

République Algérienne Démocratique et Populaire
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université Mentouri de Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Animale

N° d'ordre :
N° de série :

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT EN SCIENCES

OPTION : PHYSIO-TOXICOLOGIE

Thème

*Etude Analytique et Biologique des
Flavonoïdes Naturels.*

Présenté par : M^{elle} AKROUM Souâd

Devant le jury :

Présidente :	M^{me} KHALFALLAH Nadra	Prof.	Université Mentouri de Constantine
Promoteur :	Mr. LALAOUI Korrichi	M.C.	Université Mentouri de Constantine
Examineurs :	M^{me} BENAYACHE Fadila	Prof.	Université Mentouri de Constantine
	Mr. HOUHAMDI Moussa	Prof.	Université 8 mai 1945 de Guelma
	Mr. ABDENOUR Cherif	Prof.	Université Badji Mokhtar de Annaba
	Mr. AMIRA Smaïl	M.C.	Université Ferhat Abbas de Sétif

Année universitaire : 2010-2011.

Je dédie ce travail

A ma Mère

A la mémoire de mon Père

A ma Sœur

Et A mon Frère

Remerciements

Je tiens à remercier :

Monsieur LALAOUI Korrichi, *Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine*, qui a dirigé mes travaux au cours de ces trois années en me faisant bénéficier de son expérience et de sa compétence.

Madame KHALFALLAH Nadra, *Professeur à l'Université Mentouri de Constantine*, pour son soutien indéfectible, et pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

Madame BENAYACHE Fadila, *Professeur à l'Université Mentouri de Constantine*,
Monsieur HOUHAMDI Moussa, *Professeur à l'Université 8 mai 1945 de Guelma*,
Monsieur ABDENOUR Cherif, *Professeur à l'Université Badji Mokhtar de Annaba*,
Monsieur AMIRA Smaïl, *Maître de conférences à l'Université Ferhat Abbas de Sétif*,
qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger et de siéger dans le jury de thèse.

Monsieur HADDI Mohamed Laid, *Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine*, pour sa participation dans la réalisation de la partie mycologique, ses précieux conseils et son aide constante tout au long de la réalisation de ce travail.

Madame SATTA Dalila, *Professeur à l'Université Mentouri de Constantine*, pour son soutien constant et ses précieux conseils.

Monsieur RHOUATI Salah, *Professeur à l'Université Mentouri de Constantine*, pour nous avoir accueilli dans son laboratoire

Monsieur BENAMEUR Ahmed, *Chargé de cours à l'Université Mentouri de Constantine*, pour son aide précieuse et son soutien tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à tout le personnel du département de Microbiologie et Biochimie de l'Université de Béjaïa pour l'accueil chaleureux qu'il nous ont toujours réservé et pour leur aide dans la réalisation de cette étude notamment en nous fournissant les réactifs manquants.

Sommaire :

<i>INTRODUCTION</i>	1
<i>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</i>	4
1. Généralités sur les Polyphénols	4
1.1. Définition des polyphénols	4
1.2. Classification des polyphénols	5
1.2.1. Les acides phénols	5
1.2.2. Les flavonoïdes	6
1.2.3. Les anthocyanes	6
1.2.4. Les flavanes	7
1.2.5. Les tannins	7
1.3. Biosynthèse des polyphénols	10
1.3.1. La voie de l'acide shikimique	10
1.3.2. La voie de l'acide malonique	10
1.4. Intérêts thérapeutiques des polyphénols	12
1.4.1. Activité anticancéreuse	12
1.4.2. Prévention contre les maladies cardiovasculaires	12
1.4.3. Prévention contre les maladies hormono-dépendantes	13
1.4.4. Action gastro-protectrice des polyphénols	13
2. Les flavonoïdes	14
2.1. Définition et généralités	14
2.2. Biosynthèse des flavonoïdes	14
2.3. Classification des flavonoïdes	15
2.3.1. Flavones et flavonols	15
2.3.2. Flavanones et hydroflavonols	15
2.3.3. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols	15
2.3.4. Chalcones et aures	15
2.4. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes	17
2.4.1. Activité des flavonoïdes contre le cancer	17
2.4.2. Activité antimicrobienne des flavonoïdes	18

2.4.3. Activité des flavonoïdes contre la radiotoxicité, la peroxydation lipidique et l'atteinte hématologique	20
2.4.4. Activité cardioprotectrice des flavonoïdes	20
2.4.5. Intérêt des flavonoïdes contre l'obésité	21
2.4.6. Intérêt des flavonoïdes contre les inflammations	21
2.4.7. Rôle des flavonoïdes dans la protection des neurones	22
2.4.8. Rôle des flavonoïdes dans la protection oculaire	22
3. Les Tannins	23
3.1. Définition des tannins	23
3.2. Les types de tannins	24
3.2.1. Les tannins hydrolysables	24
3.2.2. Les tannins condensés	25
3.3. Effet antinutritionnel des tannins condensés	26
3.3.1. Inhibition des enzymes digestives	26
3.3.2. Non assimilation des aliments	26
3.4. Présentation de la tannase	27
<i>MATERIEL ET METHODES</i>	28
1. Quelques Intérêts Biologiques des Extraits Bruts	28
Origine des plantes	28
Origine des microorganismes	28
1.1. Préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques bruts	29
1.2. Test de l'activité antimicrobienne des extraits	31
1.3. Test de l'activité antioxydante des extraits	32
1.4. Test de l'activité cytotoxique des extraits	33
1.5. Screening phytochimique des extraits	34
2. Quelques Intérêts Biologiques des Flavonoïdes	37
2.1. Identification des types de flavonoïdes présents dans les extraits éthanoliques	37
2.1.1. Partitions entre solvants	37
2.1.2. Chromatographie sur couche mince	39
2.1.3. Première étape dans l'identification des flavanoïdes	39
2.1.4. Spectres méthanoliques	41
2.1.5. Hydrolyses des hétérosides	41

2.2. Test de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes identifiés	42
2.3. Test de l'activité antioxydante des flavonoïdes identifiés	42
2.4. Test de l'activité cytotoxique des flavonoïdes identifiés	42
2.5. Mesure de l'activité antibactérienne in vivo contre <i>Streptococcus pneumoniae</i>	42
2.6. Mesure de la toxicité aigue de quelques flavonoïdes identifiés	44
3. Biodégradation Des Tannins Condensés	45
Origine des plantes	45
3.1. Préparations des extraits tanniques	46
3.1.1. Extraction des tannins condensés	46
3.1.2. Séparation des tannins par partitions entre solvants	46
3.1.3. Chromatographie préparative sur couche mince et spectre UV- visible des spots	46
3.2. Dosage et identification des tannins condensés	47
3.3. Isolement des moisissures capables de dégrader les tannins condensés	47
3.4. Production extracellulaire de la tannase en culture submergée	50
3.5. Mesure de l'activité enzymatique de la tannase	50
4. Analyse Statistique	51
 RESULTATS	52
1. Quelques Intérêts Biologiques Des Extraits Bruts	52
1.1. Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts	52
1.2. Activité antioxydante des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts	58
1.3. Activité cytotoxique des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts	60
1.4. Screening phytochimique des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts	61
2. Quelques Intérêts Biologiques des Flavonoïdes	64
2.1. Identification des types de flavonoïdes présents dans les extraits éthanoliques	64
2.2. Activité antimicrobienne des flavonoïdes identifiés	71
2.3. Activité antioxydante des flavonoïdes identifiés	74
2.4. Activité cytotoxique des flavonoïdes identifiés	74
2.5. Activité antibactérienne in vivo contre <i>Streptococcus pneumoniae</i>	77
2.6. Mesure de la toxicité aigue des flavonoïdes les plus actifs	78
3. Biodégradation Des Tannins Condensés	80
3.1. Dosage et identification des tannins condensés	80

3.2. Recherche et isolement des moisissures capables de dégrader les tannins condensés	82
3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la tannase produite	94
<i>DISCUSSION</i>	95
<i>CONCLUSION</i>	100
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	102
<i>ANNEXE</i>	112

Liste Des Abréviations

Abs : Absorbance.

ADV : Adénovirus.

AlCl₃ : Chlorure d'aluminium.

AML-1 : Acute Myelogenous Leukemia 1.

AT : Acide Tannique.

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2.

C : Carbone.

CCM : Chromatographie sur Couche Mince.

CI₅₀ : Concentration d'Inhibition de 50 % de croissance.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

DE50 : Densité Effective Médiane.

DL₀ : Dose Létale de 0 % d'individus.

DL₅₀ : Dose Létale de 50 % d'individus.

DO : Densité Optique.

FL : Follicular Lymphoma.

HCl : Acide chlorhydrique.

HIV : Human Immunodeficiency Virus.

HMC-1 : Human Mastocytes Cytokins 1.

HV : Herpes Virus.

H₃BO₃ : Acide borique.

IL : Interleukine.

IL-6 : Interleukine 6.

IL-1-β : Interleukin-1 beta.

LDL : Low Density Lipoprotein.

LPS : Lipopolysaccharides.

M : Molaire.

MAB : Matl Agar Blakeskee.

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase.

MEC : Méthyl-Ethyl-Cétone.

MeOH : Méthanol.

min. : minute.

mM : millimolaire.

NaOAc : Acétate de sodium

NaOH : Hydroxyde de sodium.

NF-kappaB : Nuclear Factor-kappa B.

NF-kappaB/P65 : Nuclear Factor-kappa B subunit P65.

NF-κB : Nuclear Factor-Kb.

NO : Nitric Oxide.

P : Phosphate.

PPAR-γ: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma.

P38 : sous unité P38.

RAS : Radical Scavenging Activity.

Rf : Rapport frontal.

S : Sabouraud.

sec. : secondes.

TC_F : Tannins Condensés des Fèves.

TC_T : Tannins Condensés du Thé.

TNF-α : Tumor Necrosis Factor α.

U : Unité.

UFC : Unité Formant Colonie.

UV : Ultraviolet.

UVB : Ultraviolets B.

V : Volume.

1N : Une fois Normale.

2N : Deux fois Normale.

Introduction Générale

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

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

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

En effet, de nombreuses études ultérieures ont prouvé que les flavonoïdes étaient capables d'inhiber différents types de microorganismes : bactéries, levures, moisissures, protozoaires et même virus. Néanmoins il y avait une grande spécificité entre les molécules actives et les microorganismes visés ; d'où l'importance de bien choisir le flavonoïde approprié.

De même l'activité antioxydante a été attribuée à la majorité des flavonoïdes découverts. Ces derniers avaient la capacité de neutraliser différents types de radicaux libres : les peroxydes ($\text{ROO}\cdot$), les alcoxyles ($\text{RO}\cdot$), les superoxydes ($\text{O}_2\cdot^-$) et les hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) ; empêchant de ce fait l'oxydation des lipides, des protéines, des enzymes et de l'ADN.

Des flavonoïdes tels que la rutine, la disomine, la lutéoline et la quercétine sont aujourd'hui de plus en plus commercialisés pour diverses applications médicamenteuses, alimentaires et cosmétologiques ; et ce que les molécules soient à l'état pur ou sous forme d'extraits.

Après les flavonoïdes, l'intérêt des chercheurs a porté sur les tannins qui sont représentés par deux types : les hydrolysables et les condensés. De même que les flavonoïdes, les tannins sont considérés d'un point de vue thérapeutique comme des polyphénols très puissants ; notamment les tannins condensés. Du fait qu'ils soient formés par polymérisation des molécules flavoniques, ces derniers ont acquis la majorité de leurs activités biologiques.

Néanmoins, l'utilisation des tannins condensés en dehors du domaine cosmétologique demeure jusqu'à aujourd'hui très limitée ; car ces macromolécules ont l'inconvénient majeur de se combiner aux molécules nutritives présentes dans notre alimentation et d'empêcher ainsi leur assimilation par le corps.

Bien que les tannins condensés soient très avantageux, ils demeurent donc peu utilisés dans les productions médicamenteuses et alimentaires.

La solution à ce problème a commencé à surgir dernièrement avec la découverte de la tannin-acyl-hydrolase (EC 3.1.1.20), communément appelée « tannase ». Cette enzyme n'a été révélée jusqu'à aujourd'hui que chez certaines bactéries (principalement des anaérobies) et des moisissures. De ce fait, les ruminants possédant des bactéries capables de produire cette enzyme acquièrent la capacité de dégrader les tannins condensés ; et donc le privilège de bénéficier de tous les intérêts apportés par ces polyphénols sans avoir à subir leur rôle antinutritionnel tant redouté.

Suivant, ce principe les biotechnologues ont commencé à s'intéresser aux productions industrielles de la tannase par les microorganismes. Le but étant de l'inclure dans notre alimentation ou dans la fabrication de certains médicaments.

Les moisissures représentent aujourd'hui les meilleurs producteurs de cette enzyme et ce du fait qu'elles soient pour la majorité des aérobies ; donc faciles à cultiver et à manipuler.

Dans ce travail, nous nous sommes fixé les objectifs suivants:

Premièrement : Préparer les extraits végétaux les plus utilisés par les phytothérapeutes, à savoir les extraits éthanoliques et méthanoliques, pour plusieurs plantes médicinales et alimentaires utilisées en Algérie ; déterminer le type le plus actif pour les activités antimicrobienne, antioxydante et cytotoxique testées *in vitro* ; puis, réaliser un screening phytochimique afin de connaître la nature des composés secondaires présents dans chaque extrait et sélectionner les plus riches en flavonoïdes.

Deuxièmement : Identifier des flavonoïdes présents en quantité suffisante ; tester *in vitro* leurs activités antimicrobienne, antioxydante et cytotoxique ; pour les molécules les plus actives, tester *in vivo* leur activité antimicrobienne contre *Streptococcus pneumoniae* puis mesurer leur toxicité aigue.

Troisièmement : Extraire et doser les tannins condensés présents dans les feuilles de *Camellia sinensis* (thé noir) et des téguments de graines de *Vicia faba L. seville* (fèves) ; rechercher et isoler des moisissures capables de dégrader ces molécules ; puis, mesurer l'activité enzymatique des tannases fongiques produites.

Partie Bibliographique

1. Généralités Sur Les Polyphénols :

1.1. Définition des polyphénols :

Les polyphénols sont des molécules synthétisées par les végétaux lors du métabolisme secondaire pour se défendre contre les agressions environnementales. Ils sont localisés dans différentes parties des plantes selon l'espèce végétale et le groupe polyphénolique considérés. Ces composés regroupent une multitude de molécules et représentent l'un des groupes les plus importants présents dans le règne végétal.

Comme définition, nous pouvons dire que les polyphénols sont des composés phénoliques hydrosolubles, de poids moléculaire compris entre 500 et 3000 Dalton, et ayant, outre les propriétés habituelles des phénols, la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et autres protéines (Dangles et al. 1992, Hagerman et al. 1998, Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Les polyphénols regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique, et un ou plusieurs groupes hydroxyles, en plus d'autres constituants (Bamforth 2000). Ils peuvent aller de molécules simples, comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés, de plus de 30000 Dalton, comme les tannins (Hagerman et al. 1998, Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Comme la majorité des composés secondaires, les polyphénols sont produits par les plantes afin d'accomplir des fonctions précises, les plus notoires étant :

- ☞ Défense contre les pathogènes ; principalement les moisissures et les bactéries phytopathogènes.
- ☞ Dissuasion alimentaire. On parle du phénomène d'allélopathie : certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes.
- ☞ Attraction des pollinisateurs : les couleurs, mais aussi les odeurs attirent les insectes. Exemple : certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.
- ☞ Protections contre les rayonnements UV.

☞ Molécules qui donnent des arômes et parfums aux plantes. Ce qui sert principalement à repousser les herbivores. Exemple : les polyphénols des pélargoniums (Druyne 1999, Schiestl et al. 2000, Yi-Cai et al. 2000, Sasaki et Takahashi 2002).

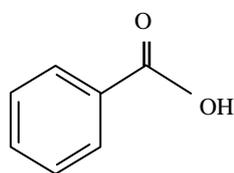
1.2. Classification des polyphénols :

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

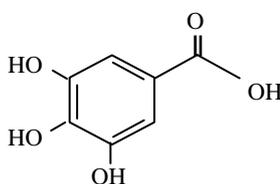
1.2.1. Les acides phénols :

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

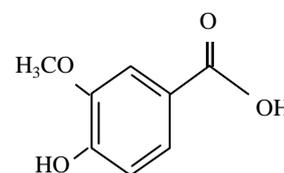
Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinée à l'état d'esters ou d'hétérosides (Haslam 1994). Exemple : l'acide gallique qui est un élément principal de la structure des tannins hydrolysables (Figure1).



Acide benzoïque



Acide gallique



Acide vanillique

Figure 1 : Exemple de quelques acides phénols de la série benzoïque (Bruneton 2009, Pawlowska et al. 2006).

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique sont souvent estérifiés. Les plus courants sont l'acide cinnamique, l'acide caféïque, l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinaptique (Haslam 1994, Bruneton 2009) ; dont certains sont représentés dans la figure 2.

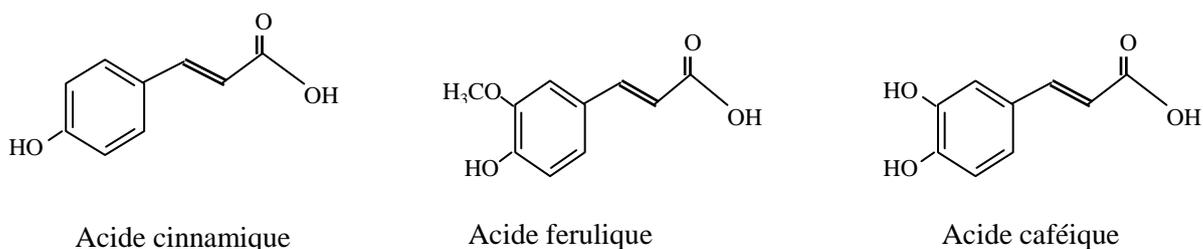


Figure 2 : Exemple de quelques acides phénols de la série cinnamique (Bruneton 2009, Pawlowska et al. 2006).

1.2.2. Les flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont un squelette de base formé par deux cycles en C6 (A et B) reliés entre eux par une chaîne en C3 qui peut évoluer en un hétérocycle (cycle C) (Figure 3). Ils donnent des couleurs allant du jaune clair au jaune or. Selon les détails structuraux les flavonoïdes se divisent en 6 groupes : flavones, flavonols, flavonones, isoflavones, chalcones, aurones.

Ces composés existent sous forme libre dite aglycone ou sous forme d'hétérosides, c'est-à-dire liée à des oses et autres substances (Heller et Forkmann 1993).

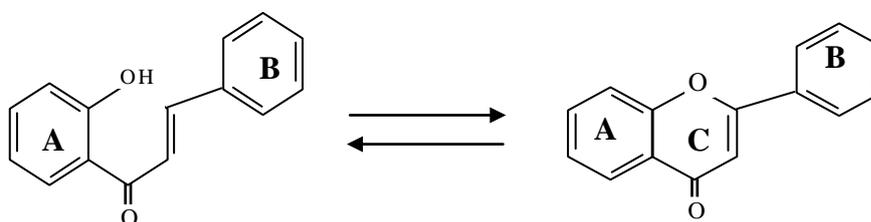


Figure 3 : Structure de base d'un flavonoïde (Heller et Forkmann 1993).

1.2.3. Les anthocyanes :

Les anthocyanes donnent des couleurs très variées : bleu, rouge, mauve, rose ou rouge. Ces molécules ont, comme les flavonoïdes, un squelette de base en C15 formé de deux cycles A et B, et d'un hétérocycle (cycle C) ; mais leur caractéristique principale est que ce dernier est chargé positivement. Cette charge est due à leur structure de base commune : le cation flavylum ou 2-phenyl-1-benzopyrylium (Figure 4) (Heller et Forkmann 1993).

Les trois anthocyanes principaux sont :

* La pélagonidine : qui a un OH en 4' et donne une couleur rouge-orange.

* La cyanidine : qui a deux OH en 3', 4' ou en 4', 5'. Elle donne une couleur rouge magenta.

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

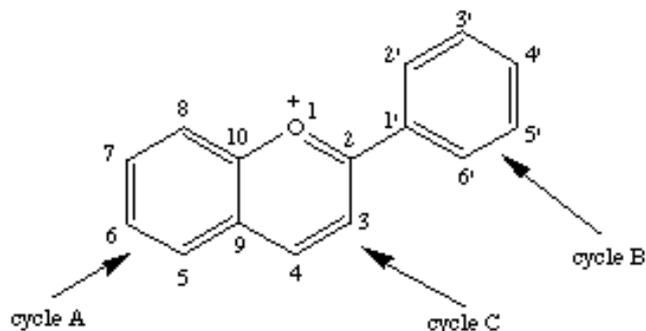


Figure 4 : Structure du cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium (Heller et Forkmann 1993).

1.2.4. Les flavanes :

Les flavanes sont sous forme de monomères (ex : la catéchine) ou sous forme de polymères (dimères, trimères...de catéchine). Ils existent sous forme de plusieurs stéréoisomères provenant de deux carbones asymétriques : C2 et C3. Les flavanes sont très répandues dans les écorces végétales (Figure 5) (Jakupovic et al. 1988).

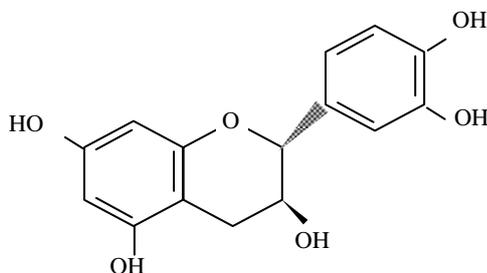


Figure 5 : Structure de la (+) – catéchine (Jakupovic et al. 1988).

1.2.5. Les tannins :

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

* Les tannins hydrolysables : sont des esters d'acide gallique qui se lient aux molécules de glucose. Plus précisément, un glucose se lie à plusieurs molécules d'acide gallique (Sarni-Manchado et Cheynier 2006) (Figure 6).

* Les tannins condensés : proanthocyanidines : ce sont des composés phénoliques hétérogènes. Ils se trouvent sous forme d'oligomères ou polymères de flavanes, flavan-3-ols, 5 desoxy-3-flavonols et flavan-3,4-diols (Figure 7).

Les polymères donnent une structure hérissée d'OH phénoliques capable de former des liaisons stables avec les protéines (Montenegro de Matta et al. 1976, Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

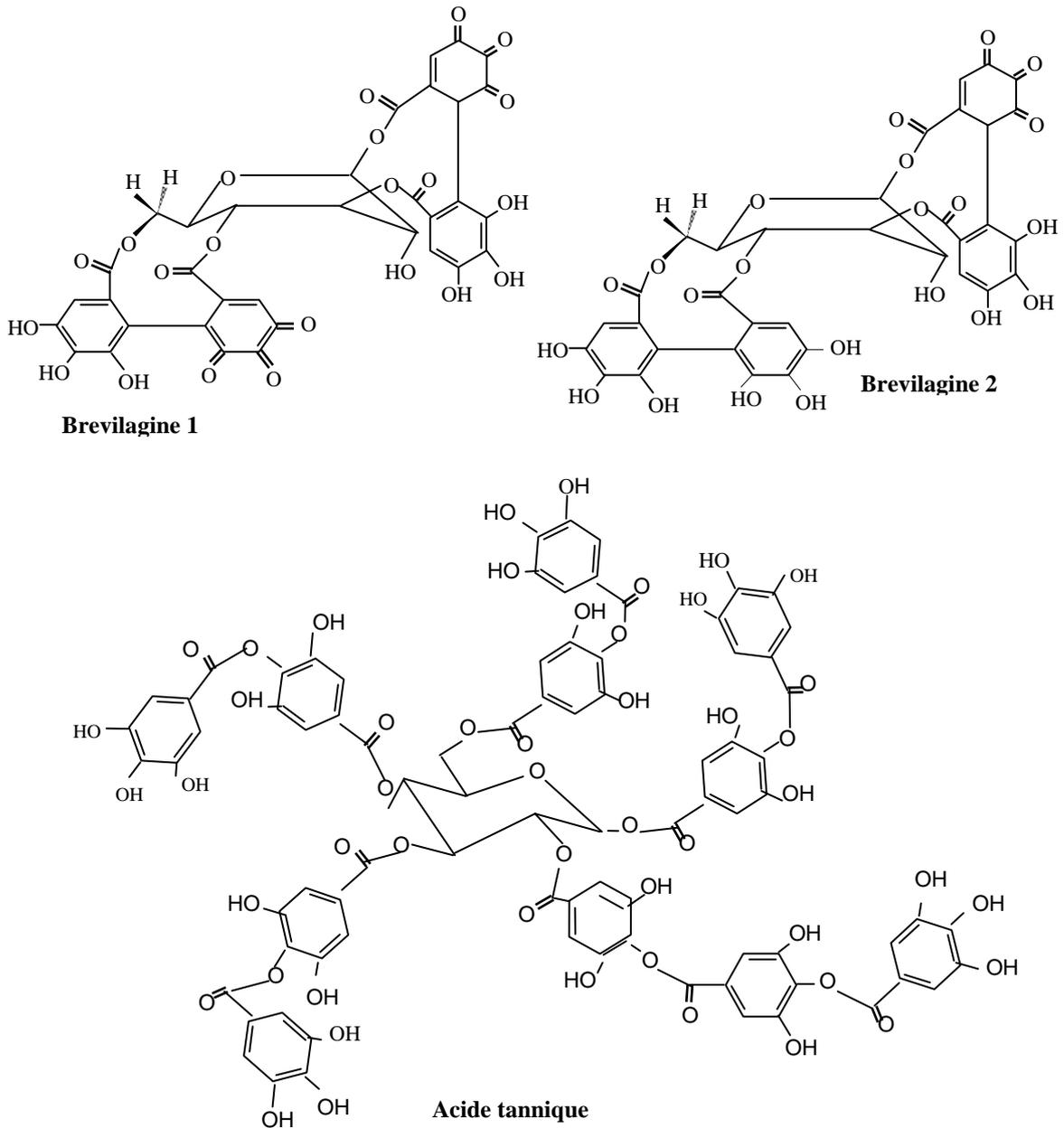


Figure 6 : Quelques tannins hydrolysables représentatifs (Gorger et al. 1994, Bruneton 1999).

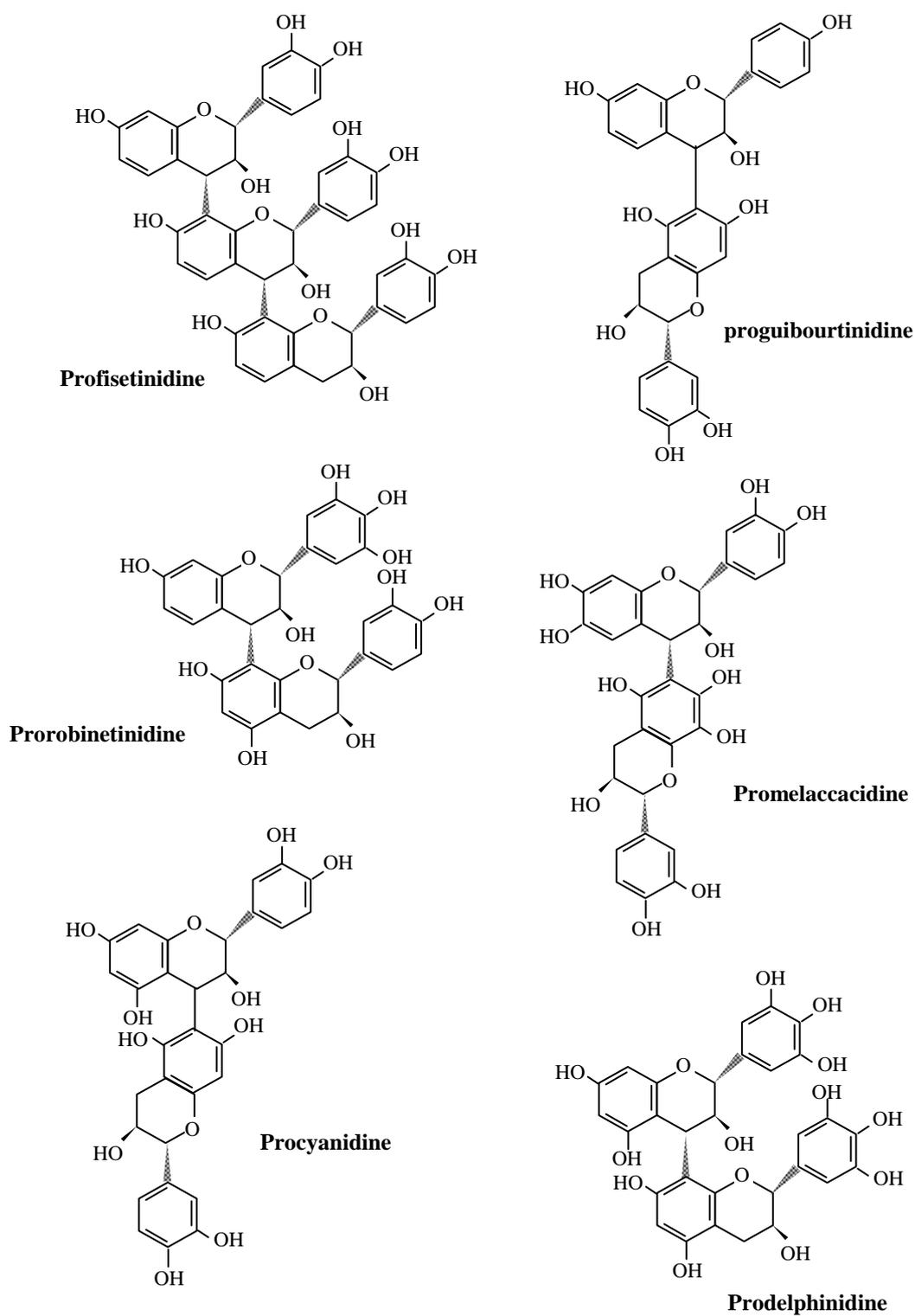


Figure 7 : Quelques proanthocyanidines sélectionnés (Seigler et al. 1986, König et al. 1994, Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

1.3. Biosynthèse des polyphénols :

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

1.3.1. La voie de l'acide shikimique :

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

Ces derniers sont à l'origine des composés phénoliques C6-C1 formant les tannins hydrolysables et de la chalcone qui est la molécule de base de tous les flavonoïdes et tannins condensés (Haslam 1994, Dewick 1995)

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

1.3.2. La voie de l'acide malonique :

La glycolyse et la β -oxydation aboutissent à la formation de l'acétyl CoA donnant le malonate.

C'est à travers cette voie que s'effectue la cyclisation des chaînes polycétoniques, obtenues par condensation répétée d'unités « Acétate » qui se fait par carboxylation de l'acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme acétyl-CoA carboxylase (Fleeger et Flipse 1964, Richter 1993) (Figure 8).

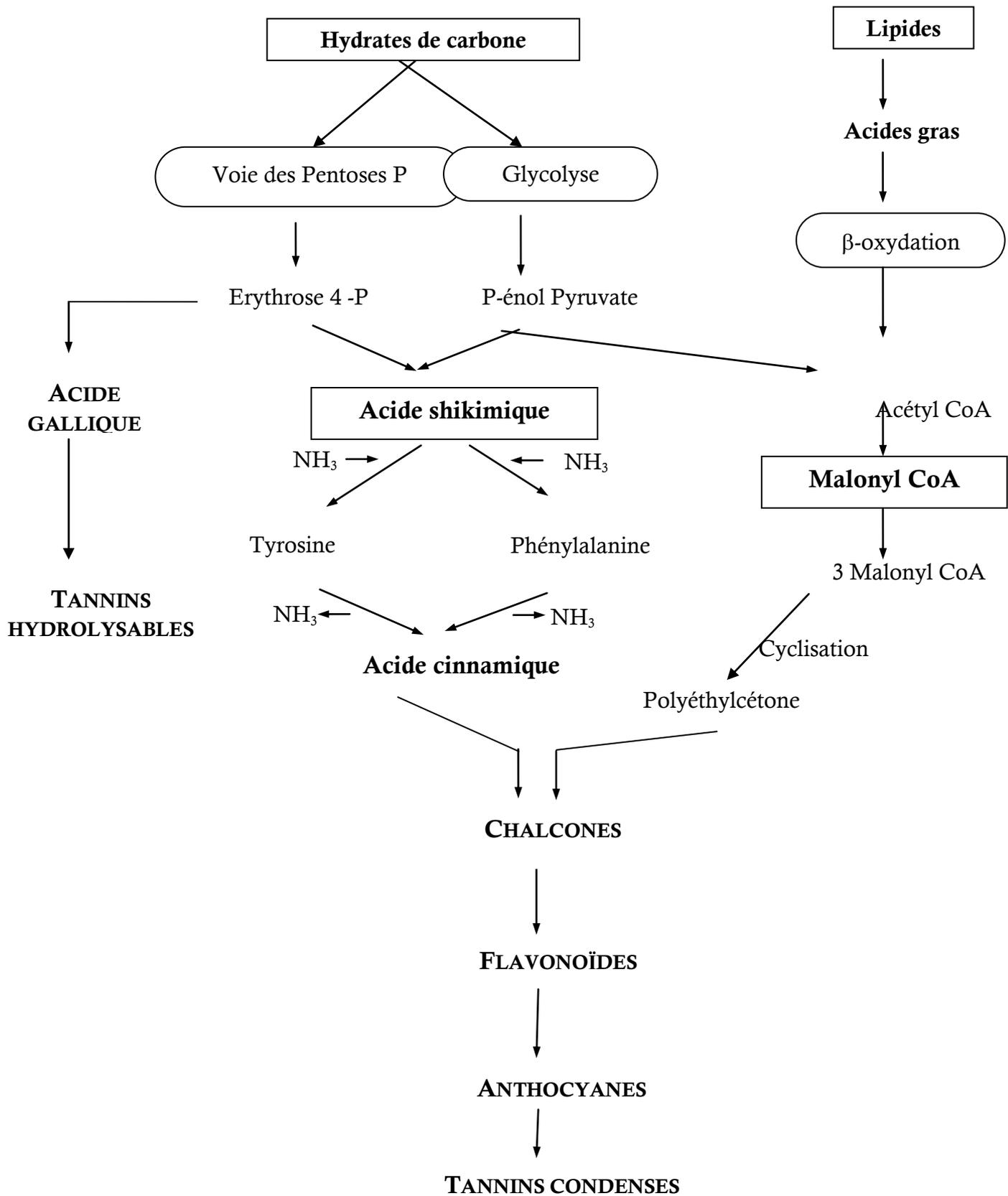


Figure 8 : Représentation des voies de biosynthèse des polyphénols.

1.4. Intérêts thérapeutiques des polyphénols :

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants (Pietta 2002, Frei et Higdon 2003, Oszmianski et al. 2007). En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, comme le Daflon produit à base de diosmine.

Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux bon-mauvais (qui peuvent être les deux), comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (Srivastava et al. 2000, Kenny et al. 2007).

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

1.4.1. Activité anticancéreuse : Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse. En effet, les premiers stades de la phase d'initiation cancéreuse peuvent être bloqués par la capacité des tissus cibles à intercepter et à métaboliser les agents mutagènes. Des cellules impliquées, comme les hépatocytes, synthétisent des enzymes dites de phase I (notamment des monooxygénases, telle que les cytochromes P-450) qui peuvent oxyder les substances mutagènes hydrophobes en produits constituant le substrat des enzymes de phase II (glucoronyl transférases, sulfotransférases...). Ces dernières convertissent leurs substrats en espèces hydrolysables facilement excrétées hors des cellules. Les enzymes de phase I et II agissent également dans la muqueuse intestinale. Elles sont synthétisées sous l'action des substances polyphénoliques trouvées dans les légumes, et aussi sous l'action des isothiocyanates (dérivés des glucosinolates) (Ames et al. 1995, Jhonson 1999).

1.4.2. Prévention contre les maladies cardiovasculaires : En effet, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire (Martin et Andriantsitohaina 2002).

Au niveau des artères, ces molécules préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Yamanaka 1996) évitant ainsi l'athérosclérose (épaississement des artères qui contribue à réduire le flux sanguins et peut conduire à l'asphyxie des tissus irrigués).

Les polyphénols inhibent aussi l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose, qui induit l'occlusion des artères. Ainsi en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose, ces composés limitent les risques d'infarctus du myocarde (Rein et al. 2000).

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

Les fruits et légumes contenant aussi des polyphénols, tels que la quercétine de l'oignon ou le kaempferol de la chicorée, possèdent également des propriétés pseudo-oestrogéniques inhibant la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. Mais, de nouvelles études restent nécessaires pour confirmer ces effets chez l'homme (Gerber et Berta-Vanrullen 2006).

Aussi, les effets bénéfiques des polyphénols (lignanes en particulier) dans la prévention de cancers hormono-dépendants ont été largement documentés ces dernières années par des études épidémiologiques identifiant une relation entre la présence de lignanes dans la ration alimentaire et le taux d'incidence de certains cancers (Lainé et al. 2007) .

1.4.4. Action gastro-protectrice des polyphénols : Les polyphénols ; dont principalement les flavonoïdes et les acides phénoliques comme l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide é gallique ; sont capables de réduire la surface des lésions gastriques produites par l'andométhacine chez les rates. L'acutissimine B et phillyraeoïdine A isolées et purifiées à partir de de *Quercus suber* et *Quercus coccifera* ont aussi confirmé l'action gastro-protectrice attribuée aux polyphénols. De même, ces derniers montrent une activité antibactérienne très importante contre *Helicobacter pylori*, responsable de l'ulcère de l'estomac et du duodénum (Funatogawa et al. 4004, Ruggiero et al. 2006).

2. Les flavonoïdes :

2.1. Définition et généralités :

L'appellation « flavonoïdes » rassemble une très large gamme de composés polyphénoliques formés par un squelette de base à 15 atomes de carbones. Ces composés représente le groupe de composés phénoliques le plus diversifié : plus de 4000 flavonoïdes ont déjà été identifiés (Harborne 1989, Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Le terme « flavonoïde » est dû à leur couleur jaune (= *flavus* en latin) qu'ils engendrent. D'ailleurs, leurs fonctions principales chez les végétaux semblent être attribuées à leur coloration ; au delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétalaïnes (Wilson 1987). Les flavonoïdes sont présents dans différentes parties des végétaux supérieurs selon le type de l'espèce : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois...etc. Aussi, ils varient quantitativement et qualitativement selon le stade de développement du végétal (Fritch et Griesbach 1975). Certains sont plus spécifiques de certains tissus. Exemple : les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales de fleurs.

2.2. Biosynthèse des flavonoïdes :

Comme ça a été précisé auparavant, les flavonoïdes possèdent un squelette de base à 15 atomes de carbone. Ce dernier est constitué de deux cycles en C6 (A et B) reliés par une chaînes en C3, on parle alors de chalcones. Ces dernières représentent le précurseur commun de tous les autres flavonoïdes (Heller et Forkmann 1993, Griesbach 1996, Hashimoto et al. 2004).

La chalcone est métabolisée sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)- flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones : apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R)-dihydrokaempférol respectivement.

Les deux enzymes citées fonctionnent différemment : la première introduit la double liaison entre les carbones 2 et 3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du C3. Le dihydroflavonol en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4- reductase, se métabolise en flavonol, kaempférol ou en flavan-3,4-diol et leucoanthocyanidol respectivement (Ono et al 2006, Seeram et al. 2006).

Toutes les voies métaboliques intervenant dans la biosynthèse des flavonoïdes peuvent être simplifiées comme c'est schématisé dans la figure 9.

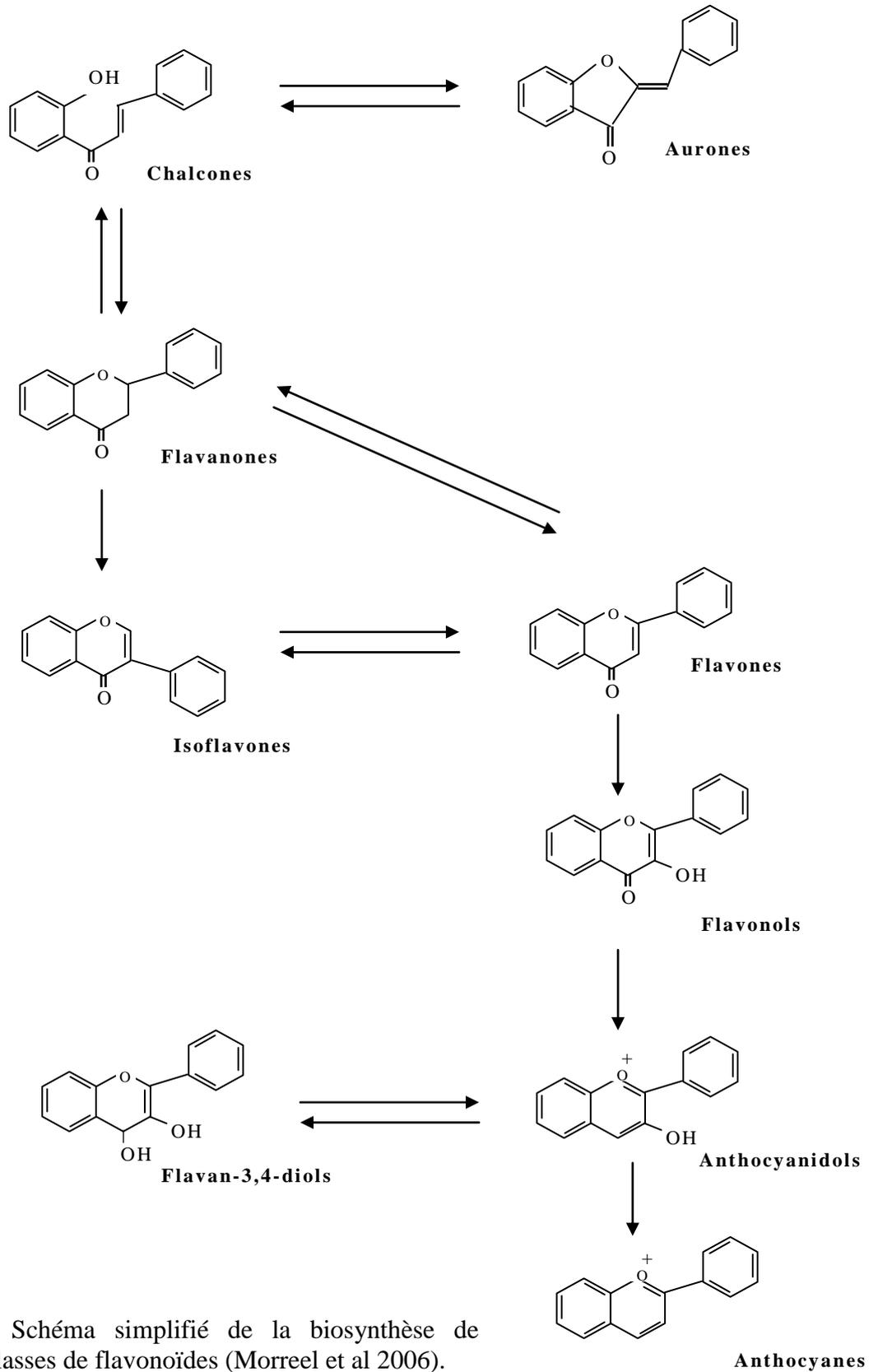


Figure 9 : Schéma simplifié de la biosynthèse de différentes classes de flavonoïdes (Morreel et al 2006).

Les composés de chaque groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles...) sur les deux cycles aromatiques et la chaîne en C3 intermédiaire ou l'hétérocycle.

A l'état naturel, les flavonoïdes se trouvent souvent sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est dite : aglycone.

2.3. Classification des flavonoïdes :

Les principaux groupes de flavonoïdes peuvent être définis et différenciés comme suit :

2.3.1. Flavones et flavonols : Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et en C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B est substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃).

Les flavonols se distinguent des flavones par un OH en C3 (Morreel et al 2006).

2.3.2. Flavanones et hydroflavonols : Se caractérisent par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 et par la présence des centres d'asymétrie. Les variations structurales sont ici de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonols.

Les dihydroflavonols se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C3 (Ono et al 2006).

2.3.3. Flavan-3-ols, flavan-3,4-diols et anthocyanidols : Ces molécules sont toujours hydroxylées en C3 et se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4. Cette position peut être libre (flavan-3-ols et anthocyanidols) ou hydroxylée (flavan-3,4-diols).

Les anthocyanosides sont caractérisées par l'engagement de l'OH en C3 dans une liaison hétérosidique. On trouve parmi ces composés, le palargonidol-3,4-O-glucoside et le cyamidol-3-O-rutinose ou keracyanine (Bruneton 1999).

Les flavan-3-ols et les flavan-3,4-diols sont souvent à l'origine des polymères flavoniques appelés proanthocyanidols ou tannins condensés (Bruneton 1999).

2.3.4. Chalcones et aurones : Les chalcones ont leur noyau pyranique central ouvert et sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tricarbonée, cétonique et insaturée. Le noyau B est assez fréquemment non substitué, alors que les substitutions sur le

cycle A sont plus souvent identiques à celles des autres flavonoïdes. Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumarone (Bruneton 1999, Ono et al 2006).

Néanmoins, selon d'autres auteurs (Sarni-Manchado et Cheynier 2006), la classification des flavonoïdes inclue aussi le groupe des anthocyanes. Ceci en raison de la grande similitude structurale de ces derniers avec les flavonoïdes ; et plus précisément avec les anthocyanidols.

2.4. Intérêts thérapeutiques des flavonoïdes :

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

Des expériences menées sur des souris ont montré que la quercétine et la quercétrine avaient une activité antidiarrhéique très importante. Le mécanisme de ces composés consistait à augmenter l'absorption des électrolytes et de l'eau par la muqueuse intestinale (Galvez et al. 1993a, Galvez et al. 1993b). Aussi d'autres flavonoïdes, comme l'apigénine, ont été décrits comme des composés bactéricides et bactériostatiques très efficaces (Basile et al. 1999, Cushnie et al. 2003, Martini et al. 2004). De même les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase (Goodarzi et al. 2006, Ouali et al. 2007).

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

2.4.1. Activité des flavonoïdes contre le cancer :

Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, nous citons la quercétine et la catéchine qui sont très abondantes dans les aliments.

La quercétine prévient la cancérogenèse, surtout le cancer de la peau et du colon. La présence de 20 % de quercétine dans l'alimentation chez les animaux diminue le cancer du colon et y prévient l'apparition des cryptes anormales. Le mécanisme suggéré est que la quercétine joue le rôle d'un antagoniste des topoisomérases I et II produites par les cellules tumorales.

La catéchine, quant à elle, est un inhibiteur de certaines réactions d'oxydation donnant un ADN anormal, elle inhibe surtout la formation du 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHDG), un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN. La catéchine a été démontrée comme étant plus active que la vitamine E sur les radicaux libres. Elle est très abondante dans le thé sous forme d'épigallocatechingallate (EGCG) (Pietta 2000, Tomofuji et al. 2009).

2.4.2. Activité antimicrobienne des flavonoïdes :

L'activité antimicrobienne et donc anti-infectieuse des flavonoïdes a été démontrée par de nombreuses études. Cette activité est due principalement à la capacité de ces molécules à inhiber l'expression de l'ADN et la synthèse de certaines enzymes et protéines membranaires des microorganismes (Ulanowska et al. 2006).

2.4.2.1. Activité antibactérienne des flavonoïdes :

Les flavonoïdes ont une activité antibactérienne très vaste et très diversifiée. En effet, ils s'attaquent à un grand nombre de bactéries avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve : les flavonoïdes sont capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries : *Staphylococcus aureus* (Babayi et al. 2004), *Escherichia coli* (Ulanowska et al. 2006), *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Heliotropium sinuatum*, *Proteus mirabilis* ... etc. (Didrak 1999, Modak 2001, Okigbo et al. 2005).

Chaque composé agit spécifiquement sur un ou plusieurs germes. Exemple : sur plusieurs bactéries testées l'apigénine n'a montré une faible activité que contre *Staphylococcus aureus*, toutes les autres ont été fort sensibles à ce flavonoïde. Au contraire, la galangine n'a donné une activité que sur *Staphylococcus aureus* ; les autres microorganismes se sont avérés résistants contre cette molécule (Basile et al. 1999, Cushnie et al. 2003, Martini et al. 2004). Aussi dans certains travaux, il a été cité que les flavonoïdes extraits avec du méthanol 95 % étaient actifs sur certaines bactéries, alors que ceux extraits avec du méthanol 60 % de la même plante ne l'étaient pas, comme c'était le cas des flavonoïdes de *Linum capitatum* contre *Staphylococcus aureus* (Slavica et al. 2004).

La diffusion radiale souvent demeure utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne *in vitro*, même si la mesure par le biais de cette méthode est parfois difficile à cause des zones diffusionnelles (Ilic et al. 2004).

Bien que le mécanisme d'action des flavonoïdes sur les microorganismes demeure encore imprécis, certaines études ont commencé à donner un début d'explication de leur activité antibactérienne en citant des exemples bien explicites ; comme celui de la quercétine censée agir sur l'ADN gyrase d'*Escherichia coli* (Dadi et al. 2009).

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

- ☞ Elle se fixe sur l'ADN au niveau des sites d'insertion de l'enzyme bloquant ainsi son activité.

☞ Elle bloque le site de fixation de l'ATP se trouvant sur l'ADN gyrase.

Dans les deux cas l'action du flavonoïde se manifeste par le clivage de l'ADN bactérien, désormais incapable de subir les modifications topologiques nécessaires à son bon fonctionnement.

2.4.2.2. Activité antifongique des flavonoïdes :

Aussi, comme la majorité des polyphénols, les flavonoïdes ont une activité antifongique très puissante. L'une des études les plus importantes sur cette activité était celle de Ortuno et ses collaborateurs (2006), qui ont démontré l'activité des flavanones glycosides et des polyméthoxyflavones extraites de *Cirtus parasidi* et de *Cirtus sinensis* sur *Penicillium digitatum*. En effet, la naringinine, l'hespéridine, la nobilétine, la simensetine et la tangerétine extraites de ces deux espèces de *Cirtus* servent à protéger ces dernières contre les attaques de *Penicillium digitatum* (Ortuno et al. 2006).

Batawita et ses collaborateurs (2002), dans leur étude sur les flavonoïdes de *Conyza aegyptica L.*, ont aussi démontré que ces molécules avaient une action fongicide et fongistatique sur différents agents de mycoses : *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* et *Candida zeylanoïdes*. D'autres flavonoïdes extraits de *Tibouchina grandifolia* ont montré une forte activité antifongique contre différents types de moisissures (Kuster et al. 2009).

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

2.4.2.3. Activité antivirale des flavonoïdes :

Les flavonoïdes sont aussi connus pour leur activité antivirale, principalement contre le rétrovirus HIV responsable du symptôme d'immunodéficience acquise (SIDA), le virus d'influenza, le virus de l'herpes (HV), l'adénovirus (ADV) et le virus de la grippe A (A/WS/33) (Spedding et al. 1989, Choi et al. 2009).

Certains chercheurs (Spedding et al. 1989) ont d'abord suggéré que ces polyphénols agissaient comme inhibiteurs de la transcriptase et/ou la transcriptase reverse de l'agent viral et de l'ADN et l'ARN polymérase de la cellule hôte ; bloquant ainsi tout le processus infectieux. D'autres travaux plus récents ont ensuite démontré que les flavonoïdes inhibaient plus exactement la synthèse de l'ARNm viral (Choi et al. 2009). Ceci, impliquait que les flavonoïdes n'intervenaient pas dans l'absorption des agents viraux, mais plutôt à un stade plus avancé impliqué dans la réplication virale.

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

En effet, les flavonoïdes sont aussi connus pour avoir un rôle préventif contre la cardiotoxicité, leur inhibition de la peroxydation lipidique et leur capacité à prévenir différentes atteintes hématologiques (Sadzuka et al. 1997).

En effet, les flavonoïdes apportent une protection contre les radicaux libres en empêchant leur liaison avec les lipides membranaires des cellules ; ce qui se traduit par une diminution du malonyl dialdéhyde (peroxyde lipidique) et par la protection de la composition hématologique en permettant une bonne régénération érythrocytaire et une prévention contre la leucopénie et la thrombopénie observées en présence des radicaux libres (Chaudhuri et al. 2007, Chandana Venkateswara et Vijayakuma 2008).

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

- ☞ Une structure orthodiphénolique du cycle B des flavonoïdes.
- ☞ Une double liaison en C2-C3 conjuguée avec la fonction C4-oxo, responsable de la délocalisation d'électrons.
- ☞ Les hydroxyles en position C3 et C5 qui permettent une activité antiradicalaire maximale (Lopez-Lazaro 2000, Siess et al. 2000).

2.4.4. Activité cardioprotectrice des flavonoïdes :

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

- Inhibition de l'oxydation du cholestérol LDL (mauvais cholestérol) par les radicaux libres, étape initiale importante dans la formation de la plaque d'athérome.
- Abolition de la tendance des cellules sanguines de petite taille ou plaquettes à se regrouper et à former des caillots sanguins. Cet effet est souvent décrit comme « l'effet aspirine ».
- Régulation des réponses inflammatoires et immunitaires au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins qui peut être anormale en cas de maladie cardiovasculaire.
- Régulation du tonus vasculaire ou degré de constriction des petits vaisseaux sanguins qui contribue à l'hypertension (Ariefdjohan et Savaiano 2005, Ding 2006).

2.4.5. Intérêt des flavonoïdes contre l'obésité :

Certains flavonoïdes sont supposés apporter un intérêt dans le métabolisme lipidique en diminuant la lipidémie. L'effet de quelques flavanones (la naringénine, la naringine, l'hespérintine et l'hespéridine) sur la conversion des préadipocytes en adipocytes, sur une lignée cellulaire AML-I a été étudié (Morikawa et al. 2008). Les deux flavonoïdes sous forme aglycone, à savoir la naringénine et l'hespérintine, ont induit un arrêt de la croissance des cellules entraîné par une apoptose. L'impact de la naringénine sur différentes protéines impliquées dans l'apoptose a été déterminé. Le résultat était que dans les cellules traitées avec ce flavonoïde, les taux de protéines antiapoptotiques (p-Akt, NF- κ B, et Bcl-2) étaient diminués, et ceux de Bad (protéines pro-apoptotiques) augmentés.

L'exposition des cellules à la naringénine ou à l'hespérintine durant de courtes périodes a augmenté la taille des gouttes lipidiques dans le cytoplasme. De plus, l'expression de la fatty acid synthase (intervenant dans la synthèse des acides gras) et des PPAR- γ a été augmentée dans les cellules traitées à la naringénine.

Ces résultats suggèrent que l'apoptose induite par les flavanones n'intervient pas sur la conversion des pré-adipocytes en adipocytes. De ce fait, les adipocytes sembleraient ne pas être une cible directe pour les activités hypolipémiantes des flavanones (Morikawa et al. 2008).

2.4.6. Intérêt des flavonoïdes contre les inflammations :

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

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

L'analyse de l'expression des gènes et de la sécrétion de plusieurs cytokines dans des mastocytes humains (cellules HMC-1) a révélé que la fisetine, la quercétine et la rutine diminuaient l'expression et la production du TNF- α , de l'IL-1- β , de l'IL-6 et de l'IL-8. La myricétine, quant à elle, a diminué celles du TNF- α et de l'IL-6 mais pas celles de l'IL-1- β ou

de l'IL-8. Enfin la fisétine, la myricétine et la rutine ont supprimé l'activation de NF-kappaB (Park et al. 2008).

2.4.7. Rôle des flavonoïdes dans la protection des neurones :

Les flavonoïdes sont en effet connus pour être des agents protecteurs contre la dégénérescence des neurones. Ce rôle a principalement été mis en évidence dans le cas de la maladie de Parkinson. De nombreuses études suggèrent que l'inflammation joue un rôle dans l'apparition de cette maladie. Des chercheurs ont évalué l'effet de la lutéoline, un flavonoïde possédant diverses activités et notamment des effets anti-inflammatoires, sur la diminution du captage de la dopamine et la perte de neurones dans les cultures mésencéphaliques gliales. L'évaluation de la diminution du captage de dopamine a été réalisée, dans l'étude considérée (Chen et al. 2008), grâce à un test de stimulation au LPS et la perte de neurones par la mesure de l'immuno-réactivité de ceux-ci à la tyrosine- hydroxylase. Les résultats étaient que la lutéoline a inhibé de manière dose-dépendante la diminution du captage de la dopamine par les neurones et la perte de neurones. De plus, la lutéoline a également inhibé significativement l'activation de la microglie induite et la production excessive du TNF- α (cytokine pro-inflammatoire), du NO et du superoxyde dans les cultures de neurones mésencéphaliques et les cultures enrichies en microglie.

Ces résultats ont démontré que la lutéoline était capable de protéger les neurones des dommages ainsi causés (Chen et al. 2008).

2.4.8. Rôle des flavonoïdes dans la protection oculaire :

Le stress oxydant induit par les rayons ultraviolets (UV) joue un rôle important dans la progression de la cataracte. Certains flavonoïdes, comme la fisétine, ont été examinés pour leur effet protecteur contre le stress oxydant induit par les UV dans des cellules épithéliales de la lentille (SRA01/04).

Les cellules ont été exposées à différentes intensités d'UVB, et ont été cultivées avec des concentrations croissantes de fisétine. La viabilité des cellules ainsi que le stress oxydant (cytométrie de flux) ont été alors mesurés. Aussi, la translocation du NF-kappaB, impliquée dans les mécanismes inflammatoires, a été suivie par immunocytochimie. Enfin, l'expression des protéines NF-kappaB/P65, IkappaB et MAPK (mitogen activated protein kinase) a été mesurée (Yao et al. 2008).

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

D'un point de vue mécanistique, la fisétine était la plus active, et a inhibé l'activation et la translocation des NF-kappaB/p65 induite par les UVB, et ce via l'inhibition de la dégradation et de l'activation du IkappaB. La fisétine a également inhibé la phosphorylation de plusieurs protéines de la famille des MAPK (P38 et c-Jun N-terminal kinase (JNK)) induite par les UVB (Yao et al. 2008).

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

3. Les Tannins :

3.1. Définition des tannins :

Les tannins sont des composés phénoliques très abondants chez les angiospermes, les gymnospermes et les dicotylédones (Konig et al. 1994). Ils ont la capacité de se combiner et de précipiter les protéines. Ces combinaisons varient d'une protéine à une autre selon les degrés d'affinités (Hagerman 1989, Dangles et al. 1992).

Le terme « tannin » ou « tanin » vient de la source de tannins utilisée pour le tannage des peaux d'animaux en cuir. Dans ce processus, les molécules de tannins se lient aux protéines par des liaisons résistantes aux attaques fongiques et bactériennes. Le poids moléculaire des tannins varie entre 500 et 2000 Dalton (3000 pour les structures les plus complexes) (Dangles et al. 1992).

Dans notre alimentation, l'astringence est la qualité organoleptique qui indique la présence des tannins. Elle a un rôle important dans le choix des aliments (corrélation inverse entre les espèces végétales choisies et leur teneur en tannins) (Horne et al. 2002, Del Bubba et al. 2009).

Comme les autres types de polyphénols, les tannins sont aussi répandus pour leurs nombreuses activités thérapeutiques notamment ; anti-infectieuses (Latte et Kolodziej 2001, Leitao et al. 2005), cardiovasculaires (Yamanaka et al. 1996, Cheruvanky 2004), hormonodépendantes et anticancéreuses (Notomo et al. 2004, Gosse et al. 2005).

3.2. Les types de tannins :

Comme ça a été cité auparavant, selon la structure nous avons deux types de tannins : les tannins hydrolysables et les tannins condensés. Même si ne nous intéressons dans ce travail qu'aux tannins condensés pour leur effet antinutritionnel, nous nous devons de décrire brièvement les deux types.

3.2.1. Les tannins hydrolysables : Sont formés par liaison de plusieurs acides galliques à un carbohydrate, généralement le glucose. On parle de gallotannins. Aussi des unités de galloyl peuvent être ajoutées par liaisons esters, généralement en position C3 de l'acide gallique. Et les unités d'acide gallique voisines s'accouplent formant les esters d'acide hexahydroxydiphénique, dits : ellagitannins (Figure 10).

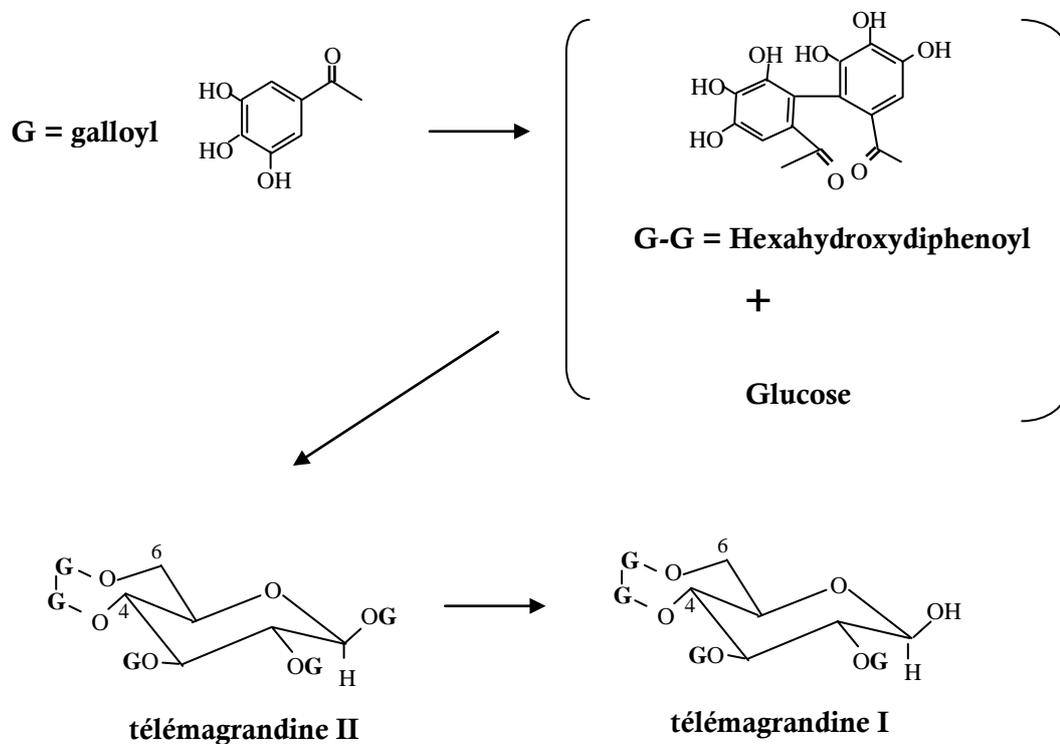


Figure 10 : Exemples d'ellagitannins (télémagrandines) formés par simple liaison des groupes galloyl (Dangles et al. 1992).

Ces deux groupes, les gallotannins et les ellagitannins sont appelés tannins hydrolysables. Comme leur nom l'indique, ces composés peuvent être dégradés en fragments simples (acides phénols et sucres).

L'acide gallique provient de l'oxydation des composés C6-C3, comme l'acide *p*-coumarique ou les acides oxygénés correspondants. Même si l'acide shikimique reste considéré comme étant le meilleur précurseur (Gorger et al. 1994).

3.2.2. 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 (Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Ces composés sont formés par condensation des molécules de flavonoïdes entre elles (Figure 11). En effet, les tannins condensés ont tous comme précurseurs des flavonoïdes (C6-C3-C6) et diffèrent entre eux par le type de liaison, les monomères de flavonoïdes impliqués, la position stéréochimique des carbones 2, 3 et 4, les hydroxylations et la présence ou non de substituants comme l'acide gallique.

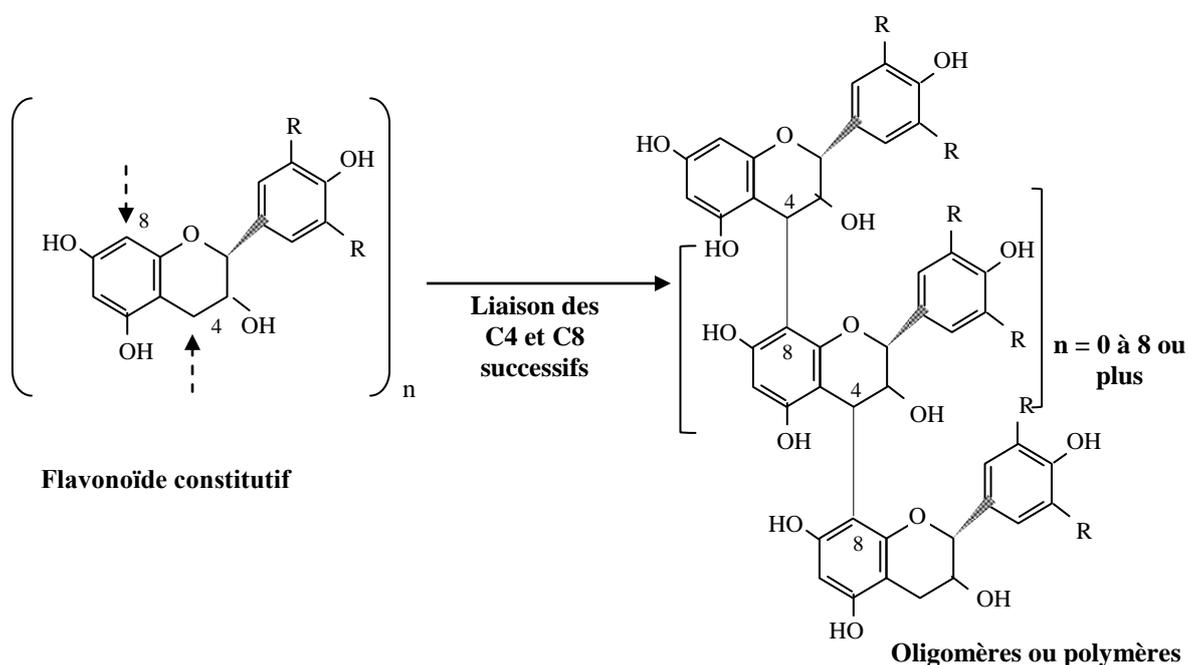


Figure 11 : Biosynthèse des proanthocyanidines par condensation des molécules de flavonoïdes (Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Les deux groupes majeurs des proanthocyanidines sont les procyanidines et les prodelphinidines (Figure 7). Les monomères constitutifs des procyanidines sont la catéchine et l'épicatéchine qui peuvent être substituées par l'acide gallique ou les sucres, généralement en position C3 ou plus rarement en position C7. Les monomères de prodelphinidines sont la gallocatéchine et l'épigallocatéchine, mais on distingue également des monomères de quercétine et de myricétine (Seigler et al. 1986, König et al. 1994).

Contrairement aux tannins hydrolysables, les condensés ne peuvent pas être dégradés par l'homme. En réalité, seules quelques bactéries et moisissures peuvent les dégrader en produisant une tannase appropriée (Zimmer et Cordesse 1996, Pinto et al. 2001, Mahapatra

et al. 2005, Goel et al. 2005). Quand ces microorganismes sont présents dans le rumen de certains animaux, ils leur procurent la capacité de catalyser les tannins condensés, libérant ainsi des anthocyanes (Ammar et al. 2009, Vasta et al. 2009).

3.3. Effet antinutritionnel des tannins condensés :

L'effet antinutritionnel des tannins condensés se traduit de deux manières principales : leur capacité à inhiber les enzymes digestives et leur liaison aux molécules nutritives empêchant ainsi leur assimilation par le corps.

3.3.1. Inhibition des enzymes digestives :

Les tannins condensés sont capables de se lier aux enzymes digestives causant de ce fait leur inhibition. Plusieurs de ces polyphénols ont une action sur l' α -amylase (Kandra et al. 2004), l' α -glucosidase, les protéases (Kocisko 2004), la trypsine et les hémagglutinines (Gilani et al. 2005, De Mejia 2005).

L'inhibition de ces enzymes cause un trouble de l'activité du tube digestif et diminue la valeur nutritive des aliments ingérés qui ne pourront pas être assimilés.

3.3.2. Non assimilation des aliments :

Les tannins condensés ont une grande capacité à se lier aux différents types de molécules présents dans l'alimentation par des liaisons covalentes : polysaccharides (pectines, xyloglucon, amidon, celluloses), minéraux (fer, argent), vitamines..... etc. (Tervino et al. 1992, Gaffney et al. 2004). Mais, les principales molécules qui se lient à ces composés polyphénoliques sont les protéines (Zimmer et Cordesse 1996).

Cette caractéristique a longuement été étudiée en utilisant différents composés protéiques et glucidiques. La BSA (Bovin Serum Albumin), le gluten, l' α -amylase et la β -galactosidase sont les principales protéines utilisées, et l'amidon ainsi que la pectine les principaux polysaccharides (Gedir et al. 2005)

Les liaisons entre les tannins et les molécules qui s'y attachent dépendent de plusieurs facteurs liés au milieu, à la structure des molécules combinantes (exemple : l'importance de la proline dans la structure des protéines), comme à la nature hydrophile ou hydrophobe et à la concentration des tannins impliqués (Zimmer et Cordesse 1996, Zhang et al. 2002).

Il a été démontré que la liaison des protéines aux tannins dans le rumen cause une diminution de la dégradation et de l'assimilation de ces protéines, ce qui cause une perte de la valeur nutritive des aliments et provoque une malnutrition. A long terme, la grande teneur en

tannins de l'alimentation cause chez les ruminants une perturbation de la microflore du rumen et donc de son activité, une limitation de l'absorption du nitrogène, une diminution de l'ingestion et même une toxicité.

Chez certains animaux, la présence de microorganismes gastro-intestinaux ayant une capacité à dégrader les tannins condensés, par la production de la tannase, limite ces effets néfastes. C'est le cas de *Streptococcus gallolytians*, *Lonopinella koalarum*, *Selemomona ruminantium* (Zimmer et Cordesse 1996, Goel et al. 2005).

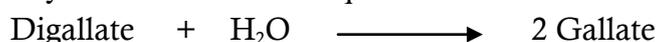
Les effets antinutritionnels ont été observés aussi chez les rats, les poussins et le bétail. En effet, des travaux antérieurs ont montré qu'une alimentation à teneur élevée en tannins condensés avait un effet négatif sur la digestibilité des protéines et des hydrates de carbone, et réduisait la croissance, l'efficacité de l'alimentation, l'énergie métabolisable et la disponibilité biologique des acides aminés (Gilani et al. 2005).

3.4. Présentation de la tannase :

La tannase, ou tannin-acyl-hydrolase (E.C 3.1.1.20), est une enzyme permettant la dégradation des tannins condensés. Elle est optimale à 40°C, pH = 6 et après 15 minutes d'incubation. Les ions métalliques comme le zinc, le manganèse, le cuivre, le magnésium et le fer inhibent son activité. Par contre, le potassium l'augmente (Sabu et al. 2004).

La tannase est efficace sur un large intervalle de température et de pH, ce qui permet son utilisation dans plusieurs processus industriels (Enemuor et Odibo 2009). Elle est produite par différents types de moisissures et bactéries, appartenant principalement aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Streptococcus* et *Enterobacter* (Osawa et Walsh 1993, Murugan et al. 2007, Costa et al. 2008).

En enzymologie, la tannase est considérée comme étant l'enzyme qui agit sur les tannins hydrolysables en catalysant la réaction chimique suivante :



Et sur les tannins condensés, c'est l'enzyme qui lyse les liaisons covalentes existant entre les molécules flavoniques constitutives ; principalement des liaisons de type C4-C8. Ceci permet la libération des monomères sous forme d'anthocyanes (Dyckerhoff et Armbruster 1933).

Matériel et Méthodes

1. Quelques Intérêts Biologiques des Extraits Bruts :

Origine des plantes : Les plantes ont été récupérées à l'état frais chez différents marchands de fruits et légumes, en s'assurant de la période de récolte de chacune. La cueillette s'est faite durant la floraison ou la fructification (Tableaux 1 et 2), en raison de la richesse des plantes en flavonoïdes et polyphénols durant ces périodes (Bruneton 1999).

La confirmation de l'identification des plantes a été faite aux départements de botanique des universités de Constantine et de Jijel.

Origine des microorganismes : Les microorganismes utilisés provenaient du CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Constantine et des laboratoires de microbiologie et d'infectieux de l'hôpital Mohammed Ben-Yahia, de Jijel.

Tableau 1 : Liste des plantes alimentaires utilisées.

Nom commun	Nom scientifique	Parties utilisées	Période de récolte
Poireau	<i>Allium porrum L.</i>	Bulbes	Avril 2008
Oignon	<i>Allium cepa L.</i>	Bulbes	Avril 2008
Ciboulette	<i>Allium schoenoprasum L.</i>	Bulbes	Avril 2008
Fève	<i>Vicia faba L.</i>	Téguments de graines	Mai 2008
Persil	<i>Petroselinum sativum</i>	Feuilles	Juin 2008
Chicorée	<i>Cichorium intybus L.</i>	Feuilles des sommités fleuries	Septembre 2008
Pamplemoussier	<i>Citrus paradisi</i>	Feuilles des sommités fleuries	Avril 2008
Céleri	<i>Apium graveolens L.</i>	Feuilles des sommités fleuries	Septembre 2008
Canneberge	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Fruits	Octobre 2008
Grenadier	<i>Punica granatum</i>	Téguments des fruits	Septembre 2008

Tableau 2 : Liste des plantes médicinales utilisées.

Nom commun	Nom scientifique	Parties utilisées	Période de récolte
Lin	<i>Linum capitatum</i>	Fleurs, feuilles des sommités fleuries	Mai 2008
Tilleul	<i>Tilia sylvestris</i>	Fleurs	Juin 2008
Menthe à longues feuilles	<i>Mentha longifolia</i>	Feuilles des sommités fleuries	Juillet 2008
Safran	<i>Crocus sativus</i>	Fleurs, feuilles des sommités fleuries	Octobre 2008
Verveine	<i>Lippia citriodora</i>	Feuilles des sommités fleuries	Juillet 2008
Thym	<i>Thymus vulgaris</i>	Feuilles des sommités fleuries	Juillet 2008
Carthame	<i>Carthamus tinctorius</i>	Fleurs	Août 2008
Lavande	<i>Lavandula officinalis</i>	Feuilles des sommités fleuries	Juillet 2008
Romarin	<i>Rosmarinus officinalis</i>	Feuilles des sommités fleuries	Mars 2008
Ortie blanche	<i>Lamium album</i>	Feuilles des sommités fleuries	Mai 2008
Cléome	<i>Cleome schweinfurthii</i>	Feuilles des sommités fleuries	Août 2008
Cumin	<i>Cuminum cyminum</i>	Téguments des graines.	Juin 2008
Camomille	<i>Chamaemelum nobile</i>	Fleurs, feuilles des sommités fleuries	Juin 2008
Curry	<i>Murraya koenigii</i>	Feuilles des sommités fleuries	Juin 2008
Absinthe	<i>Artemisia absinthium</i>	Feuilles des sommités fleuries	Septembre 2008
Cardamome	<i>Elettaria cardamom</i>	Feuilles des sommités fleuries, graines, fleurs.	Mai 2008
Thé	<i>Camellia sinensis</i>	Feuilles des sommités fleuries.	Mai 2008

1.1. Préparation des extraits éthanoliques et méthanoliques bruts :

Les extraits éthanoliques ont été obtenus par trois macérations successives et agitation du matériel végétal pendant 24 H dans un mélange éthanol / eau (80 / 20 : V / V). Le rapport solvant / matériel végétal utilisé était de 10 / 1 (ml / g) (Marston et Hostettmann 2006).

Les extraits méthanoliques, quant à eux, étaient préparés selon la méthode dite de Soxhlet, pendant plusieurs heures à reflux. Le rapport solvant / matériel végétal était toujours de 10 / 1 (ml / g) (Marston et Hostettmann 2006).

Les extraits ont ensuite été laissés pour décanter pendant 24 H afin d'éliminer les boues, graisses et résines risquant de gêner la suite des opérations. Les phases aqueuses limpides de chaque extrait ont ensuite été récupérées, filtrées et évaporées à sec dans un rotavapor Buchi à 55°C jusqu'à séchage complet. Les résidus secs ont été repris avec de l'eau distillée de sorte à avoir des dilutions 1 / 5 pour chaque extrait (Figures 12 et 13).

L'appareil de Soxhlet a été utilisé pour la préparation des extraits méthanoliques car le screening phytochimique a démontré qu'il permettait l'extraction d'un plus grand nombre de molécules. Par contre, pour les extraits éthanoliques, nous avons choisi la macération, car elle donnait les mêmes résultats que l'appareil de Soxhlet tout en étant beaucoup plus facile à réaliser.

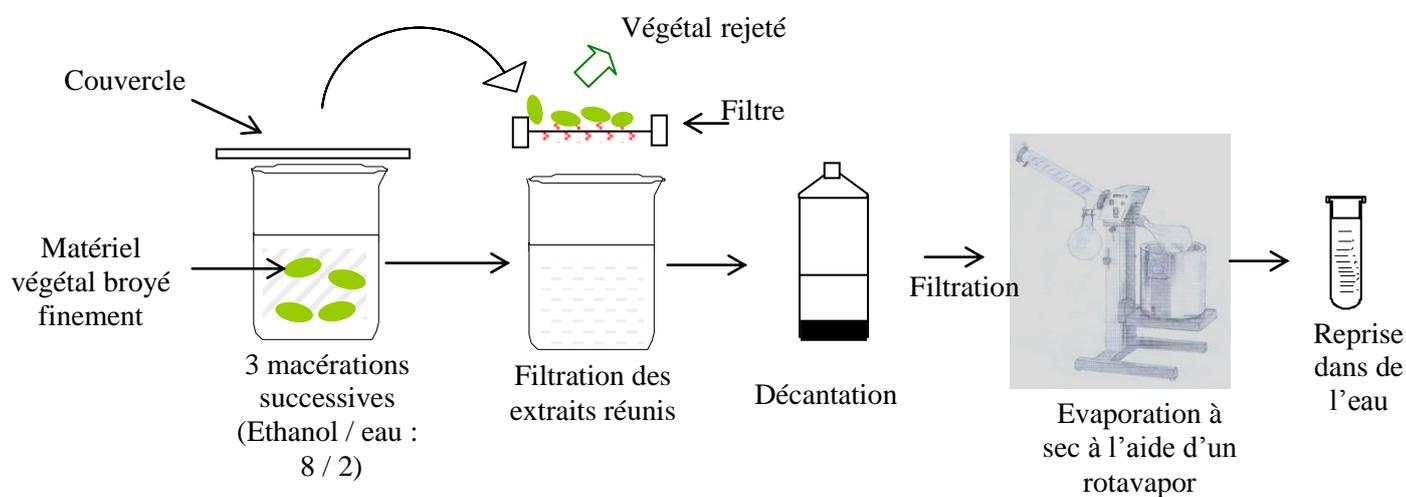
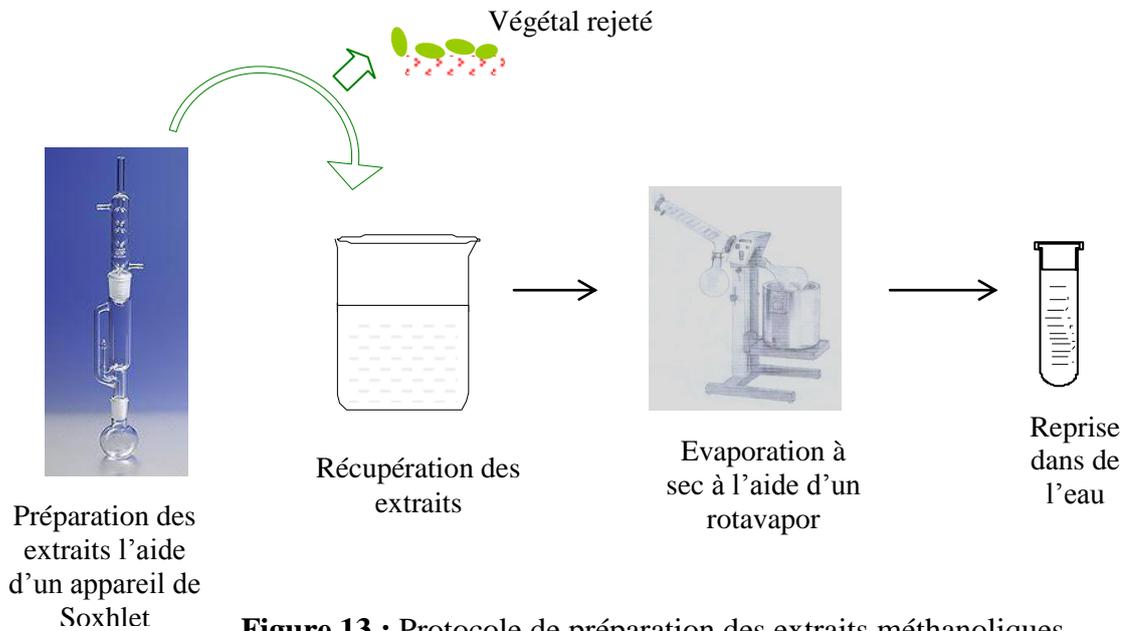


Figure 12 : Protocole de préparation des extraits éthanoliques.



1.2. Test de l'activité antimicrobienne des extraits :

Objectif : Déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice des bactéries à Gram-positif, des bactéries à Gram-négatif et des levures.

Principe : L'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques et méthanoliques était testée *in vitro* par la méthode de diffusion sur gélose (Osato 2009, Liao et al. 2010). Cette méthode a exactement le même principe que celui des tests d'antibiogramme. C'est-à-dire, l'application de patches imprégnés de principes actifs sur des milieux de cultureensemencés de microorganismes. L'activité antimicrobienne, quand elle était présente, se manifestait alors par des zones d'inhibition autour des disques.

Application : Des disques (patches) de 6 mm de diamètre ont été découpés sur du papier Wattman n°1 puis autoclavés dans 10 ml d'eau distillée à 120°C pendant 20 min.

Des séries de dilutions allant de 0,150 à 0,005 mg / ml ont été préparées pour chaque extrait. Les microorganismes apportés sous forme de suspensions ont été normalisés à 10^6 UFC / ml pour les bactéries et 10^4 UFC / ml pour les levures. Ceci en mettant 0,2 ml de chaque suspension apportée dans 20 ml de bouillon nutritif dans le cas des bactéries et 20 ml de bouillon Sabouraud dans le cas des levures. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 24 H pour les bactéries et 35°C pendant 48 H pour les levures. Les concentrations microbiennes des

inoculums ont été évaluées et exprimées par la mesure de la densité optique (DO à 600 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu (Osato 2009).

Les microorganismes ont été ensemencés par étalement sur des boîtes de Pétri contenant la gélose Muller-Hinton pour les bactéries et la gélose Sabouraud pour les levures. Les disques ont été ensuite imprégnés chacun par 20 µl de principe actif (extrait dilué) et déposés sur la surface des géloses. Comme témoin nous avons utilisé des disques industriels d'ampicilline (1µg d'antibiotique par disque). Pour les bactéries, l'incubation s'est faite à 37°C pendant 18 H et pour les levures, à 28°C pendant 48 H (Osato 2009) (Figure 14).

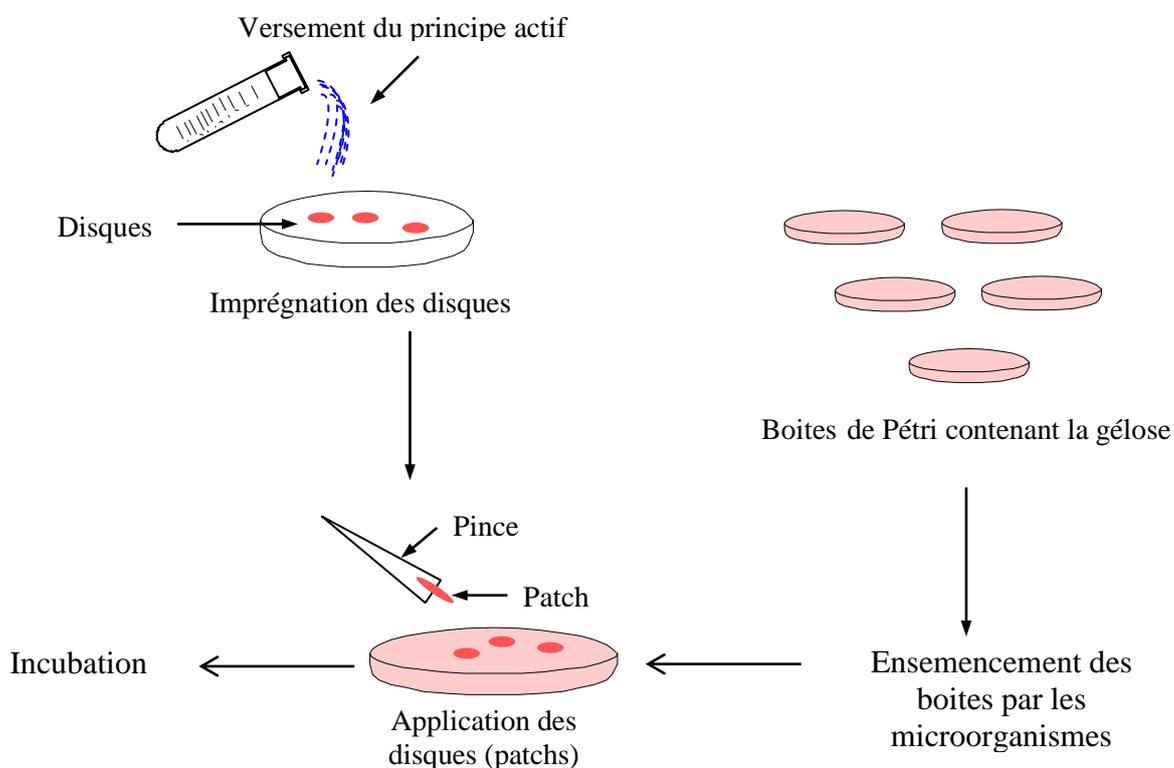


Figure 14 : Protocole du test de l'activité antimicrobienne des extraits.

1.3. Test de l'activité antioxydante des extraits :

Objectif : Déterminer parmi les extraits préparés ceux qui avaient la plus grande activité antioxydante contre le DDPH (2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyl). Cette activité est à l'origine de l'activité antioxydante.

Principe : Le DPPH est un radical libre stable que nous avons utilisé pour remplacer les radicaux libres produits par les cellules en réponses à des stress internes ou externes. En

présence d'un antioxydant, la couleur violette caractéristique du DPPH virait au jaune et l'absorbance mesurée à 517 nm s'abaissait. L'ajout de différentes dilutions des extraits à la solution de DPPH permettait de déterminer celle qui abaissait le plus l'absorbance.

Application : Cette activité a été testée selon la méthode décrite par Brand et al. (1995). Pour chaque extrait, nous avons préparé des dilutions de 10, 50, 100, 500 et 1000 µg / ml ; puis, une solution éthanolique de DPPH 1 molaire. Après le mélange de 1 ml de cette dernière avec 1 ml de la dilution de l'extrait considérée, l'absorbance était mesurée à 517 nm chaque 15 sec. jusqu'à stabilité de la valeur. Comme témoin, nous avons utilisé l'acide ascorbique dont nous avons préparé la même série de dilutions que pour les extraits.

À l'oeil nu, la présence de l'activité antioxydante contre le DPPH se témoignait par le virage de la couleur de ce dernier du violet initial au jaune. Mais, la mesure de la valeur exacte de cette activité était calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Pourcentage de l'activité antioxydante} = (Abs_{DPPH} - Abs_{finale}) / Abs_{DPPH} \times 100$$

Abs_{DPPH} : Absorbance de départ de la solution 1 molaire du DPPH.

Abs_{finale}: La valeur stable de l'absorbance après l'ajout de l'extrait.

1.4. Test de l'activité cytotoxique des extraits :

Objectif : Tester l'activité cytotoxique des extraits préparés afin de déterminer les plus actifs sur des cellules humaines.

Principe : La cytotoxicité était mesurée par le dosage de l'absorption du rouge neutre par des cellules FL qui sont une lignée cellulaire de l'arnion humain (American Type Culture Collection ATCC-CCL 62). Après addition des extraits, le dosage de cette absorption a permis de déterminer le nombre de cellules vivantes. Car en effet, seules ces dernières étaient capables de gérer la fixation active du rouge neutre. La méthode utilisée était celle de Lindl et Bauer (1989), modifiée par Awadh Ali et ses collaborateurs (2007).

Application : Les cellules ramenées à une concentration de 1 à 2 x 10⁶ cellules / ml étaient ensemencées sur des plaques de microtitrage à 96 puits (100 µl par puits), puis incubées dans l'incubateur à 37°C pendant 24 H sous 5 % de CO₂. Le milieu de culture était composé de MEM (Minimal Essential Medium provenant de Cellgro mediatech et fournit par Stratech Scientific Limited, France) complémenté avec 9 % de SVB (Sérum de Veau Fœtal),

1 mM de glutamine et 1 % de pénicilline (50 U / ml), streptomycine (50 µg / ml) et néomycine (50 µg / ml).

Après 24 H, les cellules ont formé une monocouche. Le milieu de culture a alors été décanté et remplacé délicatement par l'extrait testé en déposant 100 µl par puits. Les cellules étaient incubées une seconde fois pendant 24 H ; et à l'issue de l'incubation, la plaque de microtitrage était lavée au tampon phosphate salin, puis le milieu de culture contenant le colorant avec une concentration de 5 µl / ml était pipeté sur les cellules à raison de 100 µl par puits.

Après 3 H d'incubation, les plaques de microtitrage ont été lavées afin d'enlever l'excès du colorant. Le colorant présent dans les cellules était extrait par la solution d'élution constitué de 1 % (V/V) d'acide acétique dans 50 % (V/V) d'éthanol. Après une heure d'élution, la densité optique était mesurée à 540 nm avec un test ELISA-Reader-HT II (Actes Anthos Labtec Salzbourg, A).

Comme contrôle négatif, nous avons utilisé le même milieu cellulaire sans extrait et comme contrôle positif, un milieu cellulaire contenant de l'organozinc. Ces deux milieux ont été incubés dans les mêmes conditions.

Pour chaque échantillon, une moyenne de quatre mesures était déterminée (n = 4). Les valeurs CI_{50} (concentration qui a provoqué une inhibition de 50 % de croissance par rapport au contrôle) ont été calculées statistiquement par le logiciel SPSS 14.0 pour Windows avec le test *U* de Mann Whitney.

1.5. Screening phytochimique des extraits :

Objectif : Déterminer les types de molécules présents dans les extraits éthanoliques et méthanoliques et confirmer le type de solvant (éthanol ou méthanol) adéquat pour extraire le plus de flavonoïdes.

Principe : Séparer les différentes molécules présentes dans les extraits par chromatographie sur couche mince (CCM). Puis, tirer le spectre UV-visible de chaque molécule. La comparaison de ces spectres avec des témoins permettait de connaître la nature des molécules présentes.

Application : Pour les extraits éthanoliques, nous avons réalisé une CCM analytique sur gel de polyamide DC6 (Marston et Hostettmann 2006). Ce gel a été préparé en mélangeant 10g de poudre de polyamide dans 50 ml d'éthanol, puis il a été étalé sur des plaques en verre

analytiques (20x10 cm et 20x20 cm). Ces dernières étaient prêtes à l'emploi après séchage du gel.

Pour la CCM des extraits méthanoliques, nous avons utilisé un gel de silice (Marston et Hostettmann 2006) préparé en mélangeant 30 g de poudre de silice avec 60 ml d'eau distillée. Le dosage de la poudre et de l'eau a été déterminé par tâtonnement. Après étalement du gel sur les plaques en verre analytiques et séchage, ces dernières ont été activées par chauffage dans une étuve à 100°C pendant 1 H.

Le dépôt des extraits sur les plaques a été fait linéairement de façon ponctuelle avec des capillaires (pipettes capillaires) à usage unique. Les capillaires devaient être posés perpendiculairement et prudemment sur la plaque afin de ne pas gratter le gel (Figure 15).

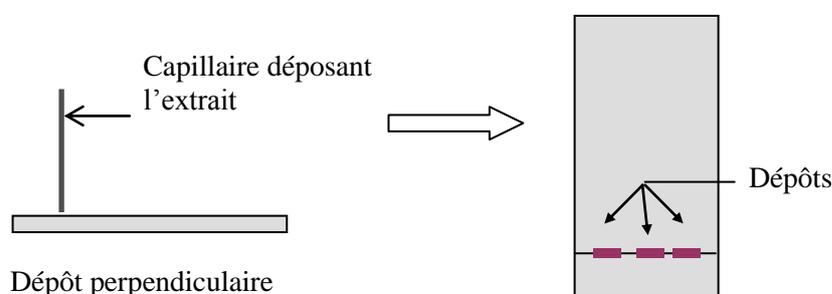


Figure 15 : Mode de dépôt pour une CCM.

Le choix de la phase mobile (système solvant approprié) s'est fait après essai de plusieurs mélanges de solvants. Ceux ayant donné les meilleures séparations étaient :

☞ Pour le support de polyamide :

Toluène / Méthyléthylcétone / Ethanol / Ether de pétrole : 2 / 1 / 1 / 1 (V/V/V/V).

☞ Pour le support de silice :

Butanol / Acide acétique / Eau : 4 / 1 / 5 (V/V/V).

Après saturations des cuves de CCM en vapeur de solvant, les plaques ont été placées dedans de sorte que les bords où ont été effectués les dépôts fussent trempés dans le fond du solvant ; tout en prenant soin d'éviter tout contact entre les dépôts des échantillons et le mélange de solvant.

Les différents constituants des échantillons déposés ont alors migré avec des vitesses différentes. Dans le cas idéal, nous obtenions autant de taches que de constituants sur le trajet de migration du solvant (Figure 16).

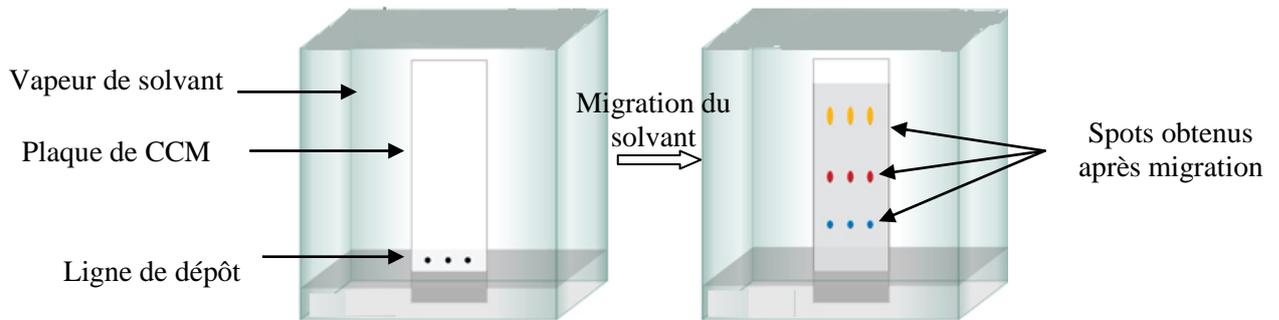


Figure 16 : Figure modifiée représentant la migration des constituants des extraits (Reich et Schibli 2007).

La visualisation des spots obtenus s'est faite à l'aide d'une lampe UV dans une chambre noire (à 254 et 366 nm) (Marston et Hostettmann 2006). Ces derniers ont ensuite été grattés et dissous dans du méthanol afin de séparer les molécules du gel. La filtration des solutions obtenues s'est faite dans des seringues reliées à des filtres ayant des diamètres de 25 μm . Ces dispositifs permettaient de retenir le gel en laissant passer le méthanol chargé des molécules séparées (Figure 17).

Le spectre UV-visible de chaque molécule a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre Shimadzu. En comparant les résultats obtenus avec les spectres de quelques substances témoins, nous sommes arrivés à connaître la nature de chaque composant.

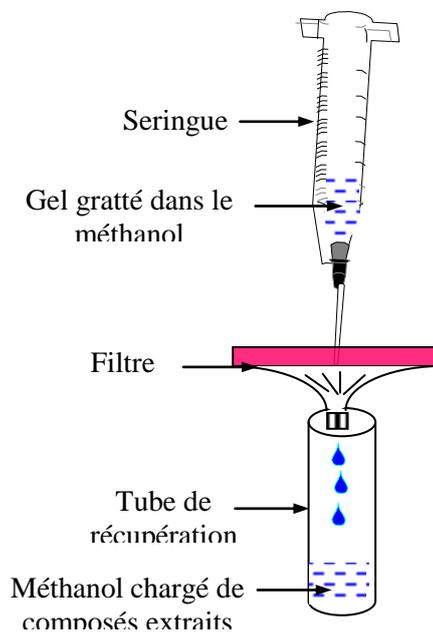


Figure 17 : Système de filtration.

Remarque : Afin de réaliser toutes ces activités, il était nécessaire d'utiliser les quantités adéquates de plantes. Les extraits bruts utilisés devaient être récupérés dans des quantités d'environ 2 à 4 g.

2. Quelques Intérêts Biologiques des Flavonoïdes :

2.1. Identification des types de flavonoïdes présents dans les extraits éthanoliques :

Les résultats du screening ont montré que les extraits éthanoliques contenaient principalement des flavonoïdes. D'autre part, les travaux de Markham (1982) ont précisé que l'éthanol était en effet un solvant de choix pour extraire ce type de molécules. L'identification des flavonoïdes s'est donc faite sur les extraits éthanoliques et non méthanoliques.

Objectif : Identifier les flavonoïdes présents dans chaque extrait éthanolique afin de connaître les plantes les plus riches en ces composés.

Principe : Les flavonoïdes ont été séparés selon leurs substitutions par des partitions entre solvants, puis ils ont été identifiés par une série d'analyses spectrales basées sur l'addition de quelques agents ionisants et chélatants. Les substitutions flavoniques ont ensuite été identifiées par des co-CCM avec des substances témoins (Marston et Hostettmann 2006).

Remarque : Afin de réaliser toutes les activités biologiques, il était nécessaire d'utiliser les quantités adéquates de plantes. Les flavonoïdes utilisés devaient être extraits dans des quantités d'environ 10 à 45 g selon le nombre des tests effectués.

Application :

2.1.1. Partitions entre solvants (affrontements) : Les extraits éthanoliques ont été ramenés à un volume de 100 ml dans de l'eau distillée. Pour chaque partition, la même quantité du solvant a été utilisée (rapport 1 / 1 : V / V). Cette étape a permis la séparation des flavonoïdes présents dans les extraits éthanoliques bruts selon leurs substitutions (Figure 18).

L'affrontement avec l'éther de pétrole enlevait les composés non phénoliques (cette phase était ensuite rejetée). L'affrontement avec l'éther diéthylique soutirait les aglycones et avec l'acétate d'éthyle soutirait les flavonoïdes mono-glycosylés. La phase aqueuse restante contenait alors les flavonoïdes bi-glycosylés et les autres non soutirés (Markham 1982).

Les phases éther diéthylique, acétate d'éthyle et la phase aqueuse ont été évaporées à sec dans un rotavapor, puis reprises dans 4 à 5 ml de méthanol.

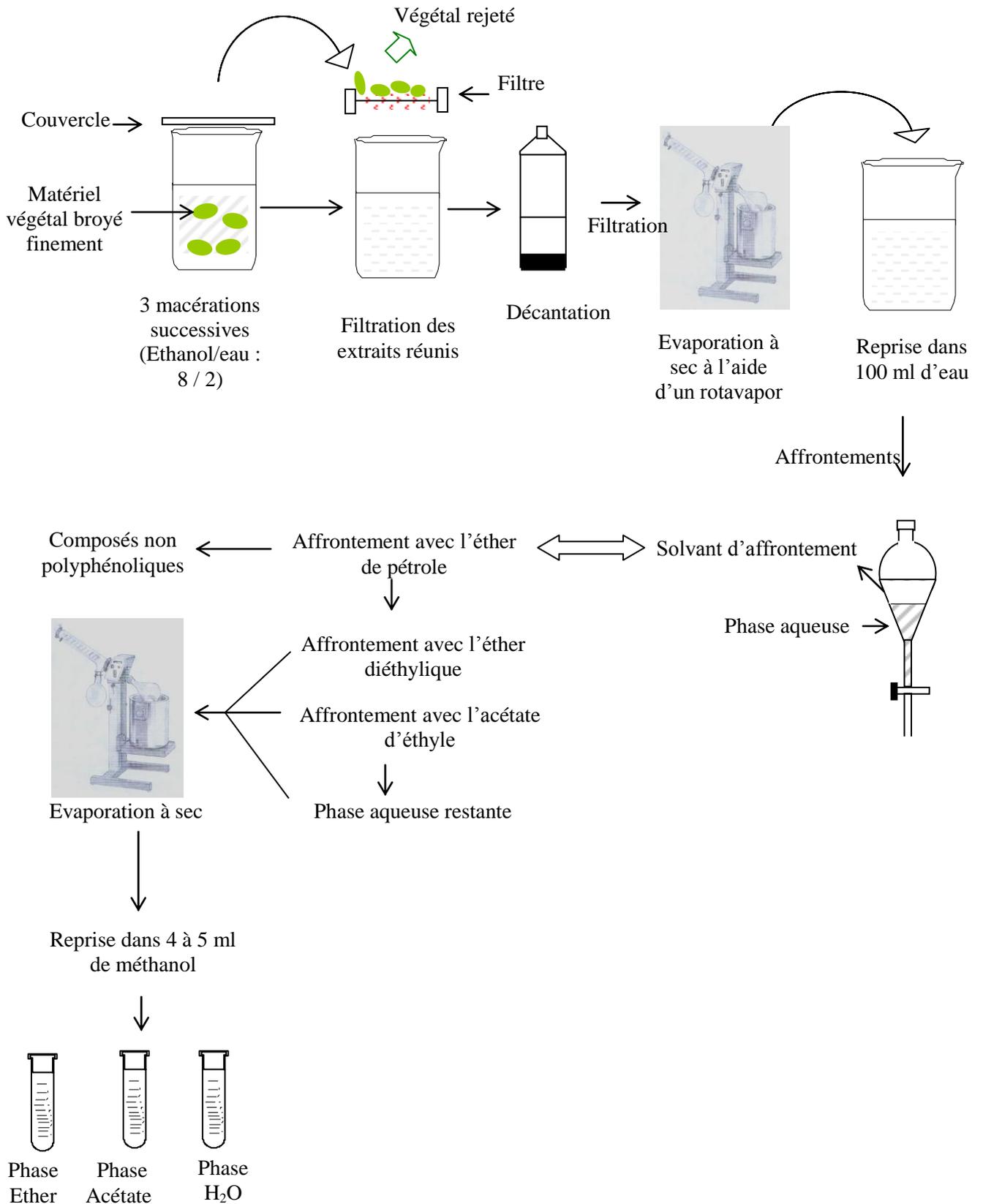


Figure 18 : Séparation des flavonoïdes par les partitions entre solvants.

2.1.2. Chromatographie sur couche mince : Les composés présents dans les différentes phases ont été séparés par une CCM préparative, qui se réalisait sur des plaques en verre de 20x20 cm.

Le dépôt a été fait le long des plaques. Pour chaque phase, 12 plaques ont été préparées afin d'avoir des quantités de flavonoïdes suffisantes pour la suite des opérations (Figure 19).

La migration s'est faite sur gel de polyamide DC6 en utilisant le système solvant : toluène / méthanol / méthyléthylcétone (4/3/3 : V/V/V) pour les phases éther diéthylique et acétate d'éthyle.

Pour la phase aqueuse, nous avons utilisé le système : eau / méthanol / méthyléthylcétone / acétylacétone (13/3/3/1 : V/V/V/V). Les molécules ont été détectées dans une chambre noire à l'aide d'une lampe UV à 365 nm, puis ont été grattées et filtrées dans du méthanol comme décrit auparavant (screening phytochimique).

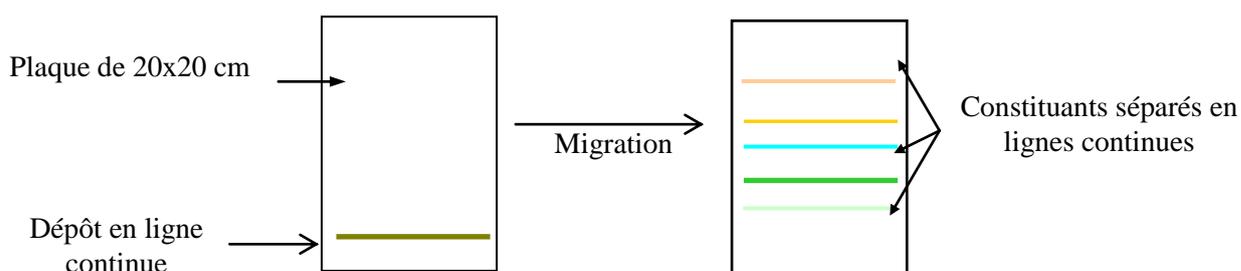


Figure 19 : CCM préparative donnant des flavonoïdes sous forme de lignes séparées.

2.1.3. Première étape dans l'identification des flavonoïdes : Les spots flavoniques représentant les constituants du dépôt ont été caractérisés par leur fluorescence (couleur) sous lampe UV et leur facteur de rétention.

A* Relation : structure – fluorescence :

L'examen sous lumière ultraviolette fournissait des informations très importantes sur la configuration structurale des molécules isolées. En effet, il apportait des indications particulières concernant les substitutions (Tableau 3).

Tableau 3 : Relation entre la fluorescence et la structure des flavonoïdes (Markham 1982).

Spots colorés	Types de flavonoïdes
Noir	flavonols 5, 6, 7 tri - OH libres
	flavonols 5, 7, 8 tri – OH libres
Brun noir	3-OH absent ou 3-OH substitué
Violet	flavones 5-OH et 4' –OH
	flavones 3-OR et 5-OH, 4' –OH
	flavones ou flavonols 5 –OH avec 4' –OH absent ou substitué en 3
	flavones 6- ou 8-OH
	Chalcones, isoflavones, dihydroflavonols, flavonones
Bleu clair (fluorescent)	flavones sans 5 - OH libre
	flavonols sans 5 –OH libres avec 3-OH substitué
Jaune terne, jaune orangé	flavonols 3 -OH libre avec ou sans 5 -OH substitué
Jaune vert brillant	5 –OH libre ou 5 –OH substitué
Jaune fluorescent	flavonols avec 3 –OH libre
Jaune pâle	Dihydroflavonols

B* Relation : structure –Rf :

Les relations existant entre le Rf (rapport frontal ou facteur de rétention) et la structure des molécules apportaient aussi des renseignements sur la structure des polyphénols séparés par CCM. Le comportement chromatographique en fonction de la composition moléculaire dans un solvant alcoolique ou aqueux permettait de mentionner les premières indications concernant la substitution de la molécule (Tableau 4).

$$R_f = A / B.$$

De sorte que :

- ☞ A : représente la distance entre l'origine (le dépôt) et la tâche du produit.
- ☞ B : représente la distance entre l'origine (le dépôt) et le front du solvant (Figure 20).

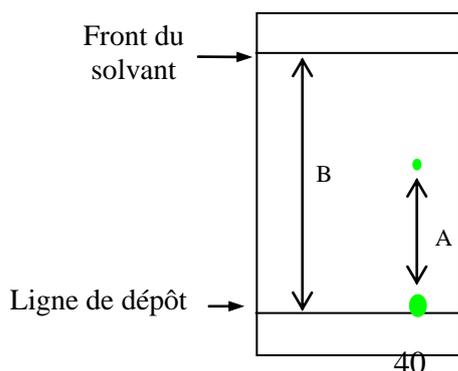


Figure 20 : Le rapport frontal (Rf).

Tableau 4 : Relation entre le Rf et la structure (Markham 1982).

Structure flavonique	Rf (rapport frontal)
Augmentation des OH	Diminution du Rf dans un solvant lipophile
Glycosylation	Rf augmente dans un solvant aqueux Rf diminue dans un solvant alcoolique.
Hydroxyles méthylés	Rf augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3 –OH libre	Rf nul dans l'eau

2.1.4. Spectres méthanoliques : Après grattage du gel et filtration comme décrit précédemment (dans le Screening phytochimique des extraits), les flavonoïdes sont récupérés sous forme de solutions méthanoliques. Les spectres d'absorption UV-visible ont été réalisés pour chaque composé afin de confirmer sa nature.

2.1.5. Hydrolyses des hétérosides : Afin de compléter le protocole d'identification en déterminant les substitutions flavoniques, nous avons effectué une hydrolyse acide ou alcaline aux flavonoïdes séparés.

L'hydrolyse acide s'appliquait dans le cas des substituants O-glycosyles. L'extrait purifié était chauffé en présence de l'acide chlorhydrique (2N) dans un bain-marie, pendant 15 à 120 min. selon le degré de substitution de l'aglycone. Après refroidissement, l'aglycone était récupéré par affrontement à l'éther diéthylique. Puis, la phase aqueuse provenant de l'hydrolyse des hétérosides était concentrée ; elle contenait les sucres libérés qui étaient confrontés par co-CCM avec des témoins (glucose, xylose, rhamnose, galactose et arabinoseetc.). Cette chromatographie s'effectuait sur plaque de silice avec le système solvant : acétone / eau (90 / 10 : V / V).

La révélation des sucres était effectuée par du malonate d'aniline, suivi d'un passage à l'étuve à 100°C (Markham 1982).

L'hydrolyse alcaline était réalisée pour les flavonoïdes supposés acylés. Ces derniers étaient mis dans une solution à 10 % de potasse (1N) pendant 30 min. sous courant d'azote. Au terme de cette réaction, le milieu était acidifié par l'acide chlorhydrique (2N) jusqu'à pH = 3 puis épuisé par l'éther diéthylique pour extraire l'aglycone. Quant aux sucres qui étaient restés dans la phase aqueuse, ils subissaient le même traitement décrit pour l'hydrolyse acide (Markham 1982).

2.2. Test de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes identifiés :

Objectif : Déterminer parmi les flavonoïdes extraits et identifiés ceux qui avaient la plus grande activité inhibitrice *in vitro* contre des bactéries à Gram-positif, des bactéries à Gram-négatif et des levures.

Protocole : Ce test était réalisé selon le même protocole décrit précédemment pour tester l'activité antimicrobienne des extraits éthanoliques et méthanoliques.

2.3. Test de l'activité antioxydante des flavonoïdes identifiés :

Objectif : Déterminer parmi les flavonoïdes extraits et identifiés ceux qui avaient la plus grande activité antioxydante *in vitro*.

Protocole : Ce test était aussi réalisé selon le même protocole décrit pour les extraits éthanoliques et méthanoliques.

2.4. Test de l'activité cytotoxique des flavonoïdes identifiés :

Objectif : Tester l'activité cytotoxique des flavonoïdes extraits et identifiés afin de déterminer les molécules les plus actives.

Protocole : Ce test était réalisé sur des cellules FL selon le même protocole décrit pour les extraits éthanoliques et méthanoliques.

2.5. Mesure de l'activité antibactérienne *in vivo* contre *Streptococcus pneumoniae* :

Objectif : Déterminer l'activité antibactérienne *in vivo* des composés 3, 8 et 32 contre *Streptococcus pneumoniae*.

Cette bactérie responsable d'infections respiratoires très sérieuses. Elle a été choisie comme exemple car nos extraits s'étaient révélés plus actifs contre les bactéries à Gram-positif.

Principe : Les molécules sélectionnées se sont avérées des flavonoïdes antibactériens très actifs, notamment contre les bactéries à Gram-positif. Cette expérience consistait à inoculer des quantités déterminées de *Streptococcus pneumoniae* à des rats, puis à leur administrer différentes doses des flavonoïdes testés comme traitement. L'évolution du nombre de microorganismes injectés (évolution positive ou négative) permettait de mettre en évidence l'activité des flavonoïdes et déterminer la molécule la plus active ; c'est-à-dire, celle qui abaissait au maximum le nombre des germes.

Application : Nous avons utilisé des rats males albinos Wistar, de poids variant entre 190 et 210 g et âgés de trois semaines. Les animaux ont été placés dans une chambre réglée à $26 \pm 2^\circ\text{C}$ et exposés à la lumière pendant 12 H par jour et au noir pendant les 12 H restantes (Miyazaki et al. 2002). L'humidité relative de la salle était aux environs de 50 %. Les rats avaient accès libre à la nourriture et à l'eau.

Streptococcus pneumoniae a étéensemencée dans un bouillon Todd-Hewitt pendant 24 H à 35°C . Les bactéries ont ensuite été recueillies en phase exponentielle de croissance et séparées du bouillon par centrifugation pendant 10 min. à $2000 \times g$ et à 4°C . La récupération des cellules s'est faite dans une solution saline tamponnée (NaCl 0.1 M, citrate de sodium 0.005 M, pH 7.0) de sorte à avoir une concentration de 5×10^7 UFC / ml.

Les rats ont été anesthésiés avec de la kétamine-xylazine puis infectés par instillation intra-nasale de 0.5 ml de la suspension bactérienne déjà préparée.

Les flavonoïdes testés ont été préparés sous forme de solution à différentes concentrations, allant de 10 à 70 mg / ml.

Les animaux ont été divisés en plusieurs lots de 5 rats chacun. Le premier lot a été infecté puis laissé sans traitement (témoin négatif) ; le deuxième a été infecté puis traité avec de l'amoxicilline (témoin positif) et les autres ont été traités avec différentes doses des flavonoïdes utilisés.

L'administration du traitement s'est faite 20 H après l'infection et a duré 3 jours : trois doses ont été administrées par jours, à 6 H d'intervalle.

Les animaux ont été sacrifiés 20 H après la dernière administration. Les poumons de chaque rat ont été prélevés, rincés avec de l'eau distillée stérile, broyés à l'aide d'un broyeur de tissus Tenbroeck autoclavé et homogénéisés dans 5 ml d'eau physiologique. Ceci afin de préparer des suspensions adéquates pour le dénombrement microbiologique.

L'ensemencement de 0.1 ml de suspension s'est fait sur gélose au sang et après 24 H d'incubation à 37°C, les microorganismes ont été dénombrés en UFC par poumon (Miyazaki et al. 2002).

Les DE_{50} (dose effective médiane : dose diminuant de 50 % le nombre de microorganismes du départ) ont été mesurées par la méthode probit.

L'évaluation de l'efficacité du traitement = nombre de germes récupérés des organes non traités - nombre de germes récupérés des organes traités.

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm écart type. Les différences du nombre de germes vivants ont été calculées statistiquement par le logiciel SPSS 14.0 pour Windows avec le test U de Mann Whitney (Miyazaki et al. 2002).

2.6. Mesure de la toxicité aiguë de quelques flavonoïdes identifiés :

Ce test a été réalisé pour les flavonoïdes ayant montré une bonne activité antimicrobienne, une bonne activité antioxydante et/ou une bonne activité cytotoxique. C'est-à-dire, les flavonoïdes qui représentaient un éventuel intérêt thérapeutique.

Objectif : Mesurer la dose létale 0 (DL_0) et la dose létale 50 (DL_{50}) des flavonoïdes testés sur des rats, afin de déterminer les molécules les moins toxiques.

Principe : Administrer des doses croissantes de flavonoïdes à des rats et déterminer au fur et à mesure la dose maximale testée qui ne provoquait aucune mortalité (DL_0) et la dose qui entraînait 50 % de décès (DL_{50}) parmi les animaux traités. La technique d'application utilisée était celle de Lorke (1983).

Application : Les flavonoïdes testés ont été séchés à sec dans un rotavapor, puis préparés sous forme de dilutions de 2 mg / ml afin de faciliter l'administration.

Des rats albinos Wistar, males, âgés de 20 jours et pesant entre 190 et 210 g ont été utilisés pour cette expérience.

Ils ont été gardés pendant 12 H à jeun avant le test. Puis, ils ont été répartis en lots de cinq rats chacun. A chaque lot, nous avons administré oralement une dose déterminée de flavonoïdes. Les doses étaient de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 mg / Kg du flavonoïde testé, sous forme de dilution. Le dernier lot a été administré avec 4 ml / Kg d'eau distillée et était considéré comme témoin. Les animaux ont ensuite eu libre accès à la nourriture et à l'eau.

Les symptômes de toxicité et de mortalité (convulsions, spasmes musculaires, extension tonique, salivation importante, analgésie, jaunissement, perte de reflex) ont été observés 24 H après l'administration. Les DL₀ et DL₅₀ ont été obtenues après réalisation de la courbe représentant le taux de mortalité en fonction de la dose administrée.

3. Biodegradation Des Tannins Condensés :

Origine des plantes : Cette étude a été réalisée sur deux types de plantes :

- ☞ Des téguments de graines de *Vicia faba L. var. seville* (fèves) provenant du laboratoire de phytochimie, Université Claude Bernard (Lyon, France). Les graines apportées ont été réensemencées et cultivées afin d'avoir une plus grande quantité de graines fraîches.
- ☞ Des feuilles de *Camellia sinensis* (thé noir, voucher n° : wdr/tspf 200). La plante a été récoltée dans les bassins d'Illizi (Sahara de l'Est algérien). La confirmation de l'identification a été réalisée au département de l'agronomie et de l'environnement, Institut National Agronomique Paris-Grignon INAPG (France).

Ces deux plantes ont été choisies pour leur grande teneur en tannins condensés (Tinkilic et Uyanik 2001, Zduńczyk et al. 2003).

Objectif : Rechercher des moisissures du sol capables de dégrader les tannins condensés de ces deux plantes en produisant une tannase. Puis, sélectionner les meilleures espèces productrices et mesurer l'activité enzymatique de l'enzyme produite.

Principe : Cultiver les moisissures isolées sur un milieu contenant de l'acide tannique comme seule source de carbone afin de ne laisser croître que les espèces productrices de tannase. Puis, cultiver ces espèces sur d'autres milieux ne contenant comme seule source de carbone que les tannins condensés extraits des plantes. Ceci permettait de sélectionner les espèces productrices de tannase dégradant les tannins condensés aussi bien que les hydrolysables. L'activité enzymatique de l'enzyme a ensuite été mesurée par la méthode décrite par Sharma et ses collaborateurs (2000).

3.1. Préparations des extraits tanniques :

3.1.1. Extraction des tannins condensés :

Les tannins condensés des plantes utilisées ont été extraits par trois macérations successives du matériel végétal sous agitation, pendant 24 H dans un mélange acétone / eau (70/30 : V/V) (Gedir et al. 2005). Le rapport solvant / matériel végétal utilisé était de 10 / 1 (ml / g). Après une décantation de 24 H, les extraits ont ensuite été filtrés et évaporés à sec dans un rotavapor à 60°C. Les résidus secs obtenus ont été ramenés à un volume de 100 ml par dilution dans de l'eau distillée.

3.1.2. Séparation des tannins par partitions entre solvants :

Les partitions (affrontements) entre solvants nous ont permis de séparer les molécules extraites selon leur degré de polymérisation.

Elles ont été réalisées selon le même protocole décrit pour les flavonoïdes. Le premier affrontement était réalisé avec l'éther de pétrole pour soutirer les produits non phénoliques (principalement les lipides). Cette phase a ensuite été rejetée. Le deuxième affrontement réalisé avec l'éther diéthylique, a permis d'extraire les tannins monomériques. Le troisième avec l'acétate d'éthyle a soutiré les tannins dimériques. Le quatrième avec le méthyl-éthyl-cétone (MEC) et le cinquième avec le n-butanol ont soutiré les tannins oligomériques et les tannins polymériques respectivement. La phase aqueuse récupérée en dernier contenait donc les tannins condensés restants (non soutirés) (Bate-Smith 1975).

Chaque phase obtenue était évaporée à sec dans le rotavapor puis reprises avec 5 ml de méthanol.

3.1.3. Chromatographie préparative sur couche mince et spectre UV-visible des spots :

Pour chacune des phases obtenues, nous avons réalisé une CCM analytique selon le même protocole décrit auparavant pour le screening phytochimique des extraits bruts. Le support utilisé était le gel de silice (Mabry et Ulubelen 1980). Ce dernier était préparé en mélangeant la poudre de silice avec de l'eau distillée (30 g / 60 ml). Le dosage s'est fait par tâtonnement.

Après étalement du gel sur les plaques en verre et séchage, ces dernières ont été activées par chauffage dans une étuve à 100°C pendant 1 H (Mabry et Ulubelen 1980).

Les systèmes solvants essayés étaient :

- ☞ Toluène / Acétone / Acide formique (6 / 1 / 1 : V / V / V).
- ☞ Acétone / H₂O (55 / 45 : V / V).
- ☞ Toluène / Acétone / Acide formique (6 / 6 / 1 : V / V / V).

Mais le dernier s'est avéré comme étant le meilleur pour toutes les phases.

Après la migration dans une cuve de CCM, la révélation des plaques analytiques s'est faite avec de la vanilline / HCl (1 g / 100 ml) et un chauffage à 80°C pendant 30 min. (Mabry et Ulubelen 1980).

Les spots ont ensuite été grattés sur le gel et filtrés avec du méthanol, comme décrit précédemment.

Les spectres UV-visible ont été réalisés pour chaque spot afin de confirmer qu'il représentait effectivement un tannin condensé.

Afin de réaliser la suite des analyses, les parties des phases non encore utilisées ont été évaporées à sec une seconde fois puis reprises dans de l'eau distillée stérile, de sorte à avoir des concentrations de 1 / 10. Chaque phase a été divisée en deux : la première a servi pour le dosage des tannins et la deuxième consacrée à la recherche des moisissures produisant la tannase.

3.2. Dosage et identification des tannins condensés :

Le dosage a été réalisé pour chaque phase par la méthode n-butanol / HCl (Bate-Smith 1975). L'objectif étant de déterminer la proportion des différents types de tannins présents dans les phases obtenues (éther diéthylique, acétate d'éthyle, MEC, butanol et l'H₂O).

Le mélange n-butanol / HCl, une fois chauffé, scindait les liaisons C4-C8 qui liaient les monomères tanniques entre eux, libérant ainsi des anthocyanes (Bate-Smith 1975). La même quantité des phases a été utilisée pour chaque dosage afin de ne pas fausser les résultats. Le réactif de dosage a été préparé en mélangeant 95 ml de n-butanol avec 5 ml d'HCl. Pour chaque 0,5 ml de la phase considérée ont été ajoutés 4,5 ml du réactif.

Les solutions obtenues ont été mises dans un bain-marie à ébullition pendant 2 H à 90°C puis refroidies directement avec de l'eau froide pour stopper les réactions d'hydrolyse.

Les spectres UV-visible ont été réalisés après le dosage pour chaque phase. Ils ont permis d'identifier la nature de ces monomères et donc la structure des tannins initiaux.

3.3. Isolement des moisissures capables de dégrader les tannins condensés :

Un échantillon du sol a été prélevé autour des plantes de *V. faba L. seville* cultivées localement, et un deuxième autour des plantes de *Camellia sinensis*.

Ces sols ont été choisis parce que la distribution des microorganismes est conditionnée principalement par la disponibilité des composés qu'ils dégradent. Donc, autour des plantes connues pour être riches en tannins, les chances de trouver des moisissures capables de dégrader ces composés étaient plus grandes.

L'ensemencement des échantillons a été réalisé sur les milieux Malt Agar Blakeslee (MAB) et Sabouraud (S), avec une incubation à 25°C pendant 72 H (Hayaloglu et Kirbag 2007). Les moisissures apparues ont été repiquées plusieurs fois jusqu'à être complètement isolées. L'identification des espèces obtenues a été réalisée selon les méthodes traditionnelles. C'est-à-dire, observation microscopique et caractérisation sur les milieux précédemment cités (Botton et al. 1990, Samson et al. 2004). La confirmation des résultats a été réalisée au Centre de Biotechnologie Agricolaire (Agricultural Biotechnology Center) à Godollo, en Hongrie.

Trois milieux de culture modifiés ont été préparés pour cette expérience. Le premier contenait les minéraux nécessaires à la croissance des moisissures et l'acide tannique comme seule source de carbone (milieu AT).

Le deuxième contenait à la place de l'acide tannique les tannins condensés de *V. faba L. seville* révélés après le dosage comme étant majoritaires (milieu TC_F). Dans notre cas, c'étaient les molécules soutirées avec le MEC et le n-butanol (tannins oligomériques).

Le troisième milieu a été préparé selon le même principe, en utilisant les tannins condensés de *Camellia sinensis* soutirés avec le n-butanol. C'est-à-dire les tannins polymériques. Ces derniers ont été révélés comme étant majoritaires dans cette plante (milieu TC_T).

Le milieu AT a été préparé suivant les travaux de Pinto et al. (2001) ; et les autres milieux par modification de ce dernier.

- Milieu AT (milieu à l'acide tannique), pour 1 litre : Acide tannique : 10g, NaNO₃ : 3g, KH₂PO₄ : 1g, MgSO₄.7H₂O : 00,5g, KCl : 0,5g, FeSO₄ : 0,07g, Agar : 30g, pH : 5,5.

- Milieu TC_F (milieu aux tannins condensés des fèves), pour 1 litre : Tannins des fèves soutirés avec le MEC : 10g, NaNO₃ : 3g, KH₂PO₄ : 1g, MgSO₄.7H₂O : 00,5g, KCl : 0,5g, FeSO₄ : 0,07g, Agar : 30g, pH : 5,5.

- Milieu TC_T (milieu aux tannins condensés du thé), pour 1 litre : Tannins du thé soutirés avec le butanol : 10g, NaNO₃ : 3g, KH₂PO₄ : 1g, MgSO₄.7H₂O : 00,5g, KCl : 0,5g, FeSO₄ : 0,07g, Agar : 30g, pH : 5,5.

La stérilisation des milieux s'est faite par autoclavage à 110°C pendant 15 min. (Pinto et al. 2001).

Les moisissures précédemment isolées ont été ensemencées sur ces milieux et incubées à 25°C pendant 72 H (Figure 21).

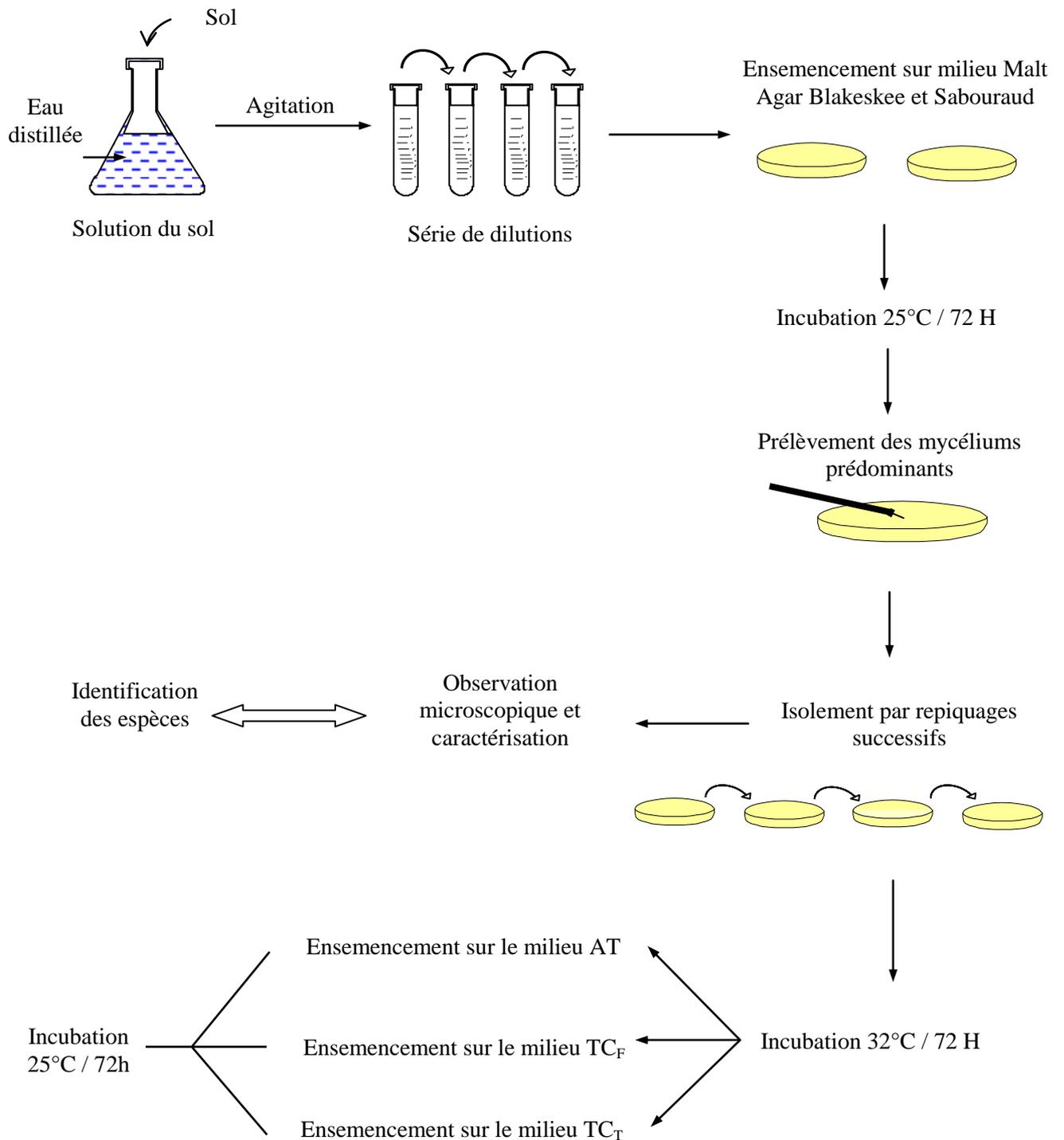


Figure 21 : Protocole d'isolement des moisissures dégradant les tannins condensés.

3.4. Production extracellulaire de la tannase en culture submergée :

Cette étape a été réalisée seulement pour les moisissures ayant montré une croissance sur les milieux TC_F et TC_T. Donc, celles qui ont produit une tannase dégradant aussi bien les tannins hydrolysables que les condensés.

Ces espèces ont été cultivées dans des erlenmeyers contenant le milieu MAB ou S, puis incubées à 25°C pendant 72 H. Des solutions de spores fongiques ont été préparées pour chaque moisissure en ajoutant 2,5 ml d'eau distillée stérile contenant du Tween 80 à des cultures entièrement sporulées se trouvant toujours dans les erlenmeyers. Les spores ont été détachées de la surface des mycéliums sous une hotte et dans des conditions strictement aseptiques. Le nombre de spores viables dans la suspension a été déterminé par dénombrement sur cellule de Malassez (Costa et al. 2008).

Pour chaque moisissure, nous avons prélevé un volume de 1 ml de suspension ayant une concentration de 5×10^9 spores. Ce dernier a été utilisé comme inoculum pour la suite des opérations.

Les solutions de spores ont été inoculées dans des erlenmeyers contenant 25 ml d'un milieu spécifique et modifié. Le milieu original a été décrit par Costa et ses collaborateurs (2008).

La constitution du milieu utilisé était la suivante : KH₂PO₄ : 1,0 g ; Mg SO₄.7H₂O : 2,0 g ; CaCl₂ : 1,0 g ; NH₄Cl : 3,0 g ; extrait de levure : 1 g et Quebracho : 3 g.

Le quebracho a été utilisé du fait qu'il représente un tannin condensé de référence

La culture submergée des espèces s'est faite pendant six jours sous agitation de 140 tours/min. dans un agitateur incubateur à 25°C. Des échantillons ont été retirés à intervalles réguliers de 24 H. La biomasse a alors été récupérée par filtration sur papier Wattman n° 1. Le mycélium a été lavé trois fois avec de l'eau distillée stérile dans des conditions aseptiques et son poids sec (la production de biomasse) déterminé après un séchage d'une nuit à 60°C.

Les bouillons de culture séparés des cellules fongiques ont été utilisés pour tester l'activité de la tannase extracellulaire (Costa et al. 2008).

3.5. Mesure de l'activité enzymatique de la tannase :

L'activité de la tannase a été estimée par la méthode de la rhodanine (Sharma et al. 2000).

Une quantité de 0,01 M de méthyl gallate a été mélangé dans 0,05 M d'une solution de citrate tampon (pH = 5) de sorte à avoir une suspension utilisée comme substrat (Treviño et al. 2007). Dans un tube à essai, nous avons mis 0,4 ml de cette suspension avec 0,4 ml du

bouillon de culture considéré et 0,6 ml d'une solution méthanolique de rhodanine à 0,67 %. Les tubes ont été incubés à 30°C pendant 5 min, puis 0,4 ml d'une solution KOH (0,5 N) ont été ajoutés. Après 2,5 min., le mélange a été dilué dans de l'eau distillée et l'absorbance a été mesurée à 520 nm. La couleur rose apparue alors a été lue à 520 nm à l'aide d'un spectrophotomètre et l'activité enzymatique exprimée en unités internationales. Une unité de l'activité de la tannase est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer un micromole d'acide gallique par minute sous les conditions décrites (Sharma et al. 2000).

4. Analyse statistique :

Les moyennes ont été calculées pour les résultats des tests de l'activité antioxydante et l'activité cytotoxique. Ce calcul nous a permis de comparer entre elles les valeurs obtenues et de déterminer les extraits et les flavonoïdes les plus actifs.

Cette analyse a été effectuée avec le logiciel Microsoft Office Excel 2003.

Résultats

1. Quelques Intérêts Biologiques des Extraits Bruts :

Chaque plante a permis de récupérer différentes quantités des extraits bruts. Selon la plante et l'extrait considéré, nous avons des poids hauts d'environ 4 g ou des poids bas n'atteignant pas 1 g / 300 g de plante. Les valeurs obtenues ont été citées dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Poids des extrais bruts pour 300g de chaque plante.
M : extrait méthanolique, E : extrait éthanolique.

Plante (300 g)	Extraits	Poids (g)	Plante (300 g)	Extraits	Poids (g)
<i>Linum capitatum</i>	E	3.6	<i>Allium porrum L.</i>	E	2.1
	M	3.4		M	2.6
<i>Tilia sylvestris</i>	E	2.3	<i>Allium cepa L.</i>	E	1.6
	M	3.1		M	2.9
<i>Mentha longifolia</i>	E	2.8	<i>Allium schoenoprasum L.</i>	E	0.9
	M	3.7		M	3.2
<i>Crocus sativus</i>	E	2.4	<i>Vicia faba L.</i>	E	0.8
	M	2.6		M	2.4
<i>Lippia citriodora</i>	E	3.5	<i>Petroselinum sativum</i>	E	1.0
	M	3.7		M	1.3
<i>Thymus vulgaris</i>	E	3.8	<i>Cichorium intybus L.</i>	E	1.3
	M	4.6		M	2.2
<i>Carthamus tinctorius</i>	E	3.6	<i>Citrus paradisi</i>	E	1.7
	M	3.8		M	3.0
<i>Lavandula officinalis</i>	E	3.3	<i>Apium graveolens L.</i>	E	1.6
	M	4.2		M	2.7
<i>Rosmarinus officinalis</i>	E	2.7	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	E	1.8
	M	1.9		M	4.2
<i>Lamium album</i>	E	1.9	<i>Punica granatum</i>	E	2.4
	M	2.4		M	4.0
<i>Cleome schweinfurthii</i>	E	1.6	<i>Murraya koenigii</i>	E	1.6
	M	1.5		M	3.6
<i>Cuminum cyminum</i>	E	2.6	<i>Artemisia absinthium</i>	E	1.2
	M	2.8		M	1.9
<i>Chamaemelum nobile</i>	E	3.9	<i>Elettaria cardamom</i>	E	2.9
	M	4.5		M	2.9
<i>Camellia sinensis</i>	E	2.5			
	M	4.6			

1.1. Activité antimicrobienne des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts :

L'activité antimicrobienne s'est manifestée par l'apparition des zones d'inhibition autour des disques imprégnés de principes actifs (Photo 1).

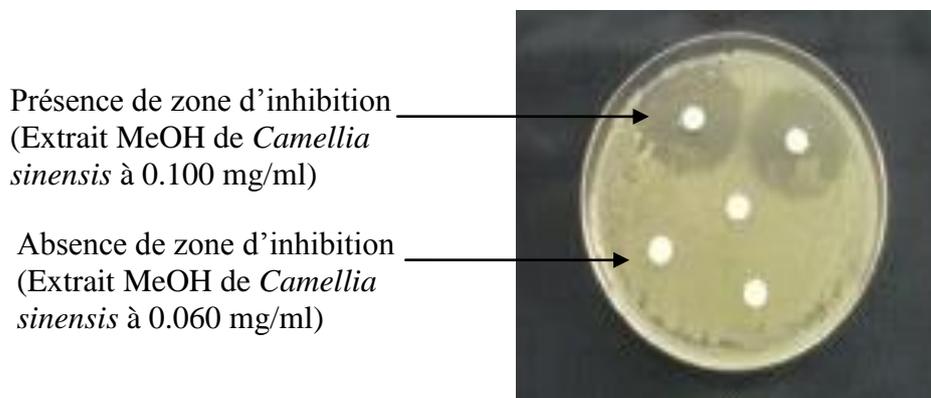


Photo 1 : Traduction de l'activité antimicrobienne sur *Escherichia coli* sous forme de zones d'inhibition.

D'après les résultats obtenus, nous avons constaté que les plantes alimentaires avaient la caractéristique d'avoir des extraits méthanoliques plus actifs que les extraits éthanoliques. En effet, ceci a été remarqué pour la totalité des plantes alimentaires utilisées, mais aussi pour quelques rares plantes médicinales à savoir *Camellia sinensis* et *Carthamus tinctorius* (Tableaux 6, 7 et 8).

Pour les autres plantes médicinales, c'étaient plutôt les extraits éthanoliques qui étaient considérés comme étant plus actifs. En effet, ces derniers ont donné une inhibition de tous les types de microorganismes utilisés (bactéries à Gram-positif, bactéries à Gram-négatif et levures). Par contre, les extraits méthanoliques de ces plantes ont donné une activité antimicrobienne moyenne contre les bactéries à Gram-positif et les levures, et une très faible activité contre les bactéries à Gram-négatif (variable selon la plante et le microorganisme). Comme exemple : *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Yersinia pestis* et *Klebsiella pneumoniae* ont montré une résistance contre la plupart des extraits méthanoliques des plantes médicinales et ont été au contraire bien inhibées par leurs extraits éthanoliques (Tableau 7).

Tableau 6 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et éthanoliques contre les bactéries à Gram-positif (en mg / ml).

Sc.a: *Staphylococcus aureus* ; *B.a:* *Bacillus anthracis* ; *B.s:* *Bacillus subtilis* ; *B.c:* *Bacillus cereus* ; *St.p:* *Streptococcus pneumoniae* ; NT : non testé ; Ext : extraits ; M: extrait méthanolique ; E: extrait éthanolique ; - : pas d'inhibition. Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astéris.

Plantes	Ext.	Sc.a	B.a	B.s	B.c	St.p	Plantes	Ext.	Sc.a	B.a	B. s	B. c	St.p
<i>Camellia sinensis</i>	M	0.065	0.050	0.065	0.035	0.065	<i>Punica granatum</i>	M	0.075	0.085	0.100	0.075	0.095
	E	-	-	-	-	0.140		E	0.140	0.010	-	-	-
<i>Allium porrum L.</i>	M	0.100	0.110	0.120	0.075	0.070	<i>Linum capitatum</i>	M	0.085	0.090	0.100	0.075	0.080
	E	-	-	-	-	0.100		E	-	0.035	-	-	0.060
<i>Allium cepa L.</i>	M	0.110	0.080	0.110	0.075	0.060	<i>Thymus vulgaris</i>	M	0.050	0.120	0.150	0.120	0.070
	E	-	0.130	-	-	-		E	0.030	0.060	0.040	0.055	0.010
<i>Carthamus tinctorius</i>	M	0.090	0.085	0.120	0.090	0.095	<i>Elettaria cardamom</i>	M	0.060	0.030	0.045	0.080	-
	E	-	0.130	-	-	0.100		E	0.030	0.030	0.045	0.050	0.040
<i>Allium schoenoprasum L.</i>	M	0.085	0.060	0.085	0.075	0.060	<i>Rosmarinus officinalis</i>	M	0.040	0.020	0.020	0.050	0.170
	E	-	0.090	-	-	0.120		E	0.030	0.010*	0.040	0.050	0.015
<i>Cleome schweinfurthii</i>	M	0.110	0.035	0.010	0.075	0.090	<i>Crocus sativus</i>	M	0.060	0.045	0.070	0.095	0.050
	E	-	0.090	-	-	-		E	0.060	0.060	0.075	0.090	0.020
<i>Vicia faba L.</i>	M	0.065	-	0.090	0.035	0.060	<i>Murraya koenigii</i>	M	-	0.020	0.035	-	0.030
	E	0.075	-	0.140	0.060	0.085		E	0.090	-	0.055	0.060	0.025
<i>Petroselinum sativum</i>	M	0.120	0.090	-	0.110	0.100	<i>Tilia sylvestris</i>	M	-	0.040	0.050	0.100	-
	E	-	0.120	-	-	-		E	0.090	0.140	0.120	0.090	0.105
<i>Cichorium intybus L.</i>	M	0.010	0.045	0.010	0.075	0.030	<i>Lavandula officinalis</i>	M	0.040	0.040	0.065	0.050	0.090
	E	-	-	-	-	0.120		E	0.020	0.020	0.005*	0.025	0.025
<i>Citrus paradisi</i>	M	0.060	0.030	0.010	0.060	0.035	<i>Lamium album</i>	M	0.095	0.120	0.105	0.150	0.100
	E	-	0.095	-	-	0.080		E	0.080	0.090	0.045	0.080	0.020
<i>Apium graveolens L.</i>	M	0.075	0.070	0.100	0.090	0.060	<i>Cuminum cyminum</i>	M	0.060	0.090	-	0.080	0.090
	E	-	-	-	-	0.120		E	0.030	0.040	0.030	0.030	0.050
<i>Lippia citriodora</i>	M	0.045	0.060	0.085	0.045	0.045	<i>Artemisia absinthium</i>	M	0.080	0.055	0.080	0.060	0.065
	E	-	0.020	-	-	0.020		E	0.045	0.015	0.020	0.030	0.020
<i>Mentha longifolia</i>	M	0.100	0.080	0.120	0.100	0.090	<i>Chamaemelum nobile</i>	M	-	0.120	0.200	0.170	0.170
	E	-	0.025	-	-	0.045		E	0.150	-	0.200	0.090	0.080
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	M	0.060	0.065	0.075	0.040	0.065	Ampicilline (10 µg / disque)	NT	0.020	0.010	NT	0.025	
	E	-	0.120	-	-	0.100							

Tableau 7 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques et éthanoliques contre les bactéries à Gram-négatif (en mg / ml).

E.c: *Escherichia coli* ; *P.a:* *Pseudomonas aeruginosa* ; *S.t:* *Salmonella typhi* ; *S.p:* *Salmonella paratyphi* ; *Y.p:* *Yersinia pestis* ; *K.p:* *Klebsiella pneumoniae*; NT : non testé ; Ext : extraits ; M: extrait méthanolique ; E: extrait éthanolique ; - : pas d'inhibition. Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astérisque.

Plantes	Ext.	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>S.p</i>	<i>Y.p</i>	<i>K.p</i>	Plantes	Ext.	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>S.p</i>	<i>Y.p</i>	<i>K.p</i>
<i>Camellia sinensis</i>	M	0.080	-	-	0.120	-	-	<i>Punica granatum</i>	M	0.070	-	0.090	0.120	0.100	-
	E	-	-	-	-	-	-		E	0.090	-	-	-	-	-
<i>Allium porrum L.</i>	M	0.120	-	0.130	0.120	0.125	-	<i>Linum capitatum</i>	M	0.065	-	0.120	0.120	-	-
	E	-	-	-	-	-	-		E	0.065	-	0.040	0.060	0.060	-
<i>Allium cepa L.</i>	M	-	-	0.120	0.125	0.095	-	<i>Thymus vulgaris</i>	M	-	0.100	-	-	-	-
	E	-	-	0.130	-	-	-		E	0.060	0.040	0.030	0.035	0.080	-
<i>Carthamus tinctorius</i>	M	0.100	-	0.110	0.120	0.130	-	<i>Elettaria cardamom</i>	M	-	0.090	0.040	0.060	0.080	-
	E	-	-	-	-	-	-		E	0.070	0.050	0.040	0.010*	0.120	0.110
<i>Allium schoenoprasum L.</i>	M	-	-	0.080	0.090	0.095	-	<i>Rosmarinus officinalis</i>	M	0.050	0.050	-	-	-	-
	E	-	-	0.130	-	-	-		E	0.030	0.020	0.005*	0.025	0.040	0.030
<i>Cleome schweinfurthii</i>	M	-	-	0.120	0.090	0.115	-	<i>Crocus sativus</i>	M	0.100	0.120	0.200	0.150	-	-
	E	-	-	-	0.130	-	-		E	0.020	0.015	0.005*	0.010*	0.010*	0.010*
<i>Vicia faba L.</i>	M	0.060	-	0.085	0.095	0.110	-	<i>Murraya koenigii</i>	M	0.100	0.090	-	-	-	-
	E	-	-	0.110	-	-	-		E	0.025	0.050	0.035	0.025	0.020	0.015
<i>Petroselinum sativum</i>	M	-	-	0.130	0.120	-	-	<i>Tilia sylvestris</i>	M	0.120	0.120	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-		E	0.050	0.075	0.010	0.075	0.060	-
<i>Cichorium intybus L.</i>	M	-	-	0.050	0.045	0.080	-	<i>Lavandula officinalis</i>	M	0.070	0.090	-	0.060	-	-
	E	-	-	0.120	0.100	0.130	-		E	0.035	0.040	0.020	0.035	0.025	0.005*
<i>Citrus paradisi</i>	M	0.100	-	0.080	0.090	0.060	-	<i>Lamium album</i>	M	-	0.120	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-	-		E	0.100	0.090	0.030	0.110	0.045	0.035
<i>Apium graveolens L.</i>	M	0.120	-	0.100	0.080	0.095	-	<i>Cuminum cyminum</i>	M	0.120	0.140	-	-	-	-
	E	-	-	0.100	0.120	0.090	-		E	0.050	0.050	0.020	0.075	0.100	0.090
<i>Lippia citriodora</i>	M	0.090	-	0.070	0.080	0.075	-	<i>Artemisia absinthium</i>	M	0.120	0.100	0.060	-	-	-
	E	0.100	-	0.030	0.030	0.030	-		E	0.060	0.070	0.010*	0.060	0.035	0.010*
<i>Mentha longifolia</i>	M	-	-	0.120	0.080	0.120	-	<i>Chamaemelum nobile</i>	M	-	-	-	-	-	-
	E	-	-	0.060	0.040	0.055	-		E	0.100	0.120	0.100	0.090	0.120	0.100
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	M	-	-	0.100	0.090	0.100	-	Ampicilline (10 µg/disque)		NT	NT	0.015	0.010	-	-
	E	-	-	0.120	0.080	0.130	-								

Tableau 8 : Résultats de l'activité antifongique des extraits méthanoliques et éthanoliques (en mg / ml).

C.a: *Candida albicans* ; *C.m:* *Candida maltosa* ; *C.n:* *Cryptococcus neoformans* ; NT : non testé ; Ext : extraits ; M: extrait méthanolique ; E: extrait éthanolique ; - : pas d'inhibition.

Plantes	Ext.	<i>C.a</i>	<i>C.m</i>	<i>C.n</i>	Plantes	Ext.	<i>C.a</i>	<i>C.m</i>	<i>C.n</i>
<i>Camellia sinensis</i>	M	0.090	-	0.095	<i>Punica granatum</i>	M	0.050	0.140	0.090
	E	-	-	-		E	0.075	-	0.090
<i>Allium porrum L.</i>	M	-	-	-	<i>Linum capitatum</i>	M	0.110	-	0.110
	E	-	-	0.040		E	-	-	-
<i>Allium cepa L.</i>	M	0.050	0.040	0.060	<i>Thymus vulgaris</i>	M	0.070	0.070	0.120
	E	0.060	-	0.140		E	0.030	0.070	0.055
<i>Carthamus tinctorius</i>	M	0.090	-	-	<i>Elettaria cardamom</i>	M	0.055	0.040	0.060
	E	-	-	0.060		E	0.050	0.040	0.020
<i>Allium schoenoprasum L.</i>	M	0.075	0.090	-	<i>Rosmarinus officinalis</i>	M	0.050	0.070	0.050
	E	-	-	0.110		E	0.030	0.050	0.045
<i>Cleome schweinfurthii</i>	M	-	0.140	-	<i>Crocus sativus</i>	M	0.050	0.050	0.070
	E	-	-	0.075		E	0.020	0.035	0.050
<i>Vicia faba L.</i>	M	0.080	0.090	0.080	<i>Murraya koenigii</i>	M	0.060	0.060	0.050
	E	0.090	-	-		E	0.030	0.025	0.030
<i>Petroselinum sativum</i>	M	-	-	-	<i>Tilia sylvestris</i>	M	0.120	-	-
	E	-	-	0.140		E	0.100	0.120	0.090
<i>Cichorium intybus L.</i>	M	0.090	0.110	-	<i>Lavandula officinalis</i>	M	0.070	0.060	0.090
	E	-	-	0.090		E	0.040	0.035	0.050
<i>Citrus paradisi</i>	M	0.090	0.090	-	<i>Lamium album</i>	M	0.120	0.090	-
	E	-	-	0.090		E	0.040	0.020	0.040
<i>Apium graveolens L.</i>	M	0.090	0.090	0.050	<i>Cuminum cyminum</i>	M	0.090	0.090	0.100
	E	0.050	0.060	0.030		E	0.050	0.070	0.090
<i>Lippia citriodora</i>	M	-	-	-	<i>Artemisia absinthium</i>	M	0.050	0.065	0.045
	E	-	-	-		E	0.030	0.025	0.020
<i>Mentha longifolia</i>	M	0.075	0.110	0.075	<i>Chamaemelum nobile</i>	M	-	-	-
	E	0.030	0.050	0.040		E	0.080	-	-
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	M	0.025	0.090	0.030	Ampicilline (10 µg / disque)	NT	-	-	-
	E	0.050	0.140	0.060					

En comparant les CMI des bactéries entre elles, il s'est avéré que les bactéries à Gram-positif étaient plus sensibles aux différents extraits utilisés que celles à Gram-négatif ; et ce qu'il s'agissait de plantes alimentaires ou médicinales (Photo 2). Les levures, quant à elles, se classaient entre les deux. En effet, ces dernières étaient plus sensibles que les bactéries à Gram-négatif et plus résistantes que les bactéries à Gram-positif.



Photo 2 : Trois répétitions de l'activité de l'extrait méthanolique de *Vicia faba L.* à 0,060 mg / ml contre *Escherichia coli*.

Donc, si nous devons classer les extraits selon leur activité et les microorganismes selon leur sensibilité, nous obtiendrions :

Pour les plantes alimentaires : extraits méthanoliques > extraits éthanoliques.

Pour les plantes médicinales : extraits méthanoliques < extraits éthanoliques.

Pour les microorganismes : bactéries à Gram-positif < levures < bactéries à Gram-négatif.

D'après les CMI obtenues, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* n'ont été inhibées par aucun extrait des plantes alimentaires, ni par les extraits de cinq plantes médicinales : *Camellia sinensis*, *Carthamus tinctorius*, *Lippia citriodora*, *Mentha longifolia* et *Linum capitatum*. Ces bactéries se sont donc révélées comme étant les espèces les plus résistantes (Tableau 6).

Plusieurs plantes se sont avérées comme étant de grandes antimicrobiennes, parmi elles nous pouvons citer : *Camellia sinensis*, *Allium schoenoprasum L.*, *Vicia faba L.*, *Citrus paradisi*, *Lippia citriodora*, *Vaccinium macrocarpon*, *Punica granatum*, *Linum capitatum*, *Lavandula officinalis*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Crocus sativus* et

Elettaria cardamom. Néanmoins, les meilleurs valeurs ont été enregistrées pour l'extrait éthanolique de *Lavandula officinalis* avec 0.005 mg / ml contre *Escherichia coli* et *Salmonella paratyphi*.

Aussi, la majorité des extraits a donné une inhibition des levures et s'est donc avérée plus active que l'antibiotique testé comme témoin (l'ampicilline).

Il est toutefois important de noter que plusieurs espèces considérées comme étant très pathogènes ont été inhibées par différents extraits et avec des CMI's très intéressantes dépassant celles de l'ampicilline ; comme : *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Yersinia pestis* et *Klebsiella pneumoniae*.

1.2. Activité antioxydante des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts :

Contrairement aux résultats de l'activité antimicrobienne, le test antioxydant a montré que les extraits méthanoliques étaient plus actifs comparés aux extraits éthanoliques, et ce pour les deux types de plantes : alimentaires et médicinales.

Les plus grandes activités étaient enregistrées pour les extraits méthanoliques de *Camellia sinensis*, *Punica granatum*, *Allium porrum L.*, *Vicia faba L.*, *Vaccinium macrocarpon*, *Linum capitatum*, *Lavandula officinalis* et *Artemisia absinthium*. Avec des maximums d'activité données par *Punica granatum* et *Artemisia absinthium* : 55.78 % et 50.50% respectivement à 10 µg / ml (Tableau 9). Le calcul des moyennes a confirmé cette constatation en donnant pour ces deux plantes les plus grandes moyennes d'activité : 77.746% et 78.302 % respectivement. Ce calcul a aussi fait ressortir l'activité de *Vaccinium macrocarpon*. Car en effet, son extrait méthanolique n'a donné que 26.06 % à 10 µg / ml, mais a carrément atteint 92.07 % à 50 µg / ml.

Au contraire, les extraits méthanoliques de *Allium porrum L.*, *Vicia faba L.*, *Tilia sylvestris*, *Rosmarinus officinalis* et *Murraya koenigii* ont donné des résultats très faibles avec des activités qui n'apparaissaient qu'à 50 µg / ml. Les extraits éthanoliques, quant à eux, ont tous donné des valeurs très faibles, ne dépassant pas 9 % à 10 µg / ml. Ces valeurs étaient insignifiantes comparées à celles données par les extraits méthanoliques.

Tableau 9 : Résultats de l'activité antioxydante exprimés en pourcentage.

M: extrait méthanolique; E: extrait éthanolique; RAS (%): Radical Scavenging Activity : activité radicale scavenging exprimée en pourcentage.

Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astérix.

Plantes	Extraits	RSA (%)					Moyenne
		10µg/ml	50µg/ml	100µg/ml	500µg/ml	1000µg/ml	
<i>Camellia sinensis</i>	M	43.50	44.07	52.75	81.92	92.26	62.900
	E	0.00	0.00	8.57	15.87	22.94	09.476
<i>Allium porrum L.</i>	M	9.15	55.39	92.25	95.54	95.20	69.506
	E	0.00	0.00	14.60	14.91	17.80	09.462
<i>Allium cepa L.</i>	M	6.02	17.34	15.63	98.10	98.98	47.214
	E	0.00	0.00	0.00	0.00	6.29	1.258
<i>Carthamus tinctorius</i>	M	0.00	0.00	10.78	89.73	88.70	37.842
	E	0.00	0.00	0.00	10.34	16.21	05.310
<i>Allium schoenoprasum L.</i>	M	0.00	0.00	18.53	74.40	99.98	38.582
	E	0.00	0.00	0.00	9.44	37.90	9.468
<i>Cleome schweinfurthii</i>	M	0.20	2.87	10.36	64.69	84.80	32.584
	E	0.00	0.00	0.00	0.00	2.65	0.530
<i>Vicia faba L.</i>	M	29.98	50.72	80.84	92.45	94.29	69.656
	E	0.00	0.00	10.05	22.77	31.80	12.924
<i>Petroselinum sativum</i>	M	22.37	19.08	21.42	41.56	63.60	33.606
	E	0.00	0.00	0.00	0.00	4.02	0.804
<i>Cichorium intybus L.</i>	M	13.78	17.13	33.51	40.10	58.69	32.642
	E	0.00	0.00	0.00	12.64	17.32	5.992
<i>Citrus paradisi</i>	M	0.00	5.62	51.00	99.00	99.62	51.048
	E	0.00	0.00	0.00	0.00	13.96	2.792
<i>Apium graveolens L.</i>	M	16.12	27.45	50.32	93.90	94.34	56.426
	E	0.00	0.00	0.00	0.00	23.83	4.766
<i>Lippia citriodora</i>	M	3.22	7.95	14.04	60.52	99.41	37.028
	E	0.00	0.00	7.78	16.38	33.80	11.592
<i>Mentha longifolia</i>	M	16.90	21.47	36.19	91.76	93.12	51.888
	E	0.00	2.04	12.00	16.34	24.30	10.936
<i>Vaccinium macrocarpon</i>	M	26.06	54.85	92.07	93.36	95.25	72.318
	E	4.30	3.51	10.24	39.90	38.80	19.350
<i>Punica granatum</i>	M	55.78*	62.39	79.45	95.24	95.87	77.746
	E	0.00	14.34	11.05	43.56	56.41	25.072

<i>Linum capitatum</i>	M	40.50	46.70	53.40	89.78	93.30	64.736
	E	0.00	4.02	13.00	23.51	29.00	13.906
<i>Tilia sylvestris</i>	M	9.15	55.39	92.25	95.54	95.20	69.506
	E	2.03	4.50	14.60	14.91	17.80	10.768
<i>Crocus sativus</i>	M	20.02	21.34	35.63	60.10	94.98	46.414
	E	4.00	8.00	10.00	10.00	16.29	09.658
<i>Thymus vulgaris</i>	M	0.00	4.00	10.78	89.73	90.70	39.042
	E	0.00	0.00	4.00	12.34	18.21	06.910
<i>Lavandula officinalis</i>	M	48.50*	50.07	62.75	80.92	95.26	67.500
	E	0.00	8.00	8.57	16.87	20.94	10.876
<i>Rosmarinus officinalis</i>	M	27.98	45.72	70.84	75.29	92.45	62.456
	E	0.00	6.00	10.05	30.77	45.80	18.524
<i>Lamium album</i>	M	18.37	20.47	30.30	41.98	60.50	34.324
	E	0.00	6.00	6.00	25.00	50.02	17.404
<i>Cuminum cyminum</i>	M	13.78	17.13	38.66	48.00	48.69	33.252
	E	7.00	14.80	19.82	28.70	39.96	20.056
<i>Chamaemelum nobile</i>	M	19.45	23.55	38.00	81.70	95.14	51.568
	E	5.00	7.04	15.00	25.34	40.37	18.550
<i>Murraya koenigii</i>	M	26.06	42.65	60.07	75.42	83.60	57.560
	E	0.00	2.05	8.76	29.60	42.10	16.502
<i>Artemisia absinthium</i>	M	50.50*	62.39	84.45	98.40	95.77	78.302
	E	9.00	14.34	19.05	38.60	60.59	28.316
<i>Elettaria cardamom</i>	M	30.50	49.00	46.30	81.80	96.70	60.860
	E	0.79	6.02	13.50	19.61	29.60	13.904
Acide ascorbique		45.28	96.81	96.51	97.60	96.37	86.514

1.3. Activité cytotoxique des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts :

Les résultats de l'activité cytotoxique ont été très différents d'un extrait à un autre et d'une plante à une autre. En effet, comme pour le test antioxydant, nous avons remarqué que les extraits méthanoliques étaient plus actifs que les extraits éthanoliques, et ce pour les deux types de plantes (alimentaires et médicinales).

Les extraits méthanoliques de *Camellia sinensis*, *Cichorium intybus L.*, *Lippia citriodora*, *Punica granatum*, *Lavandula officinalis*, *Cuminum cyminum* et *Artemisia absinthium* ont donné de bonnes activités cytotoxiques avec des valeurs $CI_{50} < 100 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Mais, les meilleures activités restaient enregistrées pour les extraits méthanoliques de *Cichorium intybus L.* et *Cuminum cyminum* avec des valeurs CI_{50} de 15 et 25 $\mu\text{g} / \text{ml}$ respectivement (Tableau 9).

Vaccinium macrocarpon était la seule plante à avoir donné des extraits méthanoliques et éthanoliques non actifs, avec des $CI_{50} > 1000 \mu\text{g} / \text{ml}$.

1.4. Screening phytochimique des extraits méthanoliques et éthanoliques bruts :

La CCM réalisée sur les extraits méthanoliques et éthanoliques a permis la séparation de plusieurs spots. Les spectres UV-visible de ces derniers ont donné plusieurs aspects spécifiques de différentes substances organiques (Tableau 10). Exemples :

- Les flavonoïdes apparaissaient avec deux pics le premier aux environs de 230 et 280 nm et le deuxième aux environs de 300 et 385 nm (Figure 22).
- Les acides phénoliques apparaissaient avec un seul pic aux environs de 200 et 210 nm.
- Les anthocyanes apparaissaient avec deux pics le premier aux environs de 276 et 280 nm et le deuxième aux environs de 465 et 560 nm etc. (Bacon et al. 1976, Wagner et Bladt 1996, Marston et Hostettmann 2006).

Tableau 10 : Résultats de l'activité cytotoxique (exprimés en $\mu\text{g} / \text{ml}$) et du screening phytochimique.

M: extrait méthanolique ; E: extrait éthanolique ; (chiffre) : nombre de composés trouvés.

Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astérix.

Plante	Extrait	$CI_{50} \mu\text{g/ml}$	Screening phytochimique
<i>Camellia sinensis</i> (Fe)	M	70	Tannins (7), alcaloïdes (5), anthocyanes (2)
	E	>1000	Acides phénoliques (3), anthocyanes (2)
<i>Allium porrum L.</i> (B)	M	950	Terpénoïdes (3)
	E	>1000	Flavonoïdes (2)
<i>Allium cepa L.</i> (B)	M	700	Tannins (4), flavonoïdes (3), huiles essentielles (3)
	E	>1000	Flavonoïdes (3)
<i>Carthamus tinctorius</i> (Fe,Fl)	M	100	Flavonoïdes (7), isoflavonoïdes (3), substances colorantes (2)
	E	>1000	Flavonoïdes (10)
<i>Allium schoenoprasum L.</i> (Fe)	M	540	Terpénoïdes (4), flavonoïdes (3), stérols (2), acide phénolique (1)
	E	>1000	Flavonoïdes (2)

<i>Cleome schweinfurthii</i>	M	515	Flavonoïde (1), terpénoïde (1)
(Fe)	E	>1000	Flavonoïde (1)
<i>Vicia faba L.</i> (TG)	M	650	Tannins (5), anthocyanes (3)
	E	>1000	Acides phénoliques (2)
<i>Petroselinum sativum</i>	M	100	Terpénoïdes (2), huiles essentielles (2)
(Fe)	E	>1000	Flavonoïdes (3)
<i>Cichorium intybus L.</i>	M	15*	Huiles essentielles (3), stérol (1)
(Fe)	E	>1000	Acides phénoliques (4)
<i>Citrus paradisi</i> (Fe)	M	100	Huiles essentielles (4), flavonoïdes (2), tannins (2),
	E	>1000	Flavonoïdes (2)
<i>Apium graveolens L.</i>	M	625	Terpénoïdes (3), stéroïdes (3), isoflavonoïde (1)
(Fe)	E	>1000	Flavonoïdes (2)
<i>Lippia citriodora</i> (Fe)	M	30	Terpénoïdes (6), huiles essentielles (6), flavonoïdes (3), acides phénoliques (3)
	E	>1000	Acides phénoliques (9), flavonoïdes (5)
<i>Mentha longifolia</i> (Fe)	M	820	Flavonoïdes (6), huiles essentielles (6), terpénoïdes (3), stérols (3)
	E	>1000	Flavonoïdes (10)
<i>Vaccinium macrocarpon</i> (JF)	M	>1000	Tannins (4), anthocyanes (4)
	E	>1000	Anthocyanes (2)
<i>Punica granatum</i> (JF)	M	70	Tannins (4), anthocyanes (4)
	E	>1000	Acides phénoliques (6)
<i>Linum capitatum</i> (Fe)	M	>1000	Flavonoïdes (5), terpénoïdes (4), stéroïdes (3), huiles essentielles (3)
	E	>1000	Flavonoïdes (7)
<i>Tilia sylvestris</i> (Fe)	M	880	Huiles essentielles (2), terpénoïdes (2)
	E	950	Flavonoïdes (3)
<i>Crocus sativus</i> (Fl)	M	650	Substances colorantes (2), huiles essentielles (2)
	E	950	Flavonoïdes (4)
<i>Thymus vulgaris</i> (Fe)	M	900	Huiles essentielles (3), flavonoïde (1)
	E	>1000	Flavonoïdes (2)
<i>Lavandula officinalis</i>	M	50	Huiles essentielles (7)
(Fl)	E	950	Flavonoïdes (4)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	M	360	Anthocyanes (4)
(Fe)	E	800	Flavonoïdes (5), acides phénoliques (5)
<i>Lamium album</i> (Fe)	M	100	Terpénoïdes (4), huiles essentielles (4)

	E	950	Flavonoïdes (2)
<i>Cuminum cyminum</i>	M	25*	Huiles essentielles (5), stérols (2)
(Fe)	E	950	Acides phénoliques (4), flavonoïdes (3)
<i>Chamaemelum nobile</i>	M	600	Flavonoïdes (6), huiles essentielles (4), terpénoïdes (4), stérols (2)
(Fe,Fl)	E	750	Flavonoïdes (8)
<i>Murraya koenigii</i> (Fe)	M	760	Tannins (5), anthocyanes (3)
	E	>1000	Flavonoïdes (3)
<i>Artemisia absinthium</i>	M	60	Huiles essentielles (6)
(Fe)	E	800	Flavonoïdes (5)
<i>Elettaria cardamom</i>	M	550	Huiles essentielles (3), terpénoïdes (2)
(Fe)	E	950	Flavonoïdes (2)
Milieu sans extrait		>1000	-
Organozinc (1 mg/ml)		88	-
Quercétine (1 mg/ml)		-	Flavonoïde

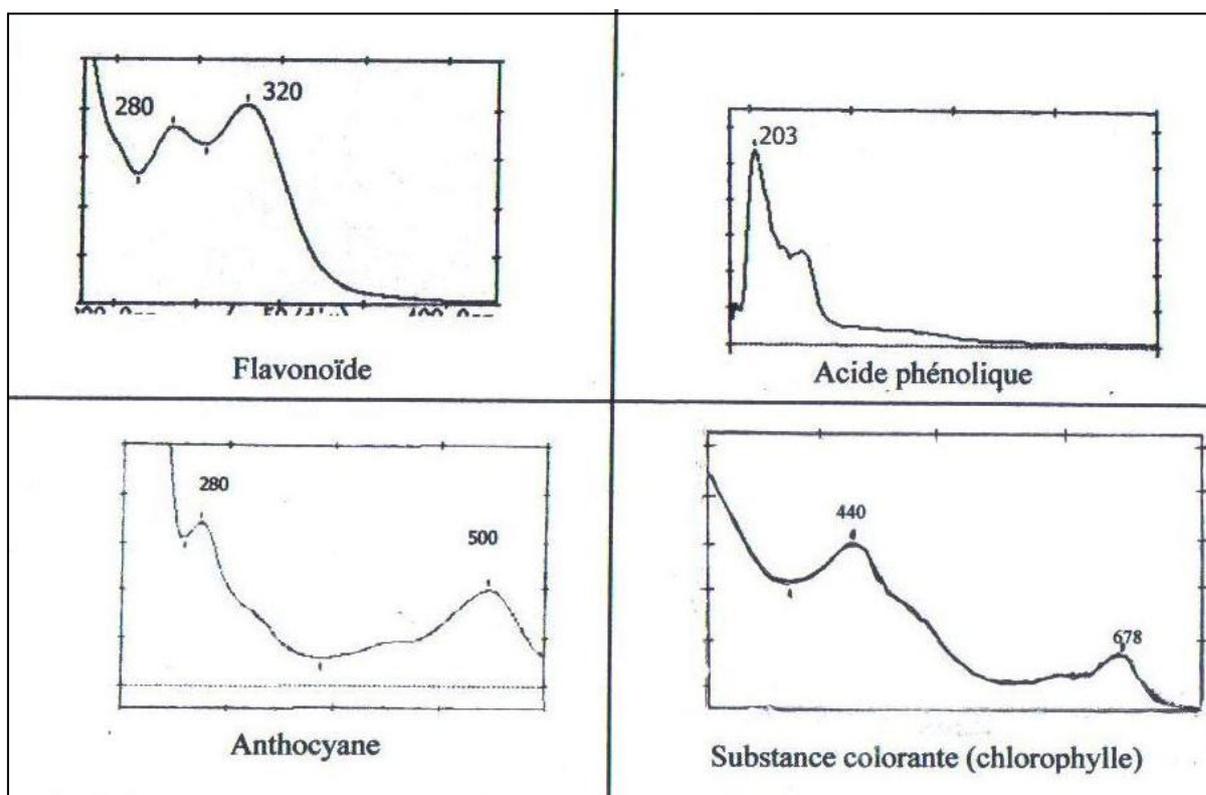


Figure 22 : Exemples que quelques spectres UV-visible réalisés pour les spots isolés.

Les extraits méthanoliques ont soutiré une plus grande diversité de composés, à savoir : des terpénoïdes, des stérols, des substances de coloration (chlorophylles, caroténoïdes), des huiles essentielles, des anthocyanes, des tannins, des alcaloïdes, des isoflavonoïdes et des acides phénoliques. Alors que les extraits éthanoliques n'ont soutiré que des flavonoïdes, des acides phénoliques et rarement des anthocyanes (Figure 32).

Parmi les plantes qui se sont avérées plus chargées en composés actifs, nous pouvions citer *Lippia citriodora*, *Apium graveolens* L., *Mentha longifolia*, *Linum capitatum* et *Chameamelum nobile*.

Le nombre et la diversité des composés révélés pourraient expliquer les différentes activités démontrées auparavant par les extraits bruts.

2. Quelques Intérêts Biologiques des Flavonoïdes :

2.1. Identification des types de flavonoïdes présents dans les extraits éthanoliques :

Les extraits éthanoliques ont été choisis car ils soutiraient plus de flavonoïdes.

La chromatographie sur couche mince et l'analyse spectrale ont montré que pour la majorité des espèces, les phases éther diéthylique contenaient principalement des acides phénols avec quelques rares flavonoïdes. Les phases acétate et H₂O, par contre, étaient riches en ces derniers.

L'identification des flavonoïdes a été réalisée pour les plantes ayant donné, après CCM, des spots flavoniques bien distincts et chargés (c'est-à-dire, de couleur intense indiquant une grande concentration).

Exemple : Pour *Mentha longifolia* cinq composés ont été isolés et caractérisés comme suit :

Composé 1 :

Spectre MeOH	Bande II (nm)	Bande I (nm)
	250	310
Fluorescence	Violette	
Solvant 4 / 3 / 3	Rf = 5,58	

Le spot avait une fluorescence violette sous UV, une migration moyenne (Rf) dans le solvant (4 / 3 / 3) et des pics à 250 et 310 nm indiquant une flavone.

L'hydrolyse acide de cette molécule a libéré le glucose. Il s'agissait donc d'une flavone-O-glucoside.

Composé 2 :

Spectre MeOH	Bande II (nm)	Bande I (nm)
	255	320
Fluorescence	Violette	
Solvant 13 / 3 / 3 / 1	Rf = 8,65	

Ce spot avait aussi une fluorescence violette sous UV, une grande migration dans le solvant (13 / 3 / 3 / 1) et des pics à 255 et 320 nm indiquant une flavone.

L'hydrolyse acide et la co-CCM des saccharides liés à ce composé ont libéré deux glucoses sous formes de deux spots collés. Il s'agissait donc d'une flavone-O-diglucoside.

Composé 3 :

Spectre MeOH	Bande II (nm)	Bande I (nm)
	275	330
Fluorescence	Violette	
Solvant 4 / 3 / 3	Rf = 9,04	

Le troisième composé était aussi une flavone. Il avait un Rf très important dans le système (4 / 3 / 3) suggérant qu'il pouvait s'agir d'un aglycone. La confirmation de cette information a été apportée par l'hydrolyse acide et l'hydrolyse alcaline qui n'ont libéré aucun hétéroside.

Le composé était donc une flavone aglycone.

Composé 4 :

Spectre MeOH	Bande II (nm)	Bande I (nm)
	256	355
Fluorescence	Brune	
Solvant 13 / 3 / 3 / 1	Rf = 6,22	

Le quatrième composé était un flavonol avec une fluorescence marron et des pics à 256 et 355 nm. Le Rf de ce flavonoïde était moyen dans le système (13 / 3 / 3 / 1).

L'hydrolyse acide a libéré le glucose. Il s'agissait donc d'une flavonol-O-glucoside.

Composé 5 :

Spectre MeOH	Bande II (nm)	Bande I (nm)
	266	349
Fluorescence	Brune	
Solvant 13 / 3 / 3 / 1	Rf = 4,33	

Ce composé avait des bandes à 266 et 349 nm, une fluorescence violette et un Rf moyen dans le système (13 / 3 / 3 / 1). C'était donc un flavonol. Le Rf moyen laissait supposer une monoglycosylation. Ceci a été vérifié par l'hydrolyse acide qui avait libéré un glucose. Il s'agissait donc d'une O-substitution et le composé était un flavonol-3-O-glucoside.

Selon le même principe, tous les flavonoïdes présents en quantité suffisante, permettant la réalisation de la série spectrale et les réactions d'hydrolyse, ont été identifiés et résumés dans les tableaux 11 et 12.

D'après nos résultats, il était évident que les plantes les plus riches en flavonoïdes étaient *Carthamus tinctorius*, *Linum catharticum*, *Chamaemelum nobile* et *Mentha longifolia*.

Aussi, nous avons remarqué que certains flavonoïdes étaient très répandus chez les plantes étudiées comme les flavones et les flavonols. En effet, ces molécules pouvaient être présentes sous différentes formes (aglycones ou avec substitutions), soit chacune dans une plante, soit plusieurs formes dans la même plante.

Tableau 11 : Liste des flavonoïdes identifiés chez *Carthamus tinctorius*, *Linum capitaum* et *Chamaemelum nobile*.

Plante	N° du composé	Système solvant	Fluorescence	Rf	Spectre méthanolique		Aglycone	Substitution	Résultats de l'identification
					Bande II (nm)	Bande I (nm)			
<i>Carthamus tinctorius</i>	6	4 / 3 / 3	Violette	8.34	250	310	Flavone	-	Flavone aglycone
	7	4 / 3 / 3	Violette	5.58	250	313	Flavone	O-glucose	Flavone -O-monoglucoside
	8	4 / 3 / 3	Jaune	4.32	256	355	Flavonol	-	Flavonol aglycone
	9	4 / 3 / 3	Jaune	4.10	255	352	Flavonol	O-glucose	Flavonol-O-monoglucoside
	10	13/3/3/1	Brune	6.22	257	362	Flavonol	O-glucose	Flavonol -O-monoglucoside
	11	4 / 3 / 3	Violette	4.98	269	330	Flavone	O-acide glucuronique	Flavone-O-glucuronide
	12	4 / 3 / 3	Violette	7.32	254	356	Flavanone	-	Flavonone aglycone
	13	13/3/3/1	Jaune	8.68	265	351	Flavonol	O-rhamnose O-glucose	Flavonol-O-diglycoside
<i>Linum capitaum</i>	14	4 / 3 / 3	Violette	3.87	252	315	Flavone	C-glucose	Flavone-C-glucoside
	15	4 / 3 / 3	Violette	8.34	250	310	Flavone	-	Flavone aglycone
	16	4 / 3 / 3	Jaune	8.93	265	350	Flavonol	-	Flavonol aglycone
	17	13/3/3/1	Brune	4.33	265	351	Flavonol	O-galactose	Flavonol-O-galactoside
	18	13/3/3/1	Brune	8.56	255	360	Flavonol	O-rhamnose O-glucose	Flavonol-O-diglycoside
	19	4 / 3 / 3	Violette	5.12	261	328	Isoflavone	O-glucose	Isoflavone-O-monoglucoside
<i>Chamaemelum nobile</i>	20	13/3/3/1	Jaune	8.90	266	353	Flavonol	O-rhamnose O-glucose	Flavonol-O-diglycoside
	21	13/3/3/1	Brune	7.94	266	355	Flavonol	O-glucose O-rhamnose	Flavonol-O-diglycoside
	22	4 / 3 / 3	Jaune	6.09	255	360	Flavonol	O-glucose	Flavonol-O-glucoside
	23	4 / 3 / 3	Violette	5.98	254	315	Flavone	O-glucose	Flavone-O-monoglucoside
	24	13/3/3/1	Brune	8.56	254	360	Flavonol	O-rhamnose O-glucose	Flavonol-O-diglycoside
	25	4 / 3 / 3	Violette	6.77	255	312	Flavone	O-glucose	Flavone-O-monoglucoside
	26	4 / 3 / 3	Brune	5.45	266	355	Flavonol	O-glucose	Flavonol-O-monoglycoside
	27	4 / 3 / 3	Brune	4.00	266	355	Flavonol	O-glucose	Flavonol-O-monoglucoside

Tableau 12 : Liste des flavonoïdes identifiés chez *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Crocus sativus*, *Elettaria cardamom* et *Cuminum cyminum*.

Plante	N° du Composé	Système solvant	Fluorescence	Rf	Spectre méthanolique		Aglycone	Substitution	Résultats de l'identification
					Bande II (nm)	Bande I (nm)			
<i>Rosmarinus officinalis</i>	28	4 / 3 / 3	Violette	7.23	253	312	Flavone	O-acide glucuronique	Flavone-O-glucuronide
	29	4 / 3 / 3	Violette	8.10	283	329	Flavanone	-	Flavonone aglycone
	30	13/3/3/1	Violette	8.23	280	315	Flavone	O-glucose O-rhamnose	Flavone-O-diglycoside
<i>Artemisia absinthium</i>	31	4 / 3 / 3	Jaune	8.00	250	365	Flavonol	-	Flavonol aglycone
	32	4 / 3 / 3	Jaune	7.32	256	355	Flavonol	-	Flavonol aglycone
	33	4 / 3 / 3	Jaune	8.93	265	350	Flavonol	-	Flavonol aglycone
<i>Crocus sativus</i>	34	13/3/3/1	Jaune	5.03	266	353	Flavonol	C-glucose	Flavonol-C-glucoside
	35	13/3/3/1	Brune	4.33	266	354	Flavonol	C-glucose	Flavonol-C-glucoside
<i>Elettaria cardamom</i>	36	4 / 3 / 3	Orange	5.34	279	498	Anthocyanidine	-	Anthocyanidine
<i>Cuminum cyminum</i>	37	4 / 3 / 3	Violette	4.45	275	330	Flavone	O-glucose	Flavone-O-monoglucoside
	38	4 / 3 / 3	Violette	5.58	250	315	Flavone	O-glucose	Flavone-O-monoglucoside

La quantité des flavonoïdes séparés des extraits éthanoliques des plantes différait d'une plante à une autre et d'une molécule à une autre. Les valeurs obtenues étaient (Tableau 13) :

Tableau 13 : Poids des flavonoïdes extraits pour 300g de chaque plante.

Plante (300 g)	N° du composé	Flavonoïde	Poids (g)
<i>Mentha longifolia</i>	1	Flavone-O-7-glucoside	50.2
	2	Flavone-O-diglucoside	59.4
	3	Flavone aglycone	75.0
	4	Flavonol-O-glucoside	42.0
	5	Flavonol-O-glucoside	21.3
<i>Carthamus tinctorius</i>	6	Flavone aglycone	32.7
	7	Flavone -O-monoglucoside	42.8
	8	Flavonol aglycone	29.6
	9	Flavonol-O-monoglucoside	17.3
	10	Flavonol -O-monoglucoside	23.8
	11	Flavone-O-glucuronide	11.4
	12	Flavonone aglycone	20.7
	13	Flavonol-O-diglucoside	40.1
<i>Linum capitaum</i>	14	Flavone-C-glucoside	23.7
	15	Flavone aglycone	40.7
	16	Flavonol aglycone	46.8
	17	Flavonol-O-galactoside	33.5
	18	Flavonol-O-diglycoside	23.5
	19	Isoflavone-O-monoglucoside	21.8
<i>Chamaemelum nobile</i>	20	Flavonol-O-diglycoside	39.1
	21	Flavonol-O-diglycoside	12.4
	22	Flavonol-O-glucoside	19.8
	23	Flavone-O-monoglucoside	17.0
	24	Flavonol-O-diglycoside	30.5
	25	Flavone-O-monoglucoside	21.7
	26	Flavonol-O-monoglycoside	23.5
	27	Flavonol-O-monoglucoside	13.7
<i>Rosmarinus officinalis</i>	28	Flavone-O-glucuronide	23.6
	29	Flavonone aglycone	26.4
	30	Flavone-O-diglycoside	43.5
<i>Artemisia absinthium</i>	31	Flavonol aglycone	19.4
	32	Flavonol aglycone	10.9
	33	Flavonol aglycone	32.3
<i>Crocus sativus</i>	34	Flavonol-C-glucoside	31.5
	35	Flavonol-C-glucoside	21.5
<i>Elettaria cardamom</i>	36	Anthocyanidine	20.7
<i>Cuminum cyminum</i>	37	Flavone-O-monoglucoside	32.1
	38	Flavone-O-monoglucoside	12.5

2.2. Activité antimicrobienne des flavonoïdes identifiés :

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont montré que la majorité des flavonoïdes avaient une activité plus ou moins importante selon le type du microorganisme. Parmi les flavonoïdes les plus actifs, nous avons les composés 3, 8 e 32 en premier lieu, puis les composés 6, 15, 16 et 33.

Le composé 3 a donné les plus grandes inhibitions des bactéries à Gram-positif, avec des CMI de 0.005 mg / ml contre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus*. Les molécules 8 et 32, quant à elles, étaient les plus actives contre les bactéries à Gram-négatif avec des CMI allant de 0.025 à 0.040 mg / ml. Les CMI de ces molécules enregistrées contre les bactéries à Gram-positif étaient aussi très intéressantes mais légèrement plus élevées que celles du composé 3 avec des valeurs allant de 0.010 mg / ml à 0.035 mg / ml (Tableaux 14 et 15).

La comparaison des CMI enregistrées pour les différentes formes de flavones (différentes substitutions) nous a montré que la les formes aglycones étaient plus actives que les formes monoglycosylées et que ces dernières étaient elles-mêmes plus actives que les biglycosylées. Ces mêmes observations ont été faites pour les flavonols : plus le nombre de substitutions augmentait et plus l'activité antimicrobienne du flavonoïde diminuait.

Mais, le type de substitution n'avait pas une grande influence sur cette activité. Exemple : la flavonol-O-glucoside et la flavonol-O-glycoside avaient des valeurs plutôt proches. Ce même constat a été fait pour les autres molécules ayant différentes substitutions mais présentes en même nombre.

Aussi, deux molécules similaires de par leur Rf, leur fluorescence et leur spectre méthanolique donnaient toujours les mêmes résultats même si elles provenaient de différentes origines. Exemple : les composés 4 et 10, les composés 7 et 38 ... etc.

Une autre observation était que, comme pour le test de l'activité antimicrobienne des extraits bruts, les bactéries les plus sensibles aux flavonoïdes étaient celles à Gram-positif, suivies des levures puis des bactéries à Gram-négatif.

Tableau 14 : Résultats de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits de *Mentha longifolia*, *Carthamus tinctorius* et *Linum capitaum* (en mg/ml).

Sc.a: *Staphylococcus aureus* ; *B.a*: *Bacillus anthracis* ; *B.s*: *Bacillus subtilis* ; *B.c*: *Bacillus cereus* ; *St.p*: *Streptococcus pneumoniae* ; *E.c*: *Escherichia coli* ; *P.a*: *Pseudomonas aeruginosa* ; *S.t*: *Salmonella typhi* ; *S.p*: *Salmonella paratyphi* ; *Y.p*: *Yersinia pestis* ; *K.p*: *Klebsiella pneumoniae*; *C.a*: *Candida albicans* ; *C.m*: *Candida maltosa* ; *C.n*: *Cryptococcus neoformans* ; - : pas d'inhibition. Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astérix.

Plante	N° du flavonoïde testé	<i>Sc.a</i>	<i>B.a</i>	<i>B.s</i>	<i>B.c</i>	<i>St.p</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>S.p</i>	<i>Y.p</i>	<i>K.p</i>	<i>C.a</i>	<i>C.m</i>	<i>C.n</i>
<i>Mentha longifolia</i>	1	0.040	0.030	0.020	0.025	0.030	0.040	0.065	-	-	0.055	0.055	0.055	-	0.055
	2	0.055	0.030	0.045	0.025	0.040	0.055	0.080	-	-	0.065	0.075	0.060	-	0.070
	3	0.005*	0.005*	0.010	0.005*	0.015	0.065	0.080	0.080	0.085	0.0120	0.050	0.045	0.120	0.060
	4	0.035	0.020	0.030	0.015	0.045	0.040	0.045	0.030	0.030	0.035	0.040	0.045	0.070	0.045
	5	0.060	0.035	0.040	0.050	0.065	0.075	0.100	0.085	0.085	0.0130	0.065	0.065	0.150	0.065
<i>Carthamus tinctorius</i>	6	0.040	0.025	0.025	0.035	0.030	0.040	0.060	0.125	0.140	0.055	0.050	0.050	-	0.040
	7	0.045	0.030	0.030	0.035	0.040	0.055	0.075	-	-	0.050	0.060	0.050	-	0.055
	8	0.030	0.015	0.020	0.010	0.035	0.030	0.040	0.025	0.025	0.030	0.030	0.040	0.070	0.040
	9	0.030	0.015	0.035	0.015	0.045	0.040	0.045	0.025	0.030	0.030	0.040	0.040	0.070	0.040
	10	0.035	0.020	0.030	0.015	0.045	0.040	0.045	0.030	0.030	0.035	0.040	0.045	0.070	0.045
	11	0.180	0.050	0.075	0.100	0.090	0.200	0.120	0.100	-	-	-	-	-	0.140
	12	0.070	0.055	0.065	0.070	0.070	0.085	0.100	0.090	0.65	0.075	0.120	-	-	-
	13	0.055	0.035	0.045	0.045	0.060	0.075	0.100	0.085	0.085	0.0130	0.065	0.065	0.145	0.070
<i>Linum capitaum</i>	14	0.035	0.025	0.035	0.025	0.030	0.040	0.070	-	-	0.050	0.060	0.055	-	0.060
	15	0.040	0.025	0.025	0.035	0.030	0.040	0.060	0.125	0.140	0.055	0.050	0.050	-	0.040
	16	0.050	0.030	0.035	0.045	0.060	0.070	0.090	0.075	0.070	0.0120	0.055	0.060	0.140	0.060
	17	0.060	0.035	0.040	0.050	0.065	0.075	0.100	0.085	0.085	0.0130	0.065	0.065	0.150	0.065
	18	0.030	0.020	0.035	0.020	0.045	0.040	0.045	0.035	0.025	0.030	0.035	0.040	0.070	0.045
	19	0.080	0.060	0.055	0.060	0.075	0.080	0.120	-	0.095	0.120	-	-	-	-
Ampicilline (10 µg / disque)		NT	0.020	0.010	NT	0.025	0.025	NT	0.015	0.010	-	-	-	-	-

Tableau 15 : Résultats de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes extraits de *Chamaemelum nobile*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Crocus sativus*, *Elettaria cardamom* et *Cuminum cyminum* (en mg / ml).

Sc.a: *Staphylococcus aureus* ; *B.a:* *Bacillus anthracis* ; *B.s:* *Bacillus subtilis* ; *B.c:* *Bacillus cereus* ; *St.p:* *Streptococcus pneumoniae* ; *E.c:* *Escherichia coli* ; *P.a:* *Pseudomonas aeruginosa* ; *S.t:* *Salmonella typhi* ; *S.p:* *Salmonella paratyphi* ; *Y.p:* *Yersinia pestis* ; *K.p:* *Klebsiella pneumoniae*; *C.a:* *Candida albicans* ; *C.m:* *Candida maltosa* ; *C.n:* *Cryptococcus neoformans* ; - : pas d'inhibition. Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astérix.

Plante	N° du flavonoïde testé	<i>Sc.a</i>	<i>B.a</i>	<i>B.s</i>	<i>B.c</i>	<i>St.p</i>	<i>E.c</i>	<i>P.a</i>	<i>S.t</i>	<i>S.p</i>	<i>Y.p</i>	<i>K.p</i>	<i>C.a</i>	<i>C.m</i>	<i>C.n</i>
<i>Chamaemelum nobile</i>	20	0.055	0.035	0.040	0.050	0.065	0.075	0.100	0.085	0.085	0.0130	0.065	0.060	0.150	0.070
	21	0.070	0.040	0.050	0.055	0.070	0.090	0.110	0.090	0.095	0.0140	0.075	0.070	0.155	0.070
	22	-	0.100	-	-	0.120	-	-	-	-	-	-	0.140	-	-
	23	0.050	0.030	0.040	0.030	0.045	0.050	0.080	-	-	0.060	0.070	0.060	-	0.060
	24	0.030	0.020	0.035	0.020	0.045	0.040	0.045	0.035	0.025	0.030	0.035	0.040	0.070	0.045
	25	0.040	0.025	0.020	0.025	0.035	0.040	0.070	-	-	0.050	0.060	0.050	-	0.055
	26	0.070	0.040	0.050	0.055	0.070	0.090	0.110	0.090	0.095	0.0140	0.075	0.070	0.155	0.070
	27	0.055	0.045	0.055	0.055	0.070	0.085	0.110	0.090	0.095	0.0135	0.075	0.070	0.160	0.075
<i>Rosmarinus officinalis</i>	28	0.040	0.025	0.020	0.025	0.035	0.040	0.070	-	-	0.050	0.060	0.050	-	0.055
	29	0.090	0.080	0.070	0.090	0.160	-	0.140	-	-	-	-	0.100	-	-
	30	0.060	0.045	0.055	0.040	0.060	0.060	0.100	-	-	0.100	-	0.095	0.100	0.095
<i>Artemisia absinthium</i>	31	-	0.055	0.080	-	0.060	0.100	-	0.180	0.160	-	-	-	-	-
	32	0.030	0.015	0.020	0.010	0.035	0.030	0.040	0.025	0.025	0.030	0.030	0.040	0.070	0.040
	33	0.050	0.030	0.035	0.045	0.060	0.070	0.090	0.075	0.070	0.0120	0.055	0.060	0.140	0.060
<i>Crocus sativus</i>	34	0.055	0.035	0.040	0.050	0.065	0.075	0.100	0.085	0.085	0.0130	0.065	0.060	0.150	0.070
	35	0.055	0.040	0.035	0.050	0.070	0.075	0.095	0.085	0.080	0.0140	0.060	0.060	0.150	0.070
<i>Elettaria cardamom</i>	36	0.070	0.060	0.080	0.075	0.120	-	0.100	-	-	-	-	0.140	-	0.120
<i>Cuminum cyminum</i>	37	0.005*	0.010	0.010	0.015	0.020	0.075	0.095	0.085	0.080	0.0140	0.060	0.060	0.150	0.070
	38	0.040	0.030	0.020	0.025	0.030	0.040	0.065	-	-	0.055	0.055	0.055	-	0.055
Ampicilline (10 µg / disque)		NT	0.020	0.010	NT	0.025	0.025	NT	0.015	0.010	-	-	-	-	-

2.3. Activité antioxydante des flavonoïdes identifiés :

Les résultats ont montré que toutes les flavonols et flavonols correspondants aux composés 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 18, 22, 23, 24, 25, 28, 30, 32 et 38 avaient enregistré de hautes valeurs pour l'activité antioxydante : supérieures à 46 % à 10 µg / ml (Tableaux 16 et 17). Le calcul statistique a signalé que ces molécules avaient les plus grandes moyennes d'activité avec des valeurs supérieures à 70 %. Aussi, il était intéressant de noter que tous les flavonoïdes testés avaient des valeurs supérieures à 21 % à 10 µg / ml. Les composés 8 et 32 ont donné la meilleure activité avec 55,28 % à 10 µg / ml et une moyenne de 75.804 %.

Le degré de substitution avait un effet sur l'activité antioxydante, car comme pour l'activité précédente, plus le nombre de substitutions était important, plus l'activité s'abaissait. Mais, le type de substitution n'avait pas une grande influence. En effet, la moyenne calculée pour les formes aglycones était plus élevée que celle des autres formes rencontrées. Par contre, celle des molécules monoglycosylées étaient plus faibles mais restait néanmoins plus grande que la moyennes calculée pour les composé di et triglycosylés. Ces derniers avaient effectivement les valeurs encore plus basses.

Aussi, nous avons remarqué que les composés 1 et 38 provenant de *Mentha longifolia* et de *Cuminum cyminum* respectivement ont donné les mêmes valeurs pour cette activité; de plus ils ont donné le même spectre méthanolique, le même Rf et la même fluorescence sur le solvant utilisé. Il pouvait donc s'agir de la même molécule. Néanmoins des études phytochimiques demeuraient nécessaires afin d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Ce même constat a été fait pour les composés 2 et 23.

2.4. Activité cytotoxique des flavonoïdes identifiés :

Parmi les flavonoïdes testés pour l'activité cytotoxique contre les cellules FL, seuls les composés 11, 12, 21, 22 et 26 avaient de faibles activités, avec des valeurs de CI₅₀ supérieures à 100 µg / ml. Les autres flavonoïdes ont donné des valeurs intéressantes inférieures à 90 µg / ml (Tableaux 16 et 17). Les composés 8 et 32 étaient considérés comme étant les molécules les plus actives, avec des valeurs de CI₅₀ similaires (15 µg / ml). Suivie des composés 4, 10, 18, 22 et 24 qui ont donné des valeurs CI₅₀ de 25 µg / ml, plus importantes que celles enregistrées pour le témoin (l'organozinc). Aussi, il était observé d'après ces résultats que l'activité cytotoxique dépendait encore du degré mais pas de la nature des substitutions.

Tableau 16 : Résultats de l'activité antioxydante et de l'activité cytotoxique des flavonoïdes identifiés chez *Mentha longifolia*, *Carthamus tinctorius* et *Linum capitaum*.

RAS (%) : Radical Scavenging Activity : activité radicale scavenging exprimée en pourcentage.

Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astérix.

Origine et numéro du flavonoïde testé		RSA (%)					Moyenne du RSA (%)	CI ₅₀ µg/ml
		10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml		
<i>Mentha longifolia</i>	1	49.09*	59.86	69.80	88.96	98.00	73.142*	45
	2	46.02*	57.98	67.34	87.83	96.69	71.172*	50
	3	39.78	49.99	72.54	76.90	85.89	65.020	55
	4	53.30*	60.76	73.24	80.59	95.03	72.584*	25*
	5	22.60	40.55	55.12	67.98	86.47	54.544	90
<i>Carthamus tinctorius</i>	6	52.60*	60.84	72.50	92.67	98.90	75.502*	40
	7	49.05*	59.86	69.72	89.97	96.67	73.054*	45
	8	55.28*	63.78	76.90	83.98	99.08	75.804*	15*
	9	53.00*	62.28	74.37	80.72	95.97	73.268*	25*
	10	53.30*	60.76	73.24	80.59	95.03	72.584*	25*
	11	19.02	30.90	42.48	50.82	59.93	40.630	980
	12	21.02	35.00	50.37	57.49	63.90	45.556	900
	13	22.56	40.49	55.13	67.99	86.59	54.552	90
<i>Linum capitaum</i>	14	49.02	59.84	69.75	89.90	96.82	73.066*	45
	15	52.60*	60.84	72.50	92.67	98.90	75.502*	40
	16	30.00	47.60	62.76	79.67	92.54	62.514	70
	17	22.59	40.57	55.09	67.98	86.47	54.540	90
	18	53.32*	62.98	74.85	80.29	95.09	73.306*	25*
	19	24.70	38.98	50.87	68.70	79.80	52.610	80
Acide ascorbique		45.28	96.81	96.51	97.60	96.37	86.514	-
Milieu sans extrait							-	>1000
Organozinc (1 mg / ml)							-	88

Tableau 17 : Résultats de l'activité antioxydante et de l'activité cytotoxique des flavonoïdes identifiés chez *Chamaemelum nobile*, *Rosmarinus officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Crocus sativus*, *Elettaria cardamom* et *Cuminum cyminum*.

RAS (%): Radical Scavenging Activity : activité radicale scavenging exprimée en pourcentage.
Les valeurs les plus intéressantes sont marquées par un astérix.

Origine et numéro du flavonoïde testé		RSA (%)					Moyenne du RSA (%)	CI ₅₀ µg/ml
		10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml		
<i>Chamaemelum nobile</i>	20	23.50	34.60	50.60	70.67	84.99	52.872	90
	21	21.65	32.49	48.20	68.93	82.83	50.820	200
	22	35.40	57.56	59.28	63.49	77.02	58.550	500
	23	46.02*	57.98	67.34	87.83	96.69	71.172*	50
	24	53.32*	62.98	74.85	80.29	95.09	73.306*	25*
	25	49.00*	59.87	69.70	89.99	96.77	73.066*	45
	26	21.50	32.60	48.04	68.30	82.99	50.686	190
<i>Rosmarinus officinalis</i>	27	21.39	32.01	48.49	68.83	82.59	50.662	195
	28	49.16*	59.50	69.80	88.90	98.13	73.098*	45
	29	21.02	35.00	50.37	57.49	63.90	45.556	70
<i>Artemisia absinthium</i>	30	50.35*	63.50	70.88	79.00	94.90	71.726*	75
	31	35.70	57.20	59.09	63.48	77.89	58.672	90
	32	55.28*	63.78	76.90	83.98	99.08	75.804*	15*
<i>Crocus sativus</i>	33	30.00	47.60	62.76	79.67	92.54	62.514	70
	34	22.63	42.90	57.00	66.88	85.90	55.062	85
<i>Elettaria cardamom</i>	35	22.59	40.57	55.09	67.98	86.47	54.540	90
	36	24.70	38.98	50.87	68.70	79.80	52.610	85
<i>Cuminum cyminum</i>	37	39.87	45.80	60.89	69.87	79.80	59.246	65
	38	49.09*	59.86	69.80	88.96	98.00	73.142*	45
Acide ascorbique		45.28	96.81	96.51	97.60	96.37	86.514	-
Milieu sans extrait							-	>1000
Organozinc (1 mg / ml)							-	88

2.5. Activité antibactérienne *in vivo* contre *Streptococcus pneumoniae* :

Chez le lot non traité, *Streptococcus pneumoniae* a causé 100 % de mortalité après 72 à 96 H d'infection. Le dénombrement des bactéries présentes dans les poumons de ces animaux a révélé la présence d'environ $5.1 \times 10^7 \pm 0.23$ UFC / poumon.

Les flavonoïdes testés avaient tous les deux montré une activité contre la croissance de *Streptococcus pneumoniae*. En effet, les activités antibactériennes *in vivo* des composés 3, 8 et 32 étaient toutes deux supérieures à celle de l'amoxicilline. Aux différentes doses croissantes testées, nos flavonoïdes ont donné des diminutions plus importantes du nombre de germes présent dans les poumons des rats. La DE₅₀ du composé 3 était la plus intéressante avec une valeur de 11.601 mg / ml (Tableau 18). Les composés 8 et 32, quant à eux, ont donné une valeur très proche de celle du témoin avec 14.141 mg / ml.

L'élimination totale des bactéries a eu lieu sous l'effet de le composé 3 avec une dose de 50 mg / ml administrée en trois prises pendant trois jours (Figure 23). Cette molécule s'est avérée de ce fait extrêmement efficace.

Tableau 18 : Diminution du nombre de *Streptococcus pneumoniae* en fonction des doses de traitement administré.

Témoins = $5.1 \times 10^7 \pm 0.23$ UFC / poumon

Dose mg/ml	UFC / poumon							DE ₅₀ mg/ml (limite de confiance 95 %)
	10	20	30	40	50	60	70	
Log dose	1.000	1.301	1.477	1.602	1.699	1.778	1.845	
Composé 3	30000000 ± 1.19	3887000 ± 1.00	6530 ± 0.50	50 ± 1.42	0	0	0	11.601 (1.20 – 1.50)
Composé 8	47000000 ± 1.21	5600000 ± 2.11	30000 ± 1.32	7980 ± 1.10	340 ± 0.32	87 ± 1.22	15 ± 0.24	13.458 (1.00 – 1.50)
Composé 32	47000000 ± 1.21	5600000 ± 2.11	30000 ± 1.32	7980 ± 1.10	340 ± 0.32	87 ± 1.22	15 ± 0.24	13.458 (1.00 – 1.50)
Amoxicilline	45600000 ± 0.56	9800000 ± 0.76	45600 ± 1.53	29000 ± 0.87	1300 ± 0.35	700 ± 0.65	57 ± 0.75	14.141 (0.60 – 0.90)

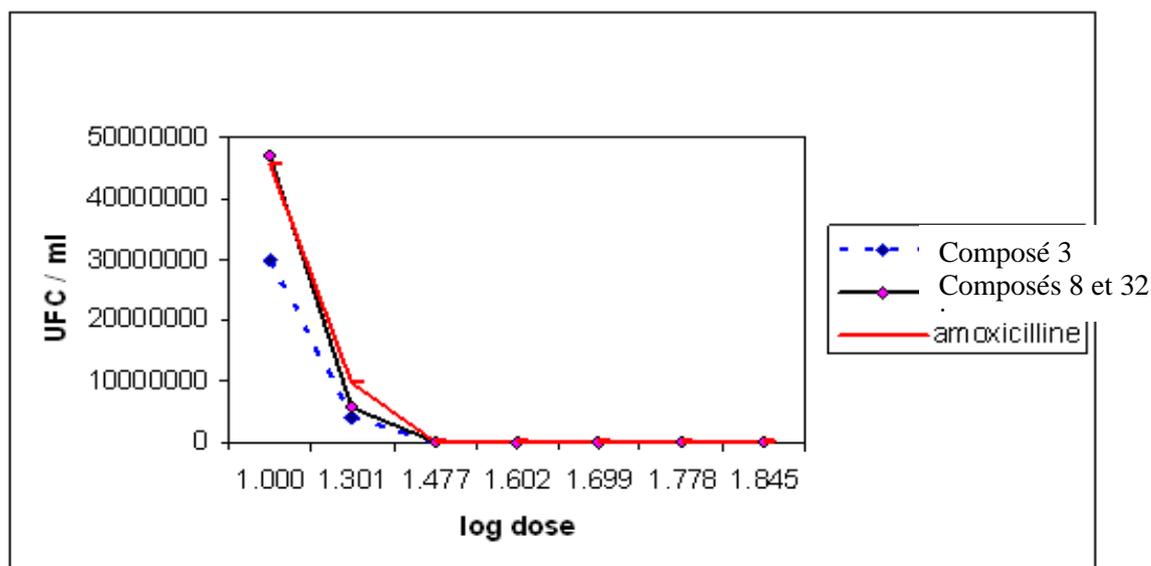


Figure 23 : Courbe de diminution du nombre de *Streptococcus pneumoniae* sous l'effet des différents traitements.

2.6. Mesure de la toxicité aiguë des flavonoïdes les plus actifs :

La toxicité aiguë a été mesurée pour les flavonoïdes ayant montré au moins une bonne activité lors des tests précédents. C'est-à-dire, qu'elle a été réalisée pour les molécules citées dans le tableau 19. D'après les résultats obtenus, la majorité des flavones et flavonols testés a donné les mêmes valeurs quelles qu'étaient leur substitutions. En effet, le degré (le nombre) et le type (emplacement et nature) de substitution ne semblaient pas influencer les valeurs de toxicité obtenues (Tableau 19).

Les composés 4, 8, 9, 18 et 32 ont donné les valeurs les plus intéressantes avec des DL_0 de 4000 mg / Kg et des DL_{50} de 6258.92 mg / Kg (Figure 24). En effet, l'administration de doses inférieures à 4000 mg / Kg n'a montré aucun signe de toxicité. Mais au delà de cette dose, il y a eu l'apparition de quelques troubles, notamment des spasmes musculaires, une extension tonique et une salivation importante. Les premiers cas de mort pour ces molécules étaient apparus après l'administration de 5000 mg / Kg des flavonoïdes.

Les composés 1, 2, 3, 6, 7, 14, 15, 25, 28 et 37, qui étaient tous des flavones, ont donné des valeurs similaires mais inférieures à celles des composés cités auparavant, avec des DL_0 de 3000 mg / Kg et des DL_{50} de 5035.00 mg / Kg. Par contre, les flavonols représentant les composés 5, 13, 16, 17, 20, 21, 26, 27, 33, 34 et 35 ont donné les valeurs les moins bonnes avec des DL_0 de 2000 mg / Kg et des DL_{50} de 4466.83 mg / Kg. Ces composés s'étaient donc avérés comme étant les plus toxiques.

Tableau 19 : Résultats de la toxicité aigue exprimés en pourcentage de mortalité.

Doses ($\mu\text{g} / \text{Kg}$)	1000	2000	3000	4000	5000	6000	7000	8000	9000	DL₅₀	DL₀
log des doses	3.000	3.301	3.477	3.602	3.698	3.778	3.845	3.903	3.954		
Composé 1	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 2	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 3	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 4	0	0	0	0	20	40	60	80	100	6258.92	4000
Composé 5	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 6	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 7	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 8	0	0	0	0	20	40	60	80	100	6258.92	4000
Composé 9	0	0	0	0	20	40	60	80	100	6258.92	4000
Composé 13	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 14	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 15	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 16	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 17	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 18	0	0	0	0	20	40	60	80	100	6258.92	4000
Composé 20	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 21	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 25	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 26	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 27	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 28	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000
Composé 30	0	0	20	40	40	80	100	100	100	5272.29	2000
Composé 32	0	0	0	0	20	40	60	80	100	6258.92	4000
Composé 33	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 34	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 35	0	0	20	40	60	80	100	100	100	4466.83	2000
Composé 37	0	0	0	20	40	60	80	100	100	5035.00	3000

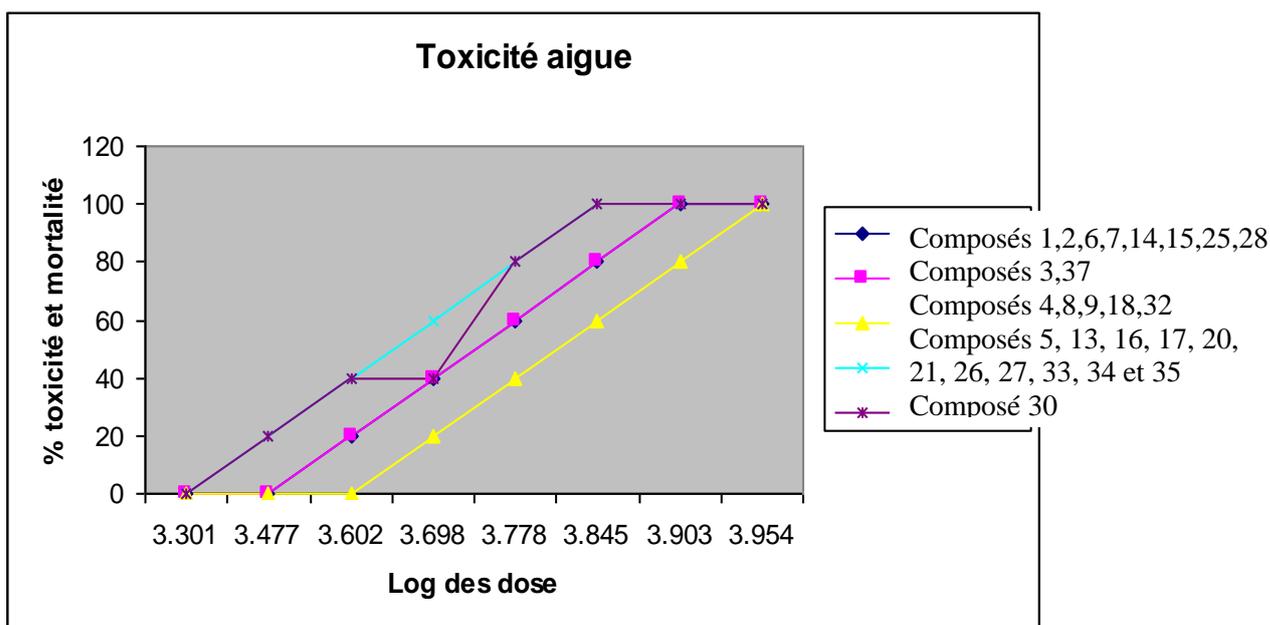


Figure 24 : Courbes représentant les résultats de la toxicité aigue.

3. *Biodegradation Des Tannins Condensés :*

Après l'extraction des tannins et leur séparation, l'analyse spectrale UV-visible réalisée pour chaque phase a donné des spectres caractéristiques des tannins condensés avec un seul pic d'absorption aux environs de 280 nm (Marston et Hostettmann 2006). La catéchine industrielle utilisée comme témoin avait aussi un spectre à un seul pic d'absorption à 280 nm. Ces résultats ont confirmé que les cinq phases des deux plantes contenaient effectivement des monomères, dimères, oligomères et polymères de catéchine.

3.1. Dosage et identification des tannins condensés :

Le dosage par la méthode n-Butanol / HCl a permis de classer les phases selon leurs absorbance, et donc selon leur concentration, comme suit :

Pour *Vicia faba L. seville* : MEC (abs : 64,560) > H₂O (abs : 18,066) > n-butanol (abs : 10,481) > acétate d'éthyle (abs : 5,792) > éther diéthylique (abs : 0,901) (Figure 25).

Pour *Camellia sinensis* : n-Butanol (abs : 149,700) > MEC (abs : 69,998) > acétate d'éthyle (abs : 15,002) > éther diéthylique (abs : 9,000) > H₂O (abs : 5,300) (Figure 26).

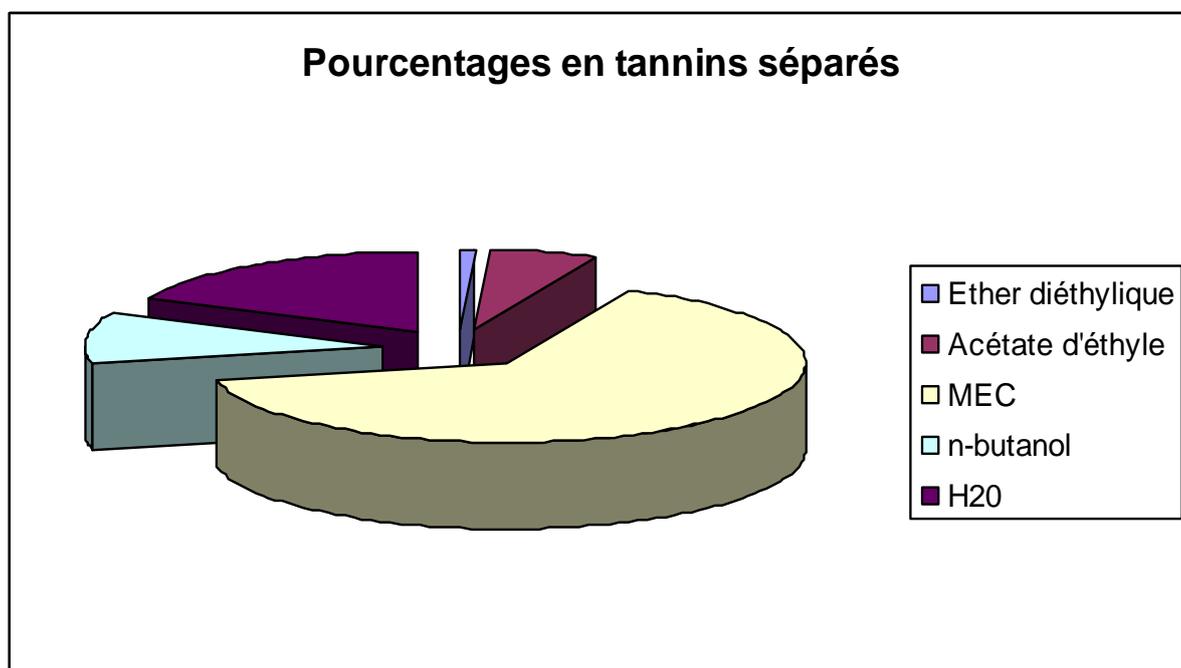


Figure 25 : Pourcentages des tannins séparés de *Vicia faba L. seville*.

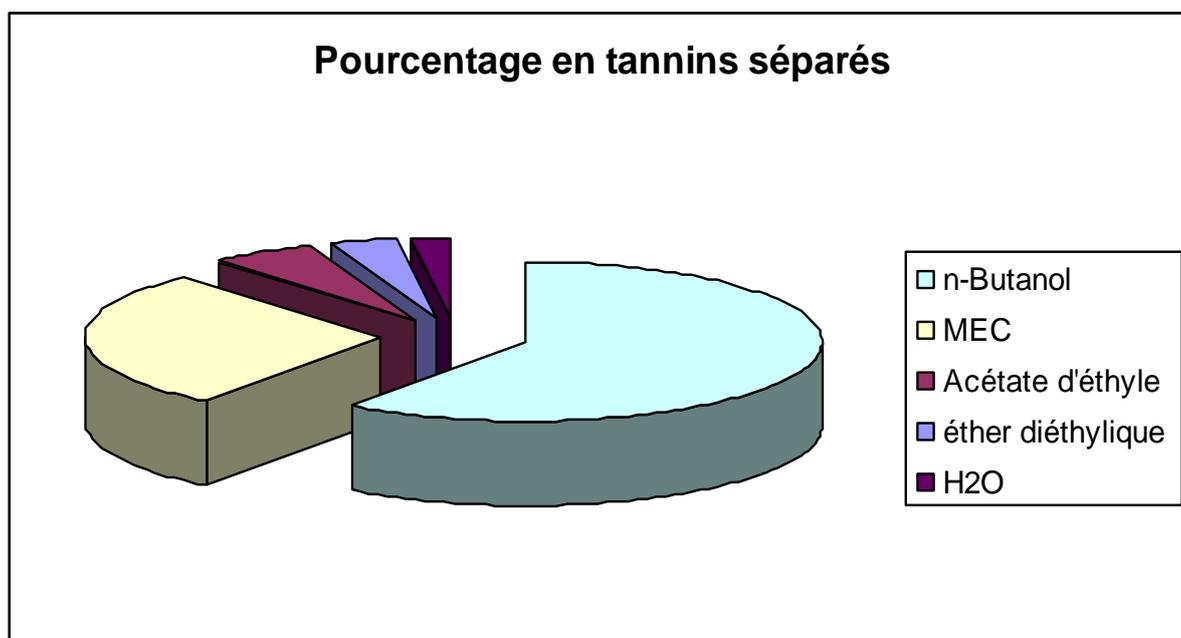


Figure 26 : Pourcentages des tannins séparés de *Camellia sinensis*.

L'analyse spectrale UV-visible réalisée pour les cinq phases de chaque plante après le dosage a donné pour chacune un spectre à deux pics (274 nm et 546 nm) caractéristiques des anthocyanes et plus exactement des cyanidines (Marston et Hostettmann 2006). Les tannins extraits des téguments de graines de *Vicia faba L seville* étaient donc pour la majorité des procyanidines trimériques et oligomériques extraits avec le MEC. Les tannins soutirés des feuilles de *Camellia sinensis* étaient, quant à eux, pour la majorité des procyanidines polymériques extrait avec le n-butanol.

3.2. Recherche et isolement des moisissures capables de dégrader les tannins condensés :

À partir du sol entourant les cultures des fèves, dix neuf moisissures ont été isolées et identifiées. Neuf d'entre elles appartenaient au genre *Aspergillus* et ont été identifiées comme étant *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus oryzae* (Tableau 20). Cinq autres appartenaient au genre *Penicillium* : *Penicillium rubrum*, *Penicillium variable*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium verrucosum* et *Penicillium citrinum* (Tableau 21). Trois espèces appartenant au genre *Fusarium* ont été identifiées comme étant *Fusarium solani*, *Fusarium dimerum* et *Fusarium oxysporum*. Les deux dernières moisissures étaient *Geotrichum candidum* et *Trichoderma viride* (Tableau 22).

Et autour des plantations du thé, vingt trois moisissures ont été isolées et identifiées. Huit d'entre elles étaient des *Aspergillus* : *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus puniceus* et *Aspergillus awamori* (Tableau 23). Neuf autres étaient des *Penicillium* : *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium variable*, *Penicillium pinophilum*, *Penicillium marneffeii*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium bilaiae* et *Penicillium funiculosum* (Tableau 24). Trois autres espèces étaient identifiées comme étant des *Fusarium* : *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium acuminatum* et *Fusarium proliferatum*. Et les dernières espèces étaient *Geotrichum clavatum*, *Geotrichum capitatum* et *Trichoderma harzianum* (Tableau 25).

Tableau 20 : Principales caractéristiques permettant l'identification des *Aspergillus* isolés autour de *Vicia faba L. seville*.

my : mycélium, cn : conidiophore, ch : chlamydospore, p : phialide, th : thalle, c: conidie, ta: tête aspergillaire, cl : columelle, sc : sclérote, crois. : croissance.

Espèce identifiée	Caractéristiques du genre		Caractéristiques de l'espèce		
	Observation microscopique	Le nom du genre	Observation microscopique	Observation macroscopique	
				Recto.	Verso.
<i>A. niger</i>	Sporocyste surmonté de c en chaînettes : Tête aspergillaire (ta). My septé. Absence de reproduction sexuée.	<i>Aspergillus</i>	Ta bisériées, radiées, brunes ; cl globuleuses, brunes ; cn lisses, bruns, dressés, grands ; c globuleuses, brunes, très échinulées (Schéma 1, photo 3).	Th blanc avec des flocons noirs.	Revers incolore.
<i>A. ochraceus</i>			Ta bisériées, jaunes, globuleuses puis se séparant en 3 colonnes ; cn rugueux, jaunes ; cl globuleuses, hyalines ; c globuleuses ou cylindriques, grandes.	Th jaune ; léger pigment doré ; sc roses.	Revers jaune.
<i>A. fumigatus</i>			Ta unisériées, en colonnes compactes, bleu-vert ; cn courts, lisses, verts ; cl sub-hémisphériques, vertes, fertiles dans leur moitié supérieure ; p dressées, densément groupées, vertes ; c globuleuses échinulées.	Th blanc puis vert-gris puis vert foncé. Crois. rapide à 37°C	Revers jaune.
<i>A. glaucus</i>			Ta unisériées, radiées, sub-globuleuses ; cn lisses, incolores ; cl arrondies ; c globuleuses, finement rugueuses.	Th poudreux, vert avec des tâches jaune vif.	Revers jaune orangé.
<i>A. nidulans</i>			Ta petites, bisériées, colonniformes, vert-jaunes ; cn sinueux, courts, bruns, lisses ; cl hémisphériques, globuleuses ; c globuleuses, échinulées, vertes.	Th poudreux, vert cresson puis brun, crois. rapide, centre blanc, floconneux.	Revers orangé vert au centre, devenant brun-rouge en vieillissant.
<i>A. ustus</i>			Ta bisériées, radiées, sub-cylindriques, scindées en plusieurs colonnes ; cn longs, sinueux, septés, lisses ; cl sub-globuleuses ; c verruqueuses ou échinulées.	Th cotonneux, brun.	Revers incolore
<i>A. amstelodami</i>			Ta larges, radiées, en colonnes non bien distinctes ; phialides courtes ; c sub-globuleuses, rugueuses.	Crois. lente ; jaune-citron.	Revers jaunâtre.
<i>A. flavus</i>			Ta unisériée, radiées puis se scindant en plusieurs colonnes ; cn hyalins, verruqueux, longs ; cl sub-globuleuses ; c globuleuses, verdâtres, verruqueuses ; sc globuleux, blancs puis brun-rouges.	Th duveteux, b blanc puis jaune à jaune-vert ; sc nombreux.	Revers brun-rouge.
<i>A. oryzae</i>			Cn petits ; ta bisériées ; cl relativement petites, allongées, m sur les trois quarts supérieurs de la cl ; c globuleuses, lisses.	Th floconneux, vert-citron, très aériens.	Revers vert- olive.

Tableau 21 : Principales caractéristiques permettant l'identification des *Penicillium* isolés autour de *Vicia faba L. seville*.

my : mycélium, cn : conidiophore, ch : chlamydo-spore, m: métule, p : phialide, th : thalle, c: conidie, pn : pénicille, crois. : croissance.

Espèce identifiée	Caractéristiques du genre		Caractéristiques de l'espèce		
	Observation microscopique	Le nom du genre	Observation microscopique	Observation macroscopique	
				Recto.	Verso.
<i>P. rubrum</i>	Présence de pn avec des c en chaînettes sortant des p, my septé, absence de reproduction sexuée	<i>Penicillium</i>	Pn biverticillés, symétriques, compacts, étroits ; m : 6 à 8 /pn ; p : 5 à 7 /m ; c elliptiques, granuleuses.	Th velouté, jaune, forte conidiogénèse.	Revers incolore.
<i>P. variable</i>			Pn biverticillés, symétriques ; cn lisses ; m de 4 à 7 / pn ; p lancéolées, 5 à 7 /pn ; c elliptiques à fusiformes, lisses (Schéma 3, photo 5).	Th velouté, centre floconneux ; crois. lente, vert-gris.	Revers jaune.
<i>P. glabrum</i>			Pn monoverticillés ; cn lisses, renflés au sommet ; p ampulliformes, 10 à 16 /pn ; c globuleuses, lisses, en longues chaînettes compactes.	Crois. rapide ; th velouté, vert sombre ; sillons radiaux.	Revers pâle.
<i>P. verrucosum</i>			Pn compactes, triverticillés, asymétriques ; cn fasciculés, finement granuleux ; p ampulliformes, 5 à 8 /pn ; c globuleuses, échinulées.	Crois. rapide ; th velouté, vert, bordé de blanc ; centre blanc surélevé ; odeur forte de moisi.	Revers jaune.
<i>P. citrinum</i>			Pn biverticillés, asymétriques ; cn lisses ; m divergentes, en 3 à 10 /pn ; p compactes, ampulliformes, 8 à 12 /pn ; c globuleuses, lisses, en chaînettes divergentes.	Crois. lente ; th velouté, vert-gris ; exsudat orange abondant.	Revers jaune-orange.

Tableau 22 : Principales caractéristiques permettant l'identification des autres moisissures isolées autour de *Vicia faba L. seville*.

my : mycélium, cn : conidiophore, ch : chlamydo-spore, p : phialide, th : thalle, c: conidie, cl : columelle, crois. : croissance.

Espèce identifiée	Caractéristiques du genre		Caractéristiques de l'espèce		
	Observation microscopique	Le nom du genre	Observation microscopique	Observation macroscopique	
				Recto.	Verso.
<i>F. solani</i>	C fusiformes ; my septé ; absence de reproduction sexuée.	<i>Fusarium</i>	Microphialides très allongées et cylindriques ; microconidies unicellulaires ou uniseptées ; macroconidies cylindriques, courbes, à cellule apicale courte et obtuse ; présence des ch (schéma 4, photo 6).	Th floconneux, blanc.	Revers saumon.
<i>F. dimerum</i>			Cn courts, linéaires ou ramifiés, monophialidés ; macroconidies petites, avec de 0 à 3 cloisons, contondantes ; microconidies et ch. absentes.	Crois. lente ; th aérien, saumon ; exsudat très important.	Revers saumon clair.
<i>F. oxysporum</i>			Microphialides courtes, ellipsoïdales ; microconidies ovoïdes, abondantes ; macroconidies fusoïdes, pointues ; cl sub-globuleuses intercalaires ou terminales.	Th blanc ; crois. modérée.	Couleur pourpre
<i>G. candidum</i>	My lisse ; arthrospores formées par désarticulation du th et donnant un aspect lévuriforme caractéristique.	<i>Geotrichum</i>	My mince, lisse ; arthrospores cylindriques arrondies aux extrémités.	Th blanc ; crois. rapide, velouté ; odeur douçâtre	Revers blanc cassé.
<i>T. viride</i>	My siphonné ; cn très ramifiés ; p elliptiques, atténuées au sommet, perpendiculaires à l'axe ; reproduction sexuée présente.	<i>Trichoderma</i>	Aspect pyramidal des parties reproductives : cn à ramifications de plus en plus courtes vers l'apex ; p en forme de quille ; c et ch granuleuses.	Th blanc puis vert.	Revers incolore.

Tableau 23 : Principales caractéristiques permettant l'identification des *Aspergillus* isolés autour de *Camellia sinensis*.

my : mycélium, cn : conidiophore, ch : chlamydo-spore, m: métule, p : phialide, th : thalle, c: conidie, ta: tête aspergillaire, cl : columelle, sc : sclérote, crois. : croissance.

Espèce identifiée	Caractéristiques du genre		Caractéristiques de l'espèce		
	Observation microscopique	Le nom du genre	Observation microscopique	Observation macroscopique	
				Recto.	Verso.
<i>A. foetidus</i>	Même caractéristiques déjà citées (Tableau 18).	<i>Aspergillus</i>	Ta bisériées, globuleuses, radiées ; cn lisses, hyalins et bruns en haut ; cl un peu allongées ; m et p brunâtres ; c globuleuses, finement verruqueuses.	Crois. lente ; th brun.	Revers orange, puis brun.
<i>A. versicolor</i>			Ta bisériées, radiées, sub-cylindriques ; cn hyalins, lisses ; cl sub-globuleuses ; c globuleuses, échinulées.	Crois. lente ; th vert bordé de blanc ; sc absents.	Revers verdâtre.
<i>A. aculeatus</i>			Ta unisériées ; cl petites ; c globuleuses, échinulées.	Th vert-brun, poudreux ; sc roses.	Revers pâle.
<i>A. terreus</i>			Ta bisériées, très longues, cylindriques, compactes ; cn lisses, hyalins ; cl hémisphériques ; m sur la moitié supérieure seulement ; p densément groupées ; c globuleuses, lisses.	Th velouté, brun ; exsudat ambré.	Revers jaune à brun.
<i>A. parasiticus</i>			Ta unisériées, radiées ; c globuleuses, très verruqueuses et échinulées.	Th vert foncé, floconneux ; forte conidiogénèse ; sc peu.	Revers jaunâtre.
<i>A. tamaritii</i>			Ta bisériées, radiées ; cn hyalins, verruqueux ; cl cylindriques puis devenant globuleuses ; ornementées de tubercules bruns.	Crois. rapide ; th brun-vert, puis marron foncé, sc bruns.	Revers incolore
<i>A. puniceus</i>			Ta bisériées, radiées, cl sub-globuleuses, scindées en courtes colonnes, vertes ; cn longs, sinueux, septés ; c verruqueuses, sub-globuleuses.	Th marron-olive, floconneux, conidiogénèse modérée, crois. relativement lente, exsudat rougeâtre.	Revers pâle.
<i>A. awamori</i>			Ta bisériées, radiées, brunes ; cn lisses, fragiles ; cl globuleuses, entièrement fertiles ; c globuleuses, ornementées.	Conidiogénèse très abondante donnant un th floconneux, brun.	Revers brun-rouge.

Tableau 24 : Principales caractéristiques permettant l'identification des *Penicillium* isolés autour de *Camellia sinensis*.

my : mycélium, cn : conidiophore, ch : chlamyospore, m: métule, p : phialide, th : thalle, c: conidie, crois. : croissance.

Espèce identifiée	Caractéristiques du genre		Caractéristiques de l'espèce		
	Observation microscopique	Le nom du genre	Observation microscopique	Observation macroscopique	
				Recto.	Verso.
<i>P. griseofulvum</i>	Même caractéristiques déjà citées (Tableau 19).	<i>Penicillium</i>	Pn asymétriques avec 3 à 5 ramifications divergentes ; cn sinueux, lisses ; 2 à 3 m /pn ; p courtes, 6 à 9 /m ; c elliptiques à sub-globuleuses, lisses, en chaînettes divergentes.	Crois. très lente ; th granuleux, vert grisâtre, exsudat jaune pâle.	Revers pâle.
<i>P. rugulosum</i>			Pn biverticillés, symétriques ; cn lisses ; m densément groupées ; p lancéolées ; c elliptiques, très granuleuses.	Crois. lente ; th floconneux, blanc ; forte conidiogénèse, vert-foncée ; pigment rose.	Revers brun-rouge.
<i>P. chrysogenum</i>			Pn asymétriques, complexes, à ramifications divergentes ; cn lisses, longs, fins ; m de 3 à 5 /pn, p de 4 à 7 /pn, ampulliformes ; c elliptiques, lisses, en longues chaînettes irrégulières (Schéma 2, photo 4).	Th ras, velouté ; centre granuleux ; forte conidiogénèse, turquoise-grise ; exsudat jaune, odeur forte.	Revers jaunâtre.
<i>P. variable</i>			Pn biverticillés, symétriques ; cn lisses ; m de 4 à 7 /pn ; p lancéolées, 5 à 7 /pn ; c elliptiques à fusiformes, lisses.	Th velouté, floconneux au centre, crois. lente, vert-gris.	Revers jaune.
<i>P. pinophilum</i>			Pn septés, lisses, à paroi épaisse ; pn biverticillés ; m de 7 à 9 /pn, lisses ; p de 5 à 7 /pn, lisses, lancéolées ; c sphériques, lisses, à paroi épaisse.	Crois. lente ; th floconneux, jaune ; forte conidiogénèse, vert-foncée ; pigment orange faible ; centre surélevé.	Revers jaune terne.
<i>P. marneffeii</i>			Pn latéraux ou terminaux ; p de 3 à 5 /pn ; c ovoïdes ; fragmentation du th à 37°C donnant une forme lévuroïde (arthrospores).	Crois. rapide ; th duveteux, blanc puis granuleux, vert avec des sillons radiaux ; pigment rouge.	Revers rouge.
<i>P. lilacinum</i>			Pn asymétriques, monoverticillés, longs, ramifications latérales ; p de 2 à 4 /pn ; c elliptiques, couleurs lilas.	Crois. rapide, forte conidiogénèse, couleur lilas.	Revers orange.
<i>P. bilaiae</i>			Pn biverticillés, longs ; m courtes, presque parallèles ; p longues, cylindriques, en touffes ; c globuleuses, lisses, en chaînettes très longues, divergentes.	Th vert-olive foncé, duveteux, marge blanche, centre floconneux ; sillons radiaux.	Revers blanc ; centre vert ; sillons radiaux.
<i>P. funiculosum</i>			Pn biverticillés, symétriques ; cn lisses ; m : 5 à 8 /pn ; p : 5 à 8 /m, densément groupées, cylindriques ; c elliptiques, lisses, vert grisâtre.	Crois. rapide ; th funiculeux, couleur pêche ; exsudat clair ; pigment rose.	Revers rose.

Tableau 25 : Principales caractéristiques permettant l'identification des autres moisissures isolées autour de *Camellia sinensis*.

my : mycélium, cn : conidiophore, ch : chlamydospore, p : phialide, th : thalle, c: conidie, h: hyphe, sc : sclérote, crois. : croissance.

Espèce identifiée	Caractéristiques du genre		Caractéristiques de l'espèce		
	Observation microscopique	Le nom du genre	Observation microscopique	Observation macroscopique	
				Recto.	Verso.
<i>F. sporotrichioides</i>	Même caractéristiques déjà citées (Tableau 20).	<i>Fusarium</i>	Cn simples ou ramifiés, mono ou polyphialidés ; microconidies abondantes, fusoides, de 0 à 3 cloisons ; macroconidies rares, de 3 à 5 cloisons ; ch épaisses, brunes, rugueuses, en chaînettes ou amas.	Th abondant, aérien, rosâtre ; odeur d'abricot peu marquée.	Revers blanc devenant rose.
<i>F. acuminatum</i>			Cn courts, souvent ramifiés en croix, mono ou polyphialidés ; macroconidies longues, très courbées, cellule basale très longue et courbe ; ch en chaînettes ou amas.	Th abondant, aérien, blanc devenant ocre ; crois. rapide.	Revers ocre avec des taches marron.
<i>F. proliferatum</i>			Microconidies abondantes, piriformes à ovoïdes, en chaînettes ; h détachées en amas ; p isolées ou réunies, latérales ; macroconidies rares, peu fusiformes, généralement avec 3 cloisons, cellule basale distincte ; ch absentes.	Crois. rapide ; th. blanc, devenant violet ; sc bleu foncé.	Revers violet foncé.
<i>G. clavatum</i>	Même caractéristiques déjà citées (Tableau 20).	<i>Geotrichum</i>	My septé, hyalin, non ramifié ; h longues ; arthrospores intercalaires ou terminales, cylindriques, lisses, en chaînettes ; cn courts au début puis disparaissaient.	Crois. relativement rapide ; th glabre devenant duveteux, beige ; sillons radiaux.	Revers jaune pâle.
<i>G. capitatum</i>			My très ramifié, hyalin ; h latérales arquées, longues ; arthrospores et blastospores hyalines.	Crois. rapide ; th blanc, aéré, haut.	Revers incolore.
<i>T. harzianum</i>	Même caractéristiques déjà citées (Tableau 20).	<i>Trichoderma</i>	Cn très ramifiés ; p ampulliformes, regroupés de 2 à 5 ; c sub-globuleuses, lisses, vertes, grandes ; ch globuleuses, hyalines (Schéma 5, photo 7).	Th blanc puis vert-olive.	Revers incolore.

Une fois ensemencées sur les milieux préparés à base d'acide tannique (AT), seulement huit espèces isolées autour des cultures de fèves et sept isolées autour des cultures du thé ont donné croissance. Ces moisissures avaient donc une tannase qui dégradait les tannins hydrolysables (Tableau 26).

Tableau 26 : Liste des moisissures ayant donné croissance sur les différents milieux.

A. : *Aspergillus* ; P. : *Penicillium* ; F. : *Fusarium* ; T. : *Trichoderma* ; G. : *Geotrichum*.

	Moisissures identifiées (MAB)	AT	TC
<i>Vicia faba L. seville</i>	<i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. ustus</i> , <i>A. amstelodami</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>P. rubrum</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. dimerum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>G. candidum</i> , <i>T. viride</i> (Photo 8).	<i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. flavus</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. glabrum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>T. viride</i> (Photo 9).	<i>A. niger</i> , <i>P. variable</i> , <i>F. solani</i> (Photo 13)
<i>Camellia sinensis</i>	<i>A. foetidus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>A. puniceus</i> , <i>A. awamori</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. rugulosum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. variable</i> , <i>P. pinophilum</i> , <i>P. marneffeii</i> , <i>P. lilacinum</i> , <i>P. bilaiae</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>G. clavatum</i> , <i>G. capitatum</i> , <i>T. harzianum</i> (Photo 8).	<i>A. foetidus</i> , <i>A. aculeatus</i> , <i>A. awamori</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>T. harzianum</i> (Photo 10, 12).	<i>A. awamori</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>T. harzianum</i> (Photos 11)

Les espèces *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Penicillium variable*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium solani* et *Trichoderma harzianum* ont montré de grandes vitesses de croissance, similaires à celles montrées sur le milieu d'isolement MAB. Ceci témoignait du fait qu'elles dégradait l'acide tannique aussi facilement que le glucose présent dans le premier milieu. Certaines autres, par contre, avaient des vitesses de croissance plus lentes, notamment *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Penicillium chrysogenum* et *Penicillium pinophilum*. Elles indiquaient ainsi que l'acide tannique restait pour elles une substance difficilement biodégradable.

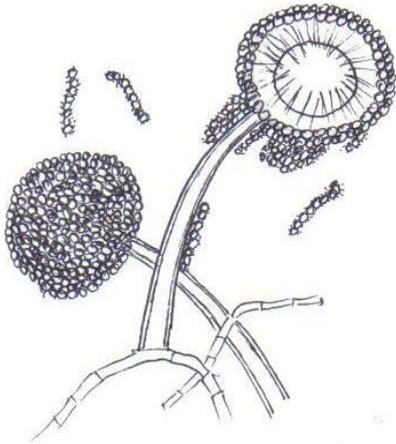


Schéma 1 : *Aspergillus niger*

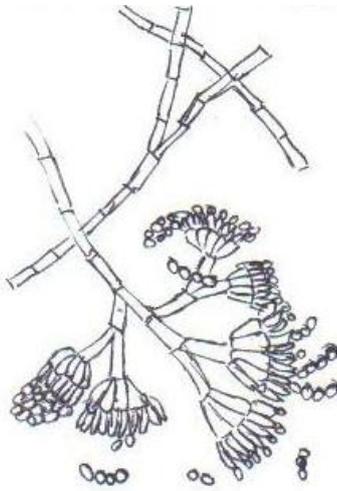


Schéma 2 : *Penicillium chrysogenum*

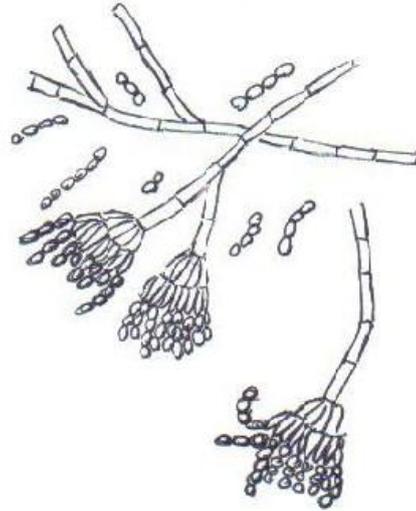


Schéma 3 : *Penicillium variabile*

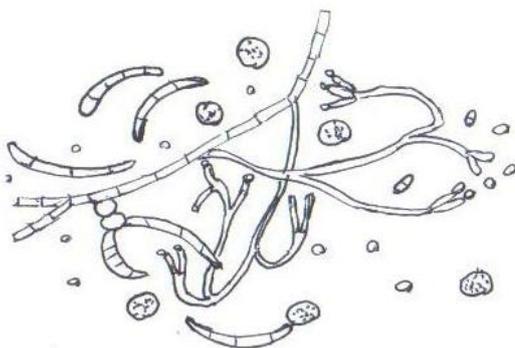


Schéma 4 : *Fusarium solani*

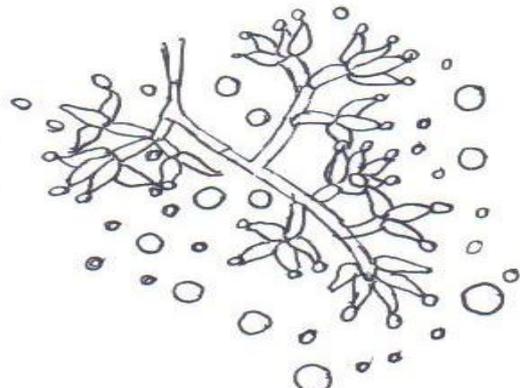


Schéma 5 : *Trichoderma harzianum*

Schémas 1-5 : Observations microscopiques (grossissement x 40) de quelques moisissures ayant donné croissance sur les milieux TC.



Photo 3 : *Aspergillus niger* (De Hoog et al. 2000).

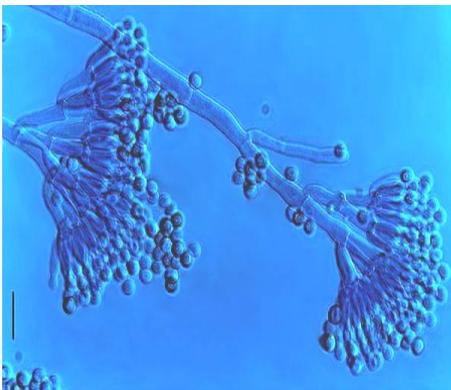


Photo 4 : *Penicillium chrysogenum* avec une goutte de bleu de méthylène (Site A).



Photo 5 : *Penicillium variabile* avec une goutte de bleu de méthylène (Site B).

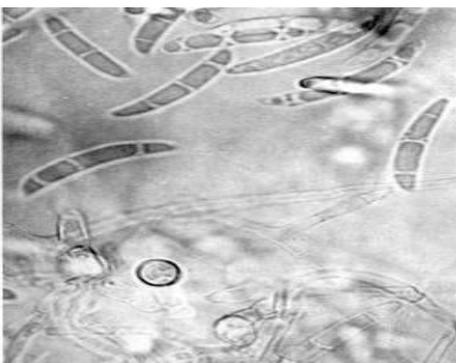


Photo 6 : *Fusarium solani* (Carlos Diaz Polanco et Camino 1976).



Photo 7 : *Trichoderma harzianum* (Site C).

Photos 3-7 : Photos bibliographiques correspondant aux moisissures schématisées.



Photo 8 : Observation macroscopique d'*Aspergillus versicolor* et *Aspergillus niger*



Photo 9 : Observation macroscopique de *Fusarium solani* sur le milieu AT.

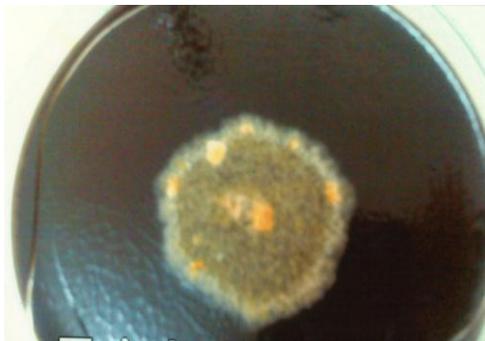


Photo 10 : Observation macroscopique de *Aspergillus tamaris* sur le milieu AT.

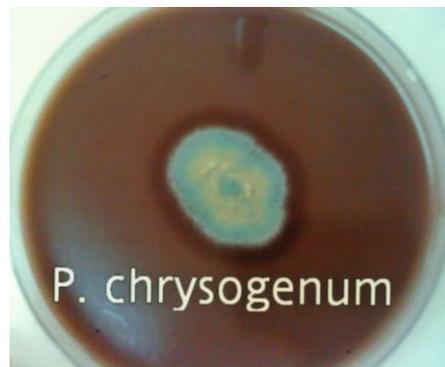


Photo 11 : Observation macroscopique de *Penicillium chrysogenum* sur le milieu TC.



Photo 12 : Observation macroscopique de *Trichoderma harzianum* sur le milieu TC.

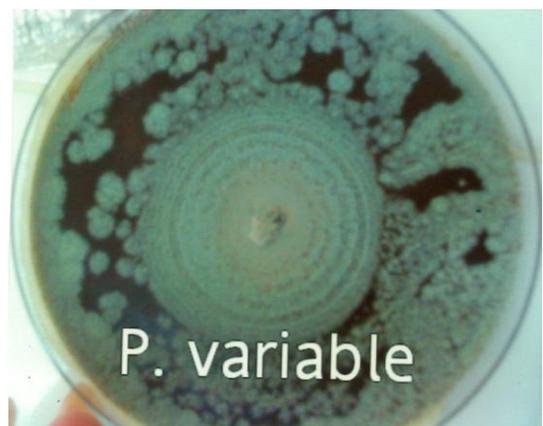


Photo 13 : Observation macroscopique de *Penicillium variable* sur le milieu TC.

Sur les milieux TC, seules trois moisissures isolées autour de *Vicia faba L. seville* et trois autres isolées autour de *Camellia sinensis* avaient donné une croissance : *Aspergillus niger*, *Penicillium variable* et *Fusarium solani* pour la première plante ; *Aspergillus awamori*, *Penicillium chrysogenum* et *Trichoderma harzianum* pour la deuxième (Tableau 24). Ces espèces étaient donc capables de produire une tannase qui dégradait les procyanidines des plantes aussi bien que l'acide tannique.

Aspergillus niger et *Aspergillus awamori* avaient des diamètres du mycélium toujours très importants. Ces espèces ont gardé pratiquement la même vitesse de croissance sur les trois milieux utilisés montrant qu'elles utilisaient les procyanidines avec autant de facilité que le glucose et l'acide tannique (Figures 27 et 28). *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium variable* et *Trichoderma harzianum* avaient des vitesses de croissance sur les milieux TC beaucoup plus inférieures à celle montrées sur le milieu AT : elles avaient dégradé les procyanidines avec plus de difficulté.

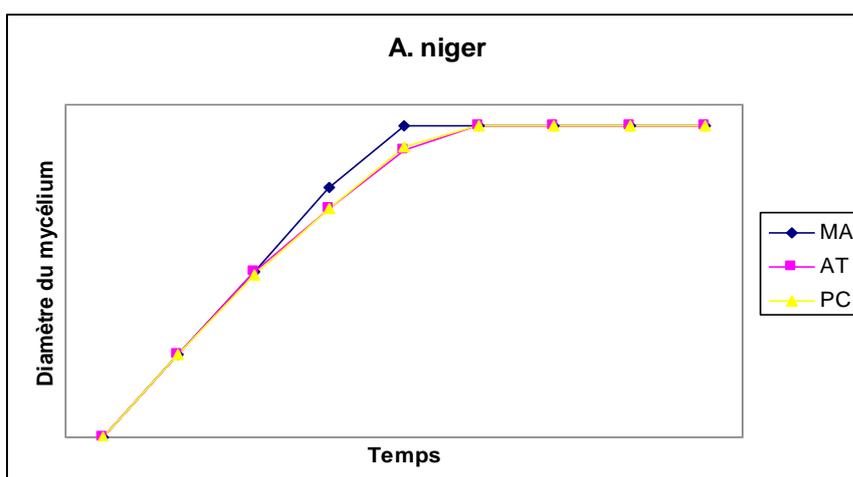


Figure 27 : Vitesses de croissance d'*Aspergillus niger* exprimées en cm / jour.

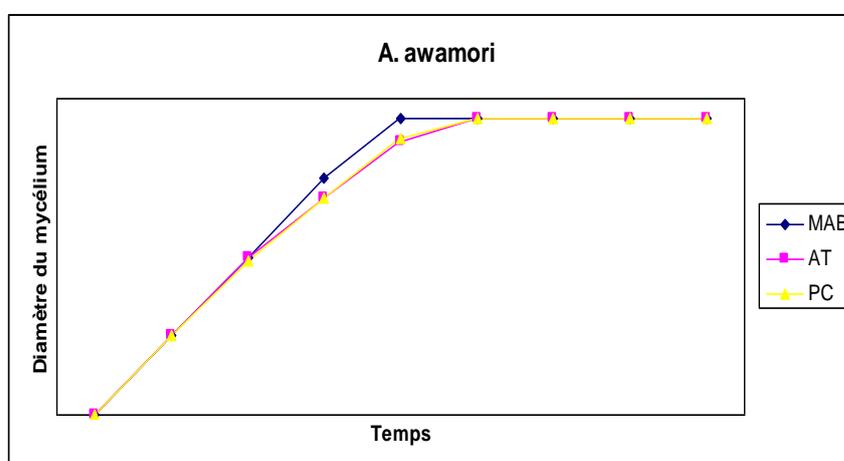


Figure 28 : Vitesses de croissance d'*Aspergillus awamori* exprimées en cm / jour.

3.3. Mesure de l'activité enzymatique de la tannase produite:

Le suivi de la production de biomasse pour les différentes moisissures a permis d'établir que le maximum d'activité de la tannase apparaissait au début de la phase stationnaire de croissance pour chaque espèce.

La capacité de croissance des moisissures et la production de la tannase sur le milieu sélectif utilisé ont été étudiées et ont permis d'observer ce qui suit :

Parmi les six moisissures utilisées dans cette étape, *Aspergillus awamori* et *Aspergillus niger* avaient donné les plus grandes vitesses de croissance et les plus grands taux de production de biomasse, suivis de *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani* puis *Penicillium variable*.

Suivant les espèces, l'optimum de production de l'enzyme a eu lieu après deux à quatre jours de culture et a confirmé les résultats obtenus pour la biomasse, bien que ce maximum n'a pas été maintenu plus de trois jours.

Les plus hauts niveaux ont été donnés par les cultures d'*Aspergillus awamori* et *Aspergillus niger* avec des taux de tannase produite de 21,4 U / ml et 20,6 U / ml respectivement. Venaient après *Penicillium chrysogenum* avec 16,9 U / ml, *Trichoderma harzianum* avec 13,5 U / ml, *Fusarium solani* avec 12,4 U / ml puis *Penicillium variable* avec 10,1 U / ml (Figure 29).

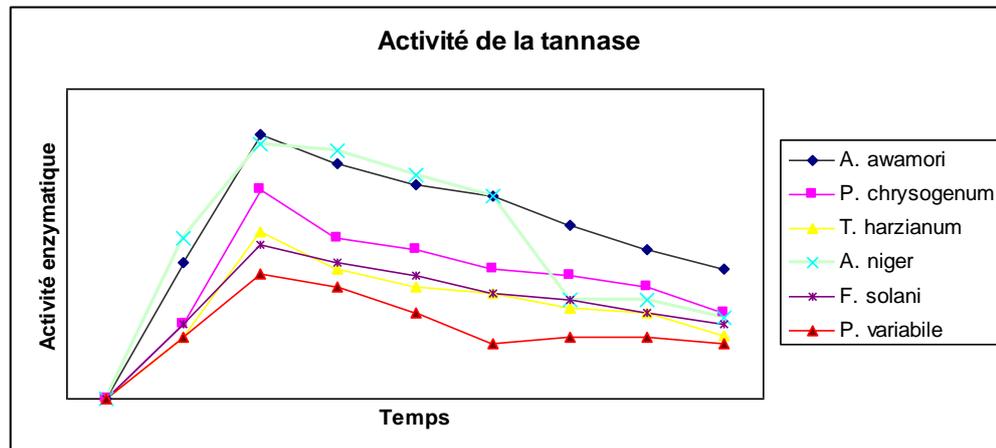


Figure 29 : Courbes de l'activité enzymatique de la tannase.

Discussion

Les extraits méthanoliques des plantes alimentaires avaient une grande activité antimicrobienne comparés aux extraits éthanoliques. Ceci pouvait s'expliquer par le fait qu'ils contenaient une plus grande diversité de produits bioactifs révélés par le screening phytochimique. Et ce contrairement aux extraits éthanoliques de ces mêmes plantes qui ne contenaient que quelques rares molécules polyphénoliques. D'autre part, les extraits éthanoliques des plantes médicinales, riches en flavonoïdes et en acides phénols, avaient aussi une grande activité antimicrobienne. Ces résultats signifiaient que l'activité antimicrobienne pouvait être effectuée par différents types de composés : terpénoïdes, huiles essentielles, tannins, flavonoïdesetc.

Pour les activités antioxydantes et cytotoxiques, nous avons remarqué que les extraits méthanoliques étaient toujours plus actifs que les extraits éthanoliques, et ce pour toutes les plantes utilisées. Ce qui laissait supposer que les flavonoïdes et les acides phénoliques (majoritaires dans les extraits éthanoliques) étaient moins actifs pour ces activités que les autres composés révélés dans les extraits méthanoliques.

Les plantes ayant montré de grandes activités antimicrobienne, antioxydante et cytotoxique à la fois étaient : *Camellia sinensis*, *Vicia faba L.*, *Vaccinium macrocarpon*, *Punica granatum*, *Linum capitatum*, *Lavandula officinalis* et *Artemisia absinthium*.

L'activité antibactérienne de *Camellia sinensis* a déjà été démontrée par des travaux précédents (Simonetti et al. 2000, Punyarisi et al. 2005). Mais, aucun travail n'a été trouvé sur son activité antifongique contre *Candida maltosa* et *Cryptococcus neoformans*. Nos résultats ont permis de préciser que cette plante était active contre la deuxième espèce et inactive contre la première. Le screening phytochimique de l'extrait méthanolique a révélé la présence de grandes quantités de tannins et d'alcaloïdes qui pouvaient être à l'origine des activités testées (Ramerethinam et Rajalakshmi 2004, Gosse et al. 2005).

Nos résultats ont aussi montré que l'extrait éthanolique d'*Artemisia absinthium* avait une grande activité antibactérienne. Son screening phytochimique a indiqué qu'il contenait principalement des flavonoïdes qui pouvaient en être responsables. En effet, cet extrait était actif contre les bactéries à Gram-positif et celles à Gram-négatif.

Les activités antibactériennes, antioxydantes et cytotoxiques de *Lavandula officinalis* ont déjà été rapportées par d'autres travaux. Ces activités étaient attribuées aux huiles

essentielles de la plante (Kordali et al. 2005). Le screening phytochimique a révélé que l'extrait éthanolique de *Lavandula officinalis* était riche en flavonoïdes, mais qu'il était seulement doté d'une activité antibactérienne.

Aussi, l'extrait méthanolique de *Vicia faba L.* a montré des activités antimicrobiennes et antioxydantes qui étaient en accord avec d'autres travaux réalisés auparavant (Ray et al. 2000, Zhang 2005).

Parmi les plantes qui se sont avérées intéressantes, nous avons aussi *Citrus paradisi*. Dans des travaux précédents, l'activité antimicrobienne de cette plante a été démontrée contre différentes espèces (Cvetnic et Vladimir-Knezevic 2004), mais aucun résultat n'a été trouvé contre *Candida maltosa* et *Cryptococcus neoformans*. La grande activité antimicrobienne de *Citrus paradisi* a été attribuée à la grande teneur de ses extraits en huiles essentielles, vitamine C et flavonoïdes (Cano et al. 2008). Les extraits d'autres espèces du genre *Citrus*, notamment *Citrus sinensis* et *Citrus aurantifolia* ont aussi été reconnus comme ayant un pouvoir antimicrobien non négligeable (Gülşay Kırbaslar et al. 2009, Jazet Dongmo et al. 2009).

Parmi les plantes utilisées, la majorité contenait des flavonoïdes, mais seulement neuf en contenaient en quantités suffisantes pour l'identification et la réalisation des tests antimicrobiens, antioxydants et cytotoxiques. Les plantes qui s'étaient avérées les plus riches étaient *Carthamus tinctorius* avec huit molécules identifiées, *Linum capitatum* avec six molécules, *Chamaemelum nobile* avec huit molécules et *Mentha longifolia* avec cinq molécules identifiées.

Carthamus tinctorius contenait des flavones et des flavonols qui pouvaient être sous forme aglycone ou monoglycosylée. D'après les travaux de Yu et Xu (1997) les flavonoïdes de cette plante ont été démontré comme étant de la rutine, quercétine et kaempférol. Et d'après Lee et al. (2002) comme étant la quercétine-7-O-(6"-O-acetyl)-beta-D-glucopyranoside, lutéoline, quercétine, lutéoline-7-O-beta-D-glucopyranoside, luteoline-7-O-(6"-O-acetyl)-beta-D-glucopyranoside, quercétine-7-O-beta-D-glucopyranoside, acacétine-7-O-beta-D-glucuronide et apigénine-6-C-beta-D-glucopyranosyl-8-C-beta-D-glucopyranoside.

Linum capitatum contenait des flavonoïdes de même nature (flavonols et flavones) qui étaient identifiés par Ilic et al. (2004) comme étant le kaempférol, le kaempférol-3-O-galactoside, la quercétine-3-O-rutinoside, la lutéoline-8-C-glucoside et aussi une isoflavone qui était la genistéine-7-O-glucoside.

De même, les études de Tschan et al. (1996) ont démontré que *Chamaemelum nobile* contenait principalement de l'apigénine-7-glucoside-6-(3''-hydroxy-3''-methyl-glutarate) et les travaux de Sharaf et al. (1999) ont révélé chez *Mentha longifolia* plusieurs flavonoïdes, à savoir l'isoorientine, vicénine, hypolaetine, lucénine, lutéoline-7-O-glucoside, lutéoline-7-O-neohesperidoside, tricétine-7-O-méthylether 3'-O-glucoside 5'-O-rhamnoside, tricétine-3'-O-glucoside-5'-O-rhamnoside et tricétine-3'-O-rhamnosyl-(1 → 4)-rhamnoside.

Les tests réalisés dans notre travail ont confirmé les bénéfices apportés par les flavonoïdes. En effet, un grand nombre d'entre elles avait des activités biologiques très intéressantes.

Il a été observé d'après les valeurs obtenues, qu'un composé aglycone était toujours plus actif que ses formes substituées ; et que le degré de substitution influençait les activités testées contrairement au type de substitution.

Parmi les molécules testées, les flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* ainsi que la flavone extraite de *Mentha longifolia* ont montré les plus grandes activités antimicrobiennes ; ces mêmes molécules avec les flavones aglycones de *Carthamus tinctorius* et *Linum capitatum* avaient les plus grandes activités antioxydantes ; et toujours les flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* les plus grandes activités cytotoxiques.

L'activité antimicrobienne testée *in vivo* contre *Streptococcus pneumoniae* a confirmé l'importance des flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* et de la flavone extraite de *Mentha longifolia*. En effet, ces molécules ont inhibé la croissance du germe infectieux de manière plus importante que l'amoxicilline, qui était un témoin de référence. Même si la flavone s'est montrée beaucoup plus active que les flavonols, l'action de ces derniers restait néanmoins non négligeable.

Certains flavonols comme ceux cités se sont donc révélés comme étant des molécules très actives pour l'ensemble des activités testées. Ces résultats ont déjà été reportés par d'autres travaux qui ont porté principalement sur la quercétine (Gatto et al. 2002, Bhattacharya et al. 2006, Luis et al. 2006). Certains chercheurs ont même prouvé que ce flavonoïde avait une action anticancéreuse non négligeable ou augmentait l'activité anticancéreuse d'autres composés comme le topotécan (Akbas et al. 2005, Paliwal et al. 2005). Néanmoins, nos résultats ne permettaient d'identifier les flavonols actifs comme étant des quercétines. Il était intéressant aussi de signaler que ces flavonoïdes, sous leurs différentes formes, ont donné les meilleures valeurs lors du test de la toxicité aigue ce qui encourage leur utilisation.

Dans les travaux de Luis et al. (2006) et Ramos et al.(2006), il a été mentionné que les activités antimicrobiennes et antioxydantes de la quercétine dépendaient du type de substitution, à l'inverse de nos résultats qui ont clairement démontré que la nature des substitutions avait un faible impact sur les activités testées contrairement aux degré de substitutions. Gatto et ses collaborateurs (2002) ont développé cette idée en suggérant dans leurs travaux que le type de substitution n'avait pas d'impact sur l'activité antimicrobienne, mais les molécules nécessitaient un hydroxyl libre en C3 pour avoir une activité antivirale. Donc, il était clair que d'autres précisions devaient être apportées pour clarifier le rôle des substitutions sur les activités des flavonoïdes.

Les flavones aglycones de *Carthamus tinctorius* et *Linum capitatum* n'avaient aucune action contre les bactéries à Gram-positif et une activité moyenne contre les bactéries à Gram-négatif et les levures. L'activité antimicrobienne des ces molécules était donc considérée comme étant sélective. Au contraire, leurs activités antioxydantes et cytotoxiques étaient très intéressantes avec des valeurs comprises entre 52,60% (aglycone) et 46,02 % (bisubstituées) à 10 µg pour l'activité antioxydante et des valeurs de CI₅₀ comprises entre 40 µg / ml (aglycone) et 50 µg / ml (bisubstituées) pour l'activité cytotoxique.

La flavone-O-glucuronide extraite de *Carthamus tinctorius* s'est révélée le flavonoïde le moins actif : ses activités antimicrobiennes, antioxydantes et cytotoxiques étaient très faibles.

La toxicité aigue testée pour les flavonoïdes ayant montré au moins une bonne activité antimicrobienne, antioxydante et/ou cytotoxique a montré que plusieurs molécules avaient des DL₀ et des DL₅₀ intéressantes, parmi elles nous pouvons citer : la flavonol-O-glucoside de *Mentha longifolia*, la flavonol aglycone et la flavonol-O-glucoside de *Carthamus tinctorius*, la flavonol-O-diglucoside de *Linum capitatum* et la flavonol aglycone d'*Artemisia absinthium*. Ces molécules étaient représentées par les composés 4, 8, 9, 18 et 32 respectivement.

Le type et le degré de substitution des flavonoïdes n'avait aucune influence sur les DL₀ et DL₅₀. Ceci pouvait s'expliquer par le fait que les substitutions étaient pour la majorité des oses ne causant pas de toxicité, et donc incapables d'augmenter ou d'abaisser celle des aglycones.

Les tannins des téguments de graines de *Vicia faba L. seville* et des feuilles de *Camellia sinensis* ont été identifiés comme étant principalement des tannins condensés de type procyanidines. La première plante contenait principalement des procyanidines tri et oligomériques ; et la deuxième des procyanidines polymériques.

Sur une quarantaine de moisissures isolées à partir du sol, quinze d'entre elles étaient capables de dégrader l'acide tannique, mais seulement six dégradait les procyanidines extraits. Ceci confirmait que les tannins condensés restaient difficilement utilisables et que seul un faible nombre de microorganismes étaient capables de les dégrader.

La mesure de l'activité de la tannase extracellulaire produite par *Aspergillus niger* et *Aspergillus awamori* a montré que ces moisissures étaient de très bonnes productrices de l'enzyme ; conformément aux travaux de Bajpai et Patil (1997) et de Mahapatra et al. (2005). Aussi, de part nos résultats, nous avons confirmé que les enzymes produites par ces deux moisissures étaient capables de dégrader les tannins condensés. Ces espèces pourraient donc être adéquates pour des utilisations dans les productions industrielles.

Certains travaux réalisés auparavant, ont déjà démontré que *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium variable*, *Trichoderma harzianum* et *Fusarium solani* produisaient des tannases dégradant les tannins hydrolysables, tels que les gallotannins, l'acide gallique et l'acide tannique (Pinto et al. 2001, Suseela Rajakumar et Nandy 1983, Van de Lagemaat et Pyle 2004, Murugan et al. 2007). Mais, aucun travail n'a démontré que les tannases de ces espèces étaient capables de dégrader les tannins condensés.

La tannase a aussi été produite par *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus tamarisii*, *Penicillium lilacinum*, *Penicillium glabrum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium oxysporum* et *Trichoderma viride*. Ces mêmes résultats ont été obtenus par d'autres chercheurs (Suseela Rajakumar et Nandy 1983, Bajpai et Patil 1996, Bajpai et Patil 1997, Batra et Saxena 2005, Van De Lagemaat et Pyed 2004, Purohit et al. 2006, Banerjee et al. 2007, Enemuor et Odibo 2009). Mais, nos résultats ont clairement démontré que les enzymes de ces espèces ne dégradait que les tannins hydrolysables.

En plus de sélectionner les moisissures productrices de tannase, le second objectif principal de cette partie était de démontrer que, contrairement « aux idées reçues », il y avait deux types de tannases : celles qui ne dégradait que les tannins hydrolysables, et celles qui dégradait tous les types de tannins : les condensés et les hydrolysables. Néanmoins, des travaux plus approfondis restent nécessaires afin de clarifier cette information ; notamment en déterminant quelles sont les différences biochimiques, structurales et catalytiques qui existent entre les deux types de tannases.

Conclusion

D'après les résultats du screening phytochimique, les extraits méthanoliques renfermaient une grande diversité de composés secondaires ; par contre les extraits éthanoliques contenaient majoritairement des flavonoïdes. Chez les plantes médicinales révélées comme étant plus riches en flavonoïdes, les extraits éthanoliques avaient donc de grandes activités antimicrobienne, antioxydante et cytotoxique.

Chez les plantes alimentaires, les extraits éthanoliques contenaient moins de flavonoïdes et d'acides phénoliques ce qui expliquait leur faible impact biologique, contrairement aux extraits méthanoliques. Car en effet, ces derniers renfermaient plusieurs types de composés secondaires qui leurs procuraient de fortes activités biologiques.

Carthamus tinctorius, *Linum capitaum*, *Chamaemelum nobile* et *Mentha longifolia* s'étaient révélées comme étant les plantes les plus riches en flavonoïdes.

Parmi les flavonoïdes identifiés, les flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* étaient les molécules les plus intéressantes avec des résultats très importants pour la totalité des activités testées. Mais, pour plus de précision concernant les résultats obtenus, nous pouvons dire que ces molécules ainsi que flavone extraite de *Mentha longifolia* avaient les activités antimicrobiennes les plus importantes, les flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* et les flavones aglycones de *Carthamus tinctorius* et *Linum capitatum* les activités antioxydantes les plus puissantes ; les flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* les meilleures activités cytotoxiques. L'activité antimicrobienne de ces dernières molécules et de la flavone aglycone de *Mentha longifolia* a été confirmée par des tests *in vivo* qui s'étaient avérés très concluants contre *Streptococcus pneumoniae*.

La mesure de la toxicité aigue a révélé que les flavonoïdes de manière générale avaient des DL_0 et DL_{50} intéressantes ; même si les flavones et flavonols testés ont donné les meilleures valeurs.

Aussi, d'après notre étude sur les tannins condensés, nous sommes arrivés à la conclusion que ces polyphénols restaient considérés comme étant des macromolécules difficiles à dégrader. Car bien que plusieurs moisissures étaient capables de produire la tannase, seules six espèces ont pu hydrolyser ces composés polyphénoliques.

Afin de produire industriellement la tannase, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium variable*, *Trichoderma harzianum* et *Fusarium solani* pourraient être des espèces adéquates.

Références Bibliographiques

- Akbas SH, Timur M, Ozben T.** The effect of quercetin on topotecan cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells. *J. Surg. Res.* 2005, 125 (1): 49-55.
- Ames BN, Gold LS, Willett WC.** The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92: 5258-65.
- Ammar H, López S, Kammoun M, Bodas R, Giráldez F, González J.** Feeding quebracho tannins to sheep enhances rumen fermentative activity to degrade browse shrubs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2009, 149 (1): 1-15.
- Ariefdjohan MW, Savaiano DA.** Chocolate and cardiovascular health: is it too good to be true? *Nutr. Rev.* 2005, 63 (12-1): 427-30.
- Awadh Ali NA, Mothana R, Abdo Ghaleb N, Lindequist U.** Screening of traditionally used endemic soqotraen plants for cytotoxic activity. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 2007, 4 (4): 529-31.
- Babayi H, Kolo I, Okogum JI.** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camaldulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms. *Biochimistria* 2004, 16 (2): 102-5.
- Bacon JD, Mabry TJ, Mears JA.** UV spectral procedure for distinguishing free and substituted 7-hydroxyl groups in flavones and flavonoles. *Rev. Latinoam. Quim.* 1976, 7: 83-6.
- Bajpai B, Patil S.** Induction of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity in some members of fungi imperfecti. *Enzy. Microbiol. Technol.* 1997, 20 (8): 612-4.
- Bajpai B, Patil S.** Tannin-acyl-hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 1996, 12 (3): 217-20.
- Bamforth CW.** Perceptions of beer foam. *J. Inst. Brew.* 2000, 106: 229-38.
- Banerjee D, Mondal KC, Pati BR.** Tannase production by *Aspergillus aculeatus* DBF9 through solid-state fermentation. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2007, 54 (2): 159-66.
- Basile A, Giordano S, Lopez Saez JA, Cobianchi BC.** Antibacterial activity of pure flavonoïds isolated from mosses. *Phytochem.* 1999, 2 (8): 1419-82.
- Batawita K, Kokon K, Akpagona K, Koumaglo K, Bouchet P.** Fungicide activity of a threatened species from togo flora: *Conyza aegyptiaca* (L.) Ait. var. *lineariloba* (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae). *Acta Bot. Gal.* 2002, 149 (1): 41-8.
- Bate-Smith EC.** Phytochemistry of proanthocyanidins. *Phytochem.* 1975, 14 (1): 1107-13.
- Batra A, Saxena RK.** Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process Biochem.* 2005, 40 (5): 1553-7.
- Bhattacharya R, Tulsawani RK, Vijayaraghavan R.** Effect of trolox and quercetin on sulfur mustard-induced cytotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Indian J. Pharmacol.* 2006, 38 (1): 38-42.
- Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Laprent JP, Reymond P, Sanglier JJ,**

- Vayssier Y, Veau P.** Moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. 2^e Ed. Masson, Paris, 1990, 96-202.
- Brand WW, Cuvelier HE, Berset C.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 1995, 82: 25-30.
- Bruneton J.** Les tanins. Ed. Editions médicales internationales, Paris, 1999, 369-404.
- Bruneton J.** Pharmacognosie : Phytochimie, plantes médicinales. 4^e Ed. Éditions médicales internationales (Tec & Doc), Paris, 2009, 1288.
- Cano A, Medinaan A, Bermejo A.** Bioactive compounds in different *Citrus* varieties. Discrimination among cultivars. *J. Food Compos. Anal.* 2008, 21 (5): 377-81.
- Carlos Diaz Polanco YJM, Camino A.** Una nueva forma de *Fusarium solani*, Patoggeno del apio (*Arracacia xanthorrhiza*) en Venezuela. *Agronomia Tropical* 1976, 26 (4): 353-8.
- Chandana Venkateswara R, Vijayakumar M.** Effect of quercetin, flavonoids and α -tocopherol, an antioxidant vitamin on experimental reflux oesophagitis in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 2008, 589 (1-3): 233-8.
- Chaudhuri S, Banerjee A, Basu K, Sengupta B, Sengupta PK.** Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins : Antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 2007, 41 (1): 42-8.
- Chen HQ, Jin ZY, Wang XJ, Xu XM, Deng L, Zhao JW.** Luteolin protects dopaminergic neurons from inflammation-induced injury through inhibition of microglial activation. *Neurosci. Lett.* 2008, 448 (2): 175-9.
- Cheruvanky H.** Method for treating hypercholesterolemia, hyperlipidemia and arteriosclerosis. *United States Patol.* 2004, 6 (4): 733-99.
- Choi HJ, Song JH, Park KS.** Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009, 37 (3-4): 329-33.
- Costa AM, Ribeiro WX, Kato E, Monteiro ARG, Peralta RM.** Production of tannase by *Aspergillus tamaritii* in submerged cultures. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2008, 51(2): 399-404.
- Cushnie TP, Hamilthoh VES, Lamb AJ.** Assessment of the antimicrobial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol. Res.* 2003, 158(4): 281-9.
- Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S.** Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm.* 2004, 54 (3): 243-50.
- Dadi PK, Ahmad M, Ahmad Z.** Inhibition of ATPase activity of *Escherichia coli* ATP synthase by polyphenols. *Int. J. Biol. Macromol.* 2009, 45 (1): 72-9.
- Dangles O, Stoeckel C, Wigand MC, Brouillard R.** Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and inclusion. *Tetrahedron Lett.* 1992, 33: 5227-30.
- De Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ.** Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000.
- De Mejia EG.** Tannins, Trypsin inhibitors and lectin cytotoxicity in therapy (*Phaseolus ocutifolins*) and common (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Food Hum. Nutr.* 2005, 60 (3): 137-45.
- Del Bubba M, Giordanie E, Pippucci L, Cincinelli A, Checchini L, Galvan L.** Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth

and ripening and in response to different postharvest treatments. *J. Food Comp. Anal.* 2009, 22 (7-8): 668-77.

- Dewick PM.** The biosynthesis of shikimate metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 1995, 12: 579-607.
- Didrak M.** Antimicrobial activities of the extracts of various plants (Valex, Mimosa bark, Gallnut powders, *Salvia sp* and *Phlomis sp*). *J. Biol.* 1999, 23: 241-8.
- Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S.** Chocolate and prevention of cardiovascular disease: A systematic review. *Nutr. Metab.* 2006, 3: 2.
- Druyne T.** Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochem. Syst. Ecol.* 1999, 27 (4): 445-59.
- Dyckerhoff H, Armbruster R.** Zur kenntnis der tannase. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1933, 219: 38-56.
- Enemuor SC, Odibo FJC.** Culture conditions for the production of a tannase of *Aspergillus tamarii* IMI388810 (B). *Afr. J. Biotechnol.* 2009, 8 (11): 2554-7.
- Fleeger JL, Flipse IJ.** Metabolism of bovine semen XIII. Malonic acid metabolism by bovine spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 1964, 47 (5): 535-8.
- Frei B, Higdon JV.** Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: Evidence from animal studies. *J. Nutr.* 2003, 133: 3275-84.
- Fritch H, Griesbach H.** Biosynthesis of cyaniding in cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Phytochem.* 1975, 14: 2437-42.
- Funatogawa K, Hayashi S, Shimomura H, Yoshida T, Hatano T, Ito H, Hirai Y.** Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.* 2004, 48 (4): 251-61
- Gaffney S, Williams V, Flynn P, Carlino R, Mowry C, Dierenfeld E, Babb C, Fan J, Tramontano WA.** Tannin/polyphenol effects on iron solubilization *in vitro*. *BIOS* 2004, 75(2): 43-52.
- Galvez J, Crespo J, Jimenez J, Suarez A, Zarzuelo A.** Antidiarrhoeic activity of quercetin in mice and rats. *J. Pharmacol.* 1993 a, 45: 157-9.
- Galvez J, Zarzuelo A, Crespo J, Lorente MD, Acete MA, Jimenez J.** Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. *Planta Med.* 1993 b, 59: 333-6.
- Gatto MT, Falcocchio S, Grippa E, Mazzanti G, Battinelli L, Nicolosi G, Lambusta D, Saso L.** Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. *Bioorg. Med. Chem.* 2002, 10 (2): 269-72.
- Gedir JV, Sporns P, Hudson RJ.** Extraction of condensed tannins from cervied feed and feces and quantification using a radial diffusion assay. *J. Chem. Ecol.* 2005, 31(12): 2761-73.
- Gerber M, Berta-Vanrullen I.** Soja et phytoestrogènes. *Arch. Pédiatrie* 2006, 13 (6): 534-536
- Gilani GS, Cockell KA, Sepher E.** Effects of antinutritional factors on protein digestibility and amino acids availability in foods. *J. AOAC. Int.* 2005, 88 (3): 967-87.
- Goel G, Puniya AK, Agnilar CN, Singh K.** Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturw.* 2005, 92 (11): 497-503.

- Goodarzi MT, Zal F, Malakooti M, Safari MR, Sadeghian S.** Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran.* 2006, 44(1): 41-5.
- Gorger C, Scholz E, Rimpler H.** Ellagitannins from *Alchemilla xanthochlora* and *Potentilla erecta*. *Planta Med.* 1994, 6: 384-5.
- Gosse F, Guyot S, Roussi S, Labstein A, Fisher B, Seiler N, Raul F.** Chemopreventive properties of apple procyanidins of human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of edon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005, 26 (7): 1291-5.
- Griesbach RJ.** The inheritance of flower color in *Petunia hybrida* vilm. *J. Hered.* 1996, 87 (3): 241-45.
- Grisebach H.** Biosynthesis of anthocyanidins. In Markakis P. Anthocyanidins as food colours. Ed. Academic Press, New York, USA. 1982: 69-92.
- Gülây Kırbaşlar F, Tavman A, Dülger B, Türker G.** Antimicrobial activity of Turkish *Citrus* peel oils. *Pak. J. Bot.* 2009, 41 (6): 3207-12.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Richel TL.** High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46: 1887-92.
- Hagerman AE.** Chemistry of tannin-protein complexation in chemistry and significance of tannins. In R. W. Hemingway RW, Karchesy JJ. Chemistry and significance of condensed tannins. Ed. Plenum Press, New York, 1989, 323-33.
- Harborne JB.** Recent advances in chemical ecology. *Nat. Prod. Rep.* 1989, 25 (7): 85-109.
- Hashimoto F, Jamal Uddin AFM, Shimizu K, Sakaba Y.** Multiple allelism in flavonoid hydroxylation in *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn. *Flowers. J. Japan Soc. Hort. Sci.* 2004, 73 (3): 235-240.
- Haslam E.** Natural polyphenols (vegetable tannins): Gallic Acid metabolism. *Nat. Prod.* 1994, 11: 41-66.
- Hayaloglu AA, Kirbag S.** Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese, *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 115 (3): 376-80.
- Heller W, Forkmann G.** The flavonoids. Advances in research since 1986. In Harborne JB. Secondary Plant Products. Encyclopedia of plant physiology. Ed. Chapman & Hall, London, 1993, 399-425.
- Horn J, Hayes J, Lawless HT.** Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chem. Senses* 2002, 27 (7): 653-9.
- Ilic SB, Konstrantinovic SS, Todorovic ZB.** Antimicrobial activity of bioactive component from flower of *Linum capitatum* Kit. *Physics Chem. Technol.* 2004, 3 (1): 73-7.
- Jakupovic J, Paredes L, Bohlmann F, Watson L.** Prenyl flavanes from *Marshallia* species. *Phytochem.* 1988, 27 (10): 3273-5.
- Jazet Dongmo PM, Tatsadjieu LN, Tchinda Sonwa E, Kuate J, Amvam Zollo PH, Menut C.** Essential oils of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and their antifungal activity against *Phaeoramularia angolensis*. *Afr. J. Agric. Res.* 2009, 4 (4): 354-8.
- Jhonson I.** Antioxydants et anticancéreux. *Biofutur* 1999, 186: 14-15.
- Kandra L, Gyeman G, Zajaez A, Batta G.** Inhibitory effects of tannins of human salivary

- alpha-amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 319(4): 1265-71.
- Kenny TP, Keen CL, Schmitz HH, Gershwin ME.** Immunob effects of cocoa procyanidin oligomers on peripheral blood mononuclear cells. *Exp. Biol. Med.* 2007, 232:293-300.
- Khennouf S.** Gastroprotectives of polyphenolic compounds from *Quercus Suber* in rats and mice. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 51(5):1469-73.
- Kocisko DA.** Evaluation of new cell culture inhibitors of protease resistant prion protein against serape infection in mice. *J. Gen. Verol.* 2004, 85 (8): 2479-83.
- Konig M, Seholz E, Hartmann R, Lehmann W, Rimpler H.** Ellagitannins and complex tannins from *Quercus patroae* bark. *J. Nat. Prodcut.* 1994, 57: 1411-15.
- Kordali S, Kotan R, Mavi A, Cakir A, Ala A, Yildirim A.** Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 30 (53-24): 9452-8.
- Kuster RM, Arnold N, Wessjohann L.** Anti-fungal flavonoids from *Tibouchina grandifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 2009, 37 (1): 63-5.
- Lainé E, Hano C, Lamblin F.** Les lignanes phyto-œstrogènes du lin sont ils des bienfaiteurs méconnus ? *Phytothér.* 2007, 5: 121-8.
- Latte LP, Kolodziej H.** Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Naturforsch* 2000, 5 (5-6): 467-72.
- Lee JY, Chang EJ, Kim HJ, Park JH, Choi SW.** Antioxidative flavonoids from leaves of *Carthamus tinctorius*. *Arch. Pharm. Res.* 2002 25 (3): 313-9.
- Leitao DP, Polizello AC, Ito IY, Spadaro AC.** Antibacterial screening of anthocyanic and proanthocyanic fractions from cranberry juice. *J. Med. Food* 2005, 8 (1): 36-40.
- Liao CH, Lai CC, Hsu MS, Chu FY, Wu MY, Huang YT, Hsueh PR.** Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates determined by the agar dilution, disk diffusion and Etest methods: comparison of results using GC agar and chocolate agar. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010, 35 (5): 457-60.
- Lindl T, Bauer J.** Cell and culture. Ed. Gustav-fischer-Verlag Jena, Berlin, 1989, 181.
- Lopez-Lazaro M.** Two new flavonol glycosides as DNA topoisomerase I poisons. *Z. Naturforsch C.* 2000, 735 (11-12): 898-902.
- Lorke D.** A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 1983, 54: 275-87.
- Luis JC, Valdes F, Martin R, Carmona AJ, Dimz J.** DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus sp. Lusitanicum*. *Fitoterapia* 2006, 77 (6): 469-71.
- Mabry T, Ulubelen A.** Chemistry and utilization of phenylpropanoides including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 1980, 28: 188-96.
- Mahapatra K, Ranjan KN, Subhendu Sekher BAG, Banerjee R, Pandey A, Szakacs G.** Purification, characterization and some studies on secondary structure of tannase from *Aspergillus awamori nakazawa*. *Process Biochem.* 2005, 40 (10): 3251-4.
- Markham, KR.** Techniques of flavonoids identification. Ed. Academic Press, London, 1982, 1-113.

- Marston A, Hostettmann K. Separation and quantification of flavonoids.** In **OYvind MA, Markham KR.** Chemistry, biochemistry and application. Ed. CRC Press Taylor and Francis group, 2006, 2-20.
- Martin S, Andriantsitohaina R.** Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 2002, 51 (6): 304-15.
- Martini A, Katerere DR, Eloff JN.** Seven flavonoids with antibacterial activity isolated from *Combretum erythrophyllum*. *J. Ethnopharmacol.* 2004, 93 (2-3): 207-12.
- Miyazaki S, Fujikawa T, Kobayashi I, Matsumoto T, Tateda K, Yamaguchi K.** The *in vitro* and *in vivo* antibacterial characterization of vancomycin and linezolid against vancomycin-susceptible and -resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 50: 971-4.
- Modak B.** Actividad antibacteriana de flavonoïdes aislados des exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*. Efecto del tipo de estructura. *Bol. Soc. Quim.* 2001, 47 (1): 366-421.
- Montenegro de Matta SS, Delle Monache F, Ferrari F, Marini-Bettolo GB.** Alkaloids and procyanidins of an *Uncaria sp.* from Peru. *Farmaco. Sci.* 1976, 31: 5227-35.
- Morikawa K, Nonaka M, Mochizuki H, Handa K, Hanada H, Hirota K.** Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56 (22): 11030-7.
- Morreel K, Goeminne G, Storme V, Sterck L, Ralph J, Coppieters W, Breyne P, Steenackers M, Georges M, Messens E, Boerjan W.** Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *Plant J.* 2006, 47: 224-37.
- Murugan K, Saravanababu S, Arunachalam M.** Screening of tannin-acyl-hydrolase (E.C.3.1.1.20) producing tannery effluent fungal isolates using simple agar plate and SmF process. *Biores. Technol.* 2007, 98 (4): 946-9.
- Notomo H, Ligo M, Hamada H, Kojima S, Isuda H.** Chemoprevention of colorectal cancer by grape seed proanthocyanidin is accompanied by a decrease in proliferation and increase in apoptosis. *Nutr. Cancer* 2004, 49 (1): 81-8.
- Okigbo RN, Mbajinka CS, Njoku CO.** Antimicrobial potentials of (UDA) *Xylopi aethopica* and *Occinum gratissimum L.* some pathogenous of man. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 2005, 1 (4): 392-7.
- Ono E, Hatayama M, Isono Y, Sato T, Watanabe R, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Tanaka Y, Kusumi T, Nishino T, Nakayama T.** Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.* 2006, 45: 133-43.
- Ortuno A, Baidez A, Gomez P, Arcas MC, Porrás I, Garcia-Lidon A, Del Rio JA.** *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chem.* 2006, 98 (2): 351-8.
- Osato M.** Comparison of the Etest and the NCCLS-approved agar dilution method to detect metronidazole and clarithromycin resistant *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2009, 17 (1): 39-44.
- Osawa R, Walsh TP.** Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993, 59 (4): 1251-2.
- Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K.** Antioxidant tannins from

Rosaceae plant roots. *Food Chem.* 2007, 100 (2): 579-83.

- Ouali K, Trea F, Toumi L, Bairi A, Maurel D, Guellati MA.** L'hespéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothér.* 2007, 5 (4): 204-9.
- Paliwal S, Sundaram J, Mitragotri S.** Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound. *Brit. J. Cancer* 2005, 92: 499-502.
- Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH.** Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* 2008, 31(10): 1303-11.
- Pawlowska AM, De Leo M, Braca A.** Phenolics of *Arbutus unedo L.* (Ericaceae) fruits: Identification of anthocyanins and gallic acid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (26): 10234-38.
- Pietta PG.** Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 2000, 63 (7), 1035-42.
- Pinto GAS, Leite SGF, Terz SC, Couri S.** Selection of tannase producing *Aspergillus niger* strains. *Braz. J. Microbiol.* 2001, 32 (1): 75-9.
- Punyasiri PA, Abeysinghe SB, Kumar V.** Performed and induced chemical resistance of tea leaf against *Exobasidium vexans* infections. *J. Chem. Agri.* 2005, 31(6): 1315-24.
- Purohit JS, Dutta JR, Nanda RK, Banerjee R.** Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*. *Biores. Technol.* 2006, 97 (6): 795-801.
- Ramarethinam S, Rajalakshmi N.** Caffeine in tea plants [*Camellia sinensis (L) O. Kuntze*]: In situ lowering by *Bacillus licheniformis (Weigmann) chester*. *Indian J. Exp. Biol.* 2004, 42: 575-80.
- Ramos FA, Takaishi Y, Shirotori M, Kawaguchi Y, Tuchiya K, Shibata H, Higuti T, Tadokoro T, Takeuchi M.** Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54 (10): 3551-7.
- Ray SD, Wong V, Rinkovsky A, Bagohi M, Raje RR, Bagh D.** Unique organoprotective properties of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cadmium chloride induced nephrotoxicity dimethylnitrosamine (DMN) - induced splenotoxicity and mocap-induced neurotoxicity in mice. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 2000, 107 (1-2): 105-28.
- Reich E, Schibli A.** High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants (illustrated edition). Ed. Thieme Medical Publishers Inc. New York, 2007.
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T, Pearson DA, Schmitz HH, Gosselin R, Keen CL.** Cocoa inhibits platelets activation and function, *Am. J. Clin. Nutr.* 2000, 72:30-5.
- Richter G.** Métabolisme des végétaux. *Physiologie et Biochimie.* Ed. Presses Polytechniques et Universitaire Romandes, 1993, 322-323.
- Ruggiero P, Tombola F, Rossi G, Pancotto L, Lauretti L, Del Giudice G, Zoratti M.** Polyphenols reduce gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection or VacA toxin administration in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 50 (7): 2550-52.

- Sabu A, Kiram S, Parday A.** Purification and characterization of tannin-acyl-hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Biores. Technol.* 2004, 96 (11): 1223-8.
- Sadzuka Y, Sugiyama T, Shimoi K, Kinae N, Hirota S.** Protective effect of flavonoids on doxorubicin induced radiotoxicity. *Toxicoll. Lett.* 1997, 92(1): 1-7.
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC.** Introduction to food- and airborne fungi. 7^e Ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2004, 321-330.
- Sarni-Manchado P, Cheynier V.** Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec & Doc), Paris, 2006, 300-398.
- Sasaki K, Takahashi T.** A flavonoid from *Brassica rapa* flower as the UV-absorbing nectar guide. *Phytochem.* 2002, 61 (3): 339-43.
- Schiestl FP, Ayasse M, Paulus HF, Löfstedt C, Hansson BS, Ibarra F, Francke W.** Sex pheromone mimicry in the early spider orchid (*Ophrys sphegodes*): patterns of hydrocarbons as the key mechanism for pollination by sexual deception. *J. Comp. Physiol. Sensory Neural Behav. Physiol.* 2000, 186 (6): 567-74.
- Seeram NP, Henning SM, Zhang Y, Suchard M, Li Z, Heber D.** Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *J. Nutr.* 2006, 136 (10): 2481-5.
- Seigler DS, Seilheimer S., Keesy J, Huang HF.** Tannins from four common *Acacia* species of Texas and northeastern Mexico. *Econ. Bot.* 1986, 40 (2): 220-32.
- Sharaf M, El-Ansari MA, Saleh NAM.** Flavone glycosides from *Mentha longifolia*. *Fitoterapia* 1999, 70 (5): 478-83.
- Sharma S, That TK, Dawra KR.** Spectrophotometric method for assay of tannase using rhodanine. *Anal. Biochem.* 2000, 279 (1): 85-9.
- Siess MH, Le Bon AM, Lavier C.** Mechanisms involved in the chemoprevention of flavonoids. *Biofactors* 2000, 12 (1-4): 193-9.
- Simonetti G, Simonetti N, Villa A.** Increased microbicidal activity of green tea (*Camellia sinensis*) in combination with butylated hydroxyanisole. *J. Chemother.* 2000, 16 (2): 122-7.
- Slavica B, Ilic SSK, B. Zoran BT.** Flavonoids from flower of *Linum capitatum* kit. *Phys. Chem. Technol.* 2004, 3: 67-71.
- Spedding G, Ratty A, Middleton E.** Inhibition of reverse transcriptases by flavonoids. *Antiviral Res.* 1989, 12 (2): 99-110.
- Srivastava RC, Husain MM, Hasan SK, Athar M.** Green tea polyphenols and tannic acid act as potent inhibitors of phorbol ester-induced nitric oxide generation in rat hepatocytes independent of their antioxidant properties. *Cancer Lett.* 2000, 153 (1-2): 1-5
- Suseela Rajakumar G, Nandy SC.** Isolation, purification, and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl. Envir. Microbiol.* 1983, 46 (2): 525-52.
- Tervino J, Ortiz L, Centeno C.** Effect of tannins from faba beans (*Vicia faba*) on the digestion of starch by growing chicks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1992, 37 (3-4): 345-9.
- Tinkilic N, Uyanik A.** Spectrophotometric determination of the tannin content of various Turkish black tea, beer and wine samples. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 2001, 52 (3), 288-94.

- Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M.** Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.* 2009, 80 (11): 1799-808.
- Tschan GM, Koenig GM, Wright AD, Sticher O.** Chamaemeloside (I), a New Flavonoid Glycoside from *Chamaemelum nobile*. *Phytochem.* 1996, 41 (2): 643-6.
- Treviño L, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN.** Effects of polyurethane matrices on fungal tannase and gallic acid production under solid state culture. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2007, 8 (10): 771-6.
- Ulanowska K, Traczyk A, Konopa G, Wegrzym G.** Differential antibacterial activity of genistein arising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial strains. *Arch. Microbiol.* 2006, 184 (5): 271-8.
- Van de Lagemaat J, Pyle DL.** Solid-state fermentation: A continuous process for fungal tannase production. *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 87 (7): 924-9.
- Vasta V, Makkar HPS, Mele M, Priolo A.** Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *Brit. J. Nutr.* 2009, 102 (1): 82-92.
- Wagner H, Bladt S.** *Plants drug analysis: A thin layer chromatography Atlas.* 2^e Ed. Springer, Berlin, New York, 1996, 77-96.
- Wilson A.** Flavonoids pigments in chalkhill blue (*Lysandra coridonpoda*) and other lycaenid butterflies. *J. Chem. Ecol.* 1987, 13 (3): 473-493.
- Yamanaka N, Samu O, Nagao S.** Green tea catechins such as (-) epicatechin and (-) epigallocatechin accelerate Cu⁺² induced low density lipoprotein oxidation in propagation phase. *FEBS Lett.* 1996, 401: 230-4.
- Yao K, Zhang L, Zhang Y, Ye P, Zhu N.** The flavonoid, fisetin, inhibits UV radiation-induced oxidative stress and the activation of NF-kappaB and MAPK signaling in human lens epithelial cells. *Mol. Vis.* 2008, 14: 1865-71.
- Yi-Cai FU, Xi-Peng JIN, Shao-Min WEI, Hui-Feng LIN, Sam K.** Ultraviolet radiation and reactive oxygen generation as inducers of keratinocyte apoptosis : Protective role of tea polyphenols. *J. Toxicol. Environ. Health* 2000, 61 (3): 177-88.
- Yu H, Xu LX.** Separation and determination of flavonols in the flowers of *Carthamus tinctorius* by RP-HPLC. *Yao Xue Xue Bao.* 1997, 32 (2): 120-2.
- Zduńczyk Z, Juśkiewicz J, Wróblewska M, Flis M.** Effect of faba bean seeds with different content of proanthocyanidins on growth of rats, caecal enzyme activity and metabolism indices. *Acta Aliment.* 2003, 32 (2): 161-8.
- Zhang WY.** Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism *Int. Immunopharmacol.* 2005, 5 (7-8): 1247-57.
- Zhang XY, Tanaka T, Betsumiya Y, Kusano R.** Association of tannins and related polyphenols with the peptide gramicidins. *Chem. Pharm. Bull.* 2002, 50 (2): 258-62.
- Zimmer Z, Cordesse R.** Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *Prod. Anim.* 1996, 9 (3): 167-79.

Les sites :

Site A : <http://www.hubtesting.net/>

Site B : <http://www.schimmel-schimmelpilze.de/penicillium-variable.html>

Site C: <http://www.flickr.com/photos/ajc1/5041855028/>

Annexe : Glossaire De Mycologie.

Arthrospores ou arthroconidies : sont des cellules de reproduction formées par fragmentation du thalle en éléments unicellulaires.

Blastospores : cellules de reproduction asexuée formées par bourgeonnement des hyphes.

Chaînette de conidies : se dit du regroupement en chaîne des conidies. Ces dernières étant produites par une phialide collées les unes sous les autres et provenant d'un même pore.

Chlamydospores : formes de résistance assez fréquente chez les champignons. Elles sont constituées d'hyphes différenciées où le cytoplasme s'est condensé en matières lipidiques et s'est entouré d'une paroi épaisse et mélanisée. Elles peuvent être terminales (à l'extrémité du mycélium) ou intercalaires (entre les hyphes constitutives du mycélium).

Columelle : structure en forme de petite vésicule centrale du sporocyste. Elle sépare le contenu de ce dernier et se place exactement au sommet du conidiophore.

Conidies : cellules de reproduction existant chez un mycète asexué (deutéromycète) et ayant comme rôle la dissémination de l'espèce.

Conidiogénèse : mode de production des conidies à partir d'un élément préexistant.

Conidiophore : est un filament de structure simple ou ramifiée, situé entre l'hyphe végétative et les cellules conidiogènes (sporocystes, pénicilles, phialides, métules ...).

Exsudat : matière liquide secrétée par suintement sur les parties aériennes du mycélium.

Fusiforme ou fusioïde : en fuseau et aux extrémités pointues. Se dit des conidies du genre *Fusarium* qui ont cette caractéristique morphologique (et d'où le nom du genre).

Hyphe : est l'élément structural de base du filament fongique : une cellule végétative du mycélium.

Macroconidies : sont les conidies les plus grosses, souvent cloisonnées et donc formées au minimum par deux conidies. On distingue deux types :

☞ Les macroconidies produites dans le mycélium aérien, de forme et de taille hétérogènes.

☞ Les macroconidies produites par des sporodochiums (fructifications composées de conidiophores courts et agglomérés chez les Deutéromycètes), de taille et de forme homogènes.

Ces cellules sont souvent de forme typique de l'espèce, principalement chez le genre *Fusarium*.

Métules : sont les cellules qui précèdent les phialides dans certaines fructifications. Dans ce cas la les métules produisent les phialides par mitose.

Microconidies : représentent les conidies les plus petites. Elles peuvent être cloisonnées ou non, mais dans les deux cas leur taille reste inférieure à celle des macroconidies.

Les termes de microconidies et macroconidies sont utilisés dans le cas où deux formes conidiennes coexistent chez un deutéromycète.

Pénicille : représente le sporocyste du genre *Penicillium*. Il apparaît sous forme de pinceau : c'est-à-dire des cellules attachées en faisceaux. Ces cellules sont :

- ☞ Des phialides porteuses de conidies et insérées sur un verticille. On parle de pénicilles monoverticillés.
- ☞ Des phialides porteuses de conidies et insérées sur des métules. Ces dernières sont elles même portées par deux ou trois ou quatre verticilles ou plus. On parle de pénicilles biverticillés, triverticillés, quadriverticillés Etc.

Phialides : sont les cellules mère produisant des conidies de façon entéroblastique (par bourgeonnement à l'apex, donc par voie asexuée) sans allongement lors des conidiogénèses successives. Elles sont de diverses formes (ampulliformes, lancéolées, globuleuses), solitaires ou regroupées.

Sclérotés : sont sous formes de masses mycéliennes compactes, souvent très dures, considérés comme des organes de conservation de l'espèce.

Sporocyste : est une vésicule ou un sac qui se place sur le conidiophore. Il peut produire des spores ou des conidies à l'intérieur par méiose ou mitose respectivement, comme chez *Mucor* ; ou peut juste les porter à l'extérieur comme chez *Aspergillus*, dans ce cas là nous avons deux types :

- ☞ Sporocyste unisérielé : surmonté de phialides et de conidies.
- ☞ Sporocyste bisérielé : surmonté de métules, puis de phialides et de conidies.

Thalle ou mycélium : appareil végétatif des végétaux inférieurs, où l'on ne peut distinguer ni racine, ni tige, ni feuilles.

Tête aspergillaire : est la partie reproductive du genre *Aspergillus*. Elle est formée par le conidiophore, le sporocyste, la columelle, les phialides et les conidies en chaînettes. Selon les espèces, les métules peuvent être présentes ou absentes. La tête aspergillaire est reconnue par sa forme en « épingle à cheveux ».

Verticille : terme utilisé principalement chez le genre *Penicillium*. Il désigne l'élément de base de la structure du conidiophore. Les verticilles sont des cellules identiques insérées à un seul point du mycélium.

Etude Analytique Et Biologique Des Flavonoïdes Naturels.

Résumé :

Les polyphénols sont des métabolites végétaux produits lors du métabolisme secondaire.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés particulièrement aux flavonoïdes et aux tannins condensés. Nous avons commencé par préparer des extraits méthanoliques et éthanoliques de plusieurs plantes ; nous avons testé *in vitro* leurs activités antimicrobienne, antioxydante et cytotoxique ; puis nous avons réalisé un screening phytochimique. Pour les extraits éthanoliques qui se sont avérés riches en flavonoïdes, nous avons identifié les principales molécules présentes, testé sur elles les trois activités précédemment citées, testé leur activité antimicrobienne *in vivo* contre *Streptococcus pneumoniae*, puis mesuré leur toxicité aigue.

Dans une dernière partie, nous avons extrait et dosé les tannins condensés de *Camellia sinensis* et de *Vicia faba L. seville*. Puis nous avons isolé à partir du sol différentes moisissures afin de sélectionner celles capables de dégrader ces macromolécules.

D'après les résultats obtenus, les extraits méthanoliques avaient les activités antimicrobienne, antioxydante et cytotoxique les plus importantes. De même, leur screening phytochimique a révélé qu'ils étaient riches en métabolites secondaires. Les extraits éthanoliques contenaient principalement des flavonoïdes. Parmi eux, les flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* ainsi que la flavone extraite de *Mentha longifolia* avaient une grande activité antimicrobienne *in vitro* et *in vivo*; les flavones aglycones de *Carthamus tinctorius* et *Linum capitatum* ainsi que les molécules citées auparavant une grande activité antioxydante. Les flavonols aglycones extraites de *Carthamus tinctorius* et *Artemisa absinthium* avaient aussi une grande activité cytotoxique. De plus, toutes les molécules citées avaient des DL₀ et DL₅₀ intéressantes.

Vicia faba L. seville et *Camellia sinensis* contenaient principalement des procyanidines oligomériques et polymériques respectivement. Parmi les moisissures isolées, seules six espèces étaient capables de les dégrader. *Aspergillus niger* et *Aspergillus awamori* étaient les meilleures productrices de tannase avec des activités enzymatiques de 20 U /ml et 21,4 U /ml respectivement.

Mots clés : Plantes, extraits, flavonoïdes, antimicrobiens, antioxydants, cytotoxiques, toxicité aigue, tannins condensés, moisissures, tannase.

Analytical And Biological Study Of Natural Flavonoids.

Abstract:

Polyphenols are vegetable compounds produced during the secondary metabolism.

In this study, we were particularly interested in the flavonoids and condensed tannins. We have started by preparing the methanolic and ethanolic extracts of several plants; testing their *in vitro* antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities; then realizing their phytochemical screening. For the ethanolic extracts which were revealed rich in flavonoids, we have identified the main present molecules, tested on them the mentioned activities, tested their *in vivo* antimicrobial activity against *Streptococcus pneumoniae*, then we have measured their acute toxicity.

In the last part, we have extracted and dosed the condensed tannins of *Camellia sinensis* and *Vicia faba L. seville*. Then, we have isolated different soil moistures in order to select the species able to degrade these macromolecules.

The results showed that the methanolic extracts had the most important antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. Also, their phytochemical screening revealed that they were rich in secondary metabolites. The ethanolic extracts contained mainly flavonoids. Among them, the aglycon flavonols extracted from *Carthamus tinctorius* and *Artemisa absinthium* and the flavone extracted from *Mentha longifolia* had a big *in vitro* and *in vivo* antimicrobial activity; the aglycon flavones of *Carthamus tinctorius* and *Linum capitatum* and the mentioned molecules a big antioxidant activity; and flavonols extracted from *Carthamus tinctorius* and *Artemisa absinthium* had a big cytotoxic one. All the mentioned molecules had also an interesting LD₀ and LD₅₀.

Vicia faba L. seville and *Camellia sinensis* contained mainly and respectively oligomeric and polymeric procyanidins. Among the isolated moistures, only six species were able to degrade these tannins. *Aspergillus niger* and *Aspergillus awamori* were the best tannase producers with an enzymatic activities of 20 U /ml and 21,4 U /ml respectively.

Keywords: Plants, extracts, flavonoids, antimicrobials, antioxidants, cytotoxics, acute toxicity, condensed tannins, moistures, tannase.

دراسة تحليلية وبيولوجية للفلافونويدات الطبيعية

الملخص :

تعتبر عديدات الفينول من النواتج الثانوية في ميتابولزم النباتات . و قد أهتم في هذه الدراسة بصورة خاصة بالفلافونيدات و كذلك بالتينات المتكاثفة ، حيث كانت البداية بتحضير المستخلصات الميثانولية و الإيثانولية للعديد من النباتات ، وقد أجريت الإختبارات *in vitro* لدراسة النشاط المضاد للميكروبات و النشاط المضاد للأكسدة وكذلك نشاط التسمم الخلوي .

لقد أظهرت التحاليل والفصل الكيميائي للمستخلصات النباتية أنها غنية بالفلافونيدات ، وقد تم معرفة المركب الأساسي الذي أختبرت فعاليته من خلال الأنشطة المذكورة سابقا ، و تمت دراسة وإختبار النشاط المضاد للميكروبات *in vivo* ضد البكتريا *Streptococcus pneumoniae*، كما تمت دراسة وقياس سميتها الحادة .

أجريت الدراسة التي تم فيها استخلاص وتنقية ومعايرة التينات المتكاثفة لكل من النباتات التالية.

Camellia sinensis و *Vicia faba L. seville* . ثم تم عزل بعض فطريات التربة لإختبار الفطر القادر على حل وهدم هذه الجزيئات الكبيرة ، وأظهرت النتائج المتحصل عليها أن المستخلصات الميثانولية تمتلك نشاط عال كمضادات للميكروبات و الأكسدة وكذلك التسمم الخلوي ، كما أظهرت التحاليل الكيميائية أن هذه المستخلصات كانت غنية بالنواتج الميتابولزمية الثانوية. و أن المستخلصات الإيثانولية تحتوي أساسا على فلافونولات مستخلصة من *Carthamus tinctorius* و *Artemisa absinthium* و فلافونات مستخلصة من *Mentha longifolia* التي أظهرت نشاطا عاليا كمضادات الميكروبات *in vitro* و *in vivo*

كما وجد أن كل من الفلافونات مستخلصة من *Carthamus tinctorius* و *Linum capitatum* تمتلك خاصية النشاط المضاد للأكسدة و أن على فلافونولات مستخلصة من *Carthamus tinctorius* و *Artemisa absinthium* يبدي نشاط عال من خلال التسمم الخلوي ، و أن جميع هذه المركبات تمتلك DL_0 و DL_{50} مهمة.

إن كل من *Vicia faba L. seville* و *Camellia sinensis* تحتوي أساسا على مركبات Procyanidines وهي جزيئات أحادية و عديدات الوحدات ، كما وجد ان من بين الفطريات المعزولة من التربة كانت ستة أنواع فقط قادرة على تحليل وهدم مثل هذه المركبات ، وأن الجنسين *Aspergillus niger* و *Aspergillus awamori* كانا الأكثر إنتاجا لإنزيم Tannase حيث قدر النشاط الإنزيمي لهما بـ 20 وحدة/مل ، 21.4 وحدة / مل على التوالي.

الكلمات المفاتيح : النباتات، المستخلصات، المضاد للميكروبات، المضاد للأكسدة، التسمم الخلوي، التسمم

الحاد، الفطريات، Tannase ، التينات المتكاثفة.