., Jaganath Ib., Clifford Mn. (2006).** *Phenols, polyphenols and tannins: An overview. In: Crozier A, Clifford MN, Ashihara H, editors. Plant secondary metabolites: Occurrence, Structure and Role in the human diet. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p. 1–24.*

[28] **Karabin M., Tereza Hudcova., Lukas Jelinek et Pavel Dostalek. (2015).** *Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. Department of Biotechnology, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, Technická 5, 166 28 Prague 6, Czech Republic.*

[29] **Yao L., Jiang Y., Shi J., Tomas B., Datta N., et Al. (2004).** *Flavonoids in food and their health benefits. Plant foods Hum Nutr 59: 113-122.*

[30] **Harrar A. (2012).** Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. Diplôme de Magister Biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbes-Sétif. 8_31.

[31] **Boudjouref M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Mémoire Pour l'obtention du diplôme de Magister En Biochimie. Université Ferhat Abbes, Setif. 9_28.

[32] **Guessoum D. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes Chez *Urtica dioica* L. et évaluation de leur Pouvoir antibactérien. Mémoire de master, université de Constantine 1.p :40.

[33] **Boubekri C. (2014).** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de

[34] **Kissoum A., Khalifaoui K (2015).** Evaluation phytochimique et étude des activités biologiques d'une plante médicinale Algérienne (*Foeniculum vulgare*) université de Constantine 1.p :7.

[35] **Aref M. (2015).** Contribution à l'étude phytochimique, les activités biologiques (Antioxydante et Antibactérienne) d'une plante médicinale *Cleome arabica* L (Région d'Oued Souf). universite echahid hamma lakhdar d'el-oued p : 13.

[36] [http// www.phytobiotech.in/brochure/pleurotus.pdf](http://www.phytobiotech.in/brochure/pleurotus.pdf) consulté le: 08/04/2016.

[37] **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Et Ouarkorich M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. Médecine du Maghreb .91 :5-12

[38] **Patrick B., Jean L., Et Michel S. (1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris.p :100-108-274.

[39] **Steven. P., Rachel. C., Martha. E., Paul. H., Jane. S., Et Peter W.J. (2004).***Microbiology of Waterborne Diseases. Ed Elsevier Academic Press.* P :71-132.

[40] **Richard C., Grimont F. (1992).***Klebsiell Enterobacter, Hafnia, Serratia, In* : LE MINOR (L).Bactériologiemédicale, Paris : Flammarion.41 :427-31.

[41] **Richard C ., Kiredjian M. (1995).** Méthodes de laboratoire pour l'identification des bacilles à gram négatif aérobies stricts: *Pseudomonas, Alcaligenes, Flavobacterium, Acinetobacter, Brucelle, Bordetella*. 2ème édition. Ed Institut. Pasteur .Paris. p: 42-43.

[42] **Zhaohi.Xue Et Al. (2015).***Structure Identification of Triterpene from the Mushroom Pleurotus eryngii with Inhibitory Effects Against Breast Cancer.* *plant foods hum nutr.***70(3) :291-6.**

[43] **Kissoum A., Khalfaoui K. (2015).**Evaluation phytochimique et étude des activités biologiques d'une plante médicinale Algérienne (*Foeniculum vulgare*). Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Maste.34-35p.

[44] **Vijayakumari.B., Sasikala.Vet Radha.S.R.(2013).**Preliminary Phytochemical Screening Of The Various Extracts Of *Rotula Aquatica* Lour.India.

[45] **Trease G.E., Evans W. (1989).***A textbook of Pharmacognosy (13th edition) Bacilluere Tinal Ltd, London.*

[46] **KARUMI Y., ONYHEYILI P., OGUGB UAJA V. (2004).** *Identification Of Active Principales Of Balsamina (Balsam Apple) Leaf Extract. J. Med. Scien.* p: 179-182.

[47] **Ribereau G. (1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris.p : 254.

[48] **Pierre L. (2008).** Etude Chimique de l'espèce *Jacobinia carnea* .Université de Lubumbashi- Recherche en phytothérapie 2008.

[49] **Attou A. (2011).** Contribution à l'étude phytochimique et activités biologiques des extraits de la plante *Ruta chalepensis (Fidjel)* de la région d'Ain Témouchent. Memoire En Vue De L'obtention Du Diplome De Magister En Biologie.p :39.

[50] **Chadi D., Allal O. (2014).** Contribution à l'étude phytochimique des favonoïdes chez l'espèce *prunus Cerasifea atropupura L* et Evaluation de Leur Pouvoir Antibactérien. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master .Université constantine1.p :29.

[51] **Hazalin N., Ramasamy K., Lim S., Wahab I., Cole L. and Abdul Majeed A. (2009)** Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.p: 46.

[52] **Ponce A., Fritz R., Del Valle C. Et Roura S. (2003).***Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic Swiss chard. Societyof Food Science and Technology (Elsevier).***36**: 679-684.

[53] **Mitai et al. (2009).***antimicrobial activity of Acacia mellifea extracts and lupane triterpenes journal of Ethnopharmacology* **123** :143-148.

Résumé

Nos travaux sont portés sur le champignon *Pleurotus eryngii* aussi appelée Pleurote du panicaut récolté dans le région Ain Fakroun (wilaya d'Oum el Bouaghi) au nord-est d'Algérie, est un champignon largement cultivé, reconnu par sa richesse nutritive, et par ses propriétés curatives particulières bénéfiques pour la santé humaine. À la lumière de ces données, nous avons choisi de réaliser une étude sur les métabolites secondaires du *Pleurotus eryngii*.

Les résultats ont montré la présence des triterpènes, les alcaloïdes, les flavones, les polyphénols et les hétérosides à génine réduite dans ce champignon. Les travaux d'extraction avec trois solvants « Ether de pétrole, Acétate d'éthyle et le n-butanol » suivie d'une chromatographie sur couche mince (CCM), nous ont permis de confirmer la présence des métabolites secondaires dans les extraits obtenus. L'étude de l'activité antibactérienne des trois fractions sur quatre souches bactériennes référencées (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*), a montré aucune activité inhibitrice remarquée avec l'extrait d'éther de pétrole, la fraction d'acétate d'éthyle présente une activité antibactérienne contre trois souches (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*), et la fraction n-butanol a un pouvoir inhibiteur vis-à-vis des quatre souches bactériennes.

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, métabolites secondaires, extraction, activité antibactérienne.

ملخص

يركز عملنا على الفطر *Pleurotus eryngii* ويسمى أيضا *Pleurote du panicaut* يحصد في منطقة عين فكرون (ولاية أم البواقي) شمال شرق الجزائر. هو نوع من الفطريات يزرع على نطاق واسع، يعرف بثرائه لغدائي وخصائصه العلاجية الخاصة المفيدة لصحة الإنسان. في ضوء هذه البيانات، اخترنا إجراء دراسة على المركبات العضوية

من *Pleurotus eryngii*

ظهرت النتائج وجود التربينات الثلاثية ، القلويدات ، فلافونيس و جليكوسيدات ذوالجنيين المنخفض في هذا الفطر. تم عمل الاستخراج بالمذيبات ثلاثة " الأثير البترول ، خلات الإيثيل و ن بيوتانول ". يليها رقيقة اللوني طبقة (CCM) قد مكنتنا من تأكيد وجود نواتج الأيض الثانوية في المقتطفات. أما دراسة النشاط المضاد للبكتيريا من ثلاثة أجزاء على أربعة أنواع من البكتيريا المشار إليها (*Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* , *klebsiella pneumoniae*) لاحظنا عدم وجود اي نشاط مثبت للمستخلص الأثير البترول ، و جزء خلات الإيثيل ديه نشاط مضاد للجراثيم ضد ثلاث سلالات (*Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* , *klebsiella pneumoniae et Staphylococcus aureus*)، وجزء ن بيوتانول لديه القدرة المثبطة مع السلالات البكتيرية الأربعة.

الكلمات المفتاحية: *Pleurotus eryngii* ، المركبات الثانوية ، استخلاص والنشاط المضاد للبكتيريا .

Abstract

Our work concerned the fungus *Pleurotus eryngii* also called harvested in the Ain Fakroun region (wilaya of Oum el Bouaghi) northeast of Algeria , is a widely cultivated mushroom, recognized by their nutrient richness , and its special healing properties beneficial to human health, in light of this data , we chose to conduct a study on secondary metabolites of *Pleurotus eryngii*.

The results showed the presence of the triterpenes , alkaloids , flavones and glycosides genin reduced in this fungus. Extractive work with three solvents " petroleum ether , ethyl acetate and n-butanol " followed by thin layer chromatography (TLC) , allowed us to confirm the presence of secondary metabolites in extracts . The study of the antibacterial activity of three fractions on four bacterial strains referenced(*Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*), Showed no inhibitory activity noted with the extract of petroleum ether , the ethyl acetate fraction has antibacterial activity against three strains(*Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*), and the n-butanol fraction has an inhibitory power vis-a-vis the four bacterial strains.

Keywords: *Pleurotus eryngii* , secondary metabolites , extract and antibacterial activity.

RECHERCHE DES METABOLITES SECONDAIRES DU CHAMPIGNON ALGERIEN *PLEUROTUS ERYNGII*. ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIBACTERIENNE

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie Moléculaire et Santé.

Résumé

Nos travaux sont portés sur le champignon *Pleurotus eryngii* aussi appelée Pleurote du panicaut récolté dans le région Ain Fakroun (wilaya d'Oum el Bouaghi) au nord-est d'Algérie, est un champignon largement cultivé, reconnu par sa richesse nutritif, et par ses propriétés curatives particulières bénéfique pour la santé humaine. À la lumière de ces données, nous avons choisi de réaliser une étude sur les métabolites secondaires du *Pleurotus eryngii*.

Les résultats ont montré la présence des triterpènes, les alcaloïdes, les flavones, les polyphénols et les hétérosides à génine réduite dans ce champignon. Les travaux d'extraction avec trois solvants « Ether de pétrole, Acétate d'éthyle et le n-butanol » suivie d'une chromatographie sur couche mince (CCM), nous ont permis de confirmer la présence des métabolites secondaires dans les extraits obtenus. L'étude de l'activité antibactérienne des trois fractions sur quatre souches bactériennes référenciés (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*), a montré aucune activité inhibitrice remarquée avec l'extrait d'éther de pétrole, la fraction d'acétate d'éthyle présente une activité antibactérienne contre trois souches (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*), et la fraction n-butanol a un pouvoir inhibiteur vis-à-vis les quatre souches bactériennes.

Mots clés : *Pleurotus eryngii*, métabolites secondaires, extraction, activité antibactérienne.

Laboratoire de recherche : laboratoire de biochimie

Jury d'évaluation :

Président du jury : *CHIKHI A.* (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : *TENIOU S.* (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

Examineur : *MOKRANI E.H.* (Maître assistant «A» - UFM Constantine).

Date de soutenance : 20/06/2016