

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri-Constantine
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biochimie- Microbiologie

N° d'ordre :.....

N° de série :.....

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

Microbiologie Appliquée

Option : Biotechnologies microbiennes

Présenté par :

Melle LAHLAH Fatima Zohra

Thème

**EXTRACTION DES FLAVONOIDES PAR LE BUTANOL ET LE
CHLOROFORME A PARTIR DE *SILYBUM marianum* ET ETUDE DE LEUR
ACTIVITE ANTIMICROBIENNE**

Devant le jury :

Soutenu le :

Président Mr BOUSSEBOUA Hacene Professeur, Univ.Mentouri Constantine

Rapporteur Mme MECHAKRA Aicha Maître de Conférences, Univ.Mentouri
Constantine

Examinatrices Mme MERAIHI Zahia Professeur, Univ.Mentouri Constantine
Mme DJEGHRI Baida Maître de Conférences, Univ. Badji
Mokhtar, Annaba

Année Universitaire 2007/2008

Remerciements

Avant tout, je remercie DIEU, sans lui ce manuscrit n'aurait pu exister.

*Je tiens à remercier **Mme Mechakra Aicha**, Maître de conférences à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université MENTOURI Constantine, qui a bien voulu m'encadrer, je la remercie pour toute l'aide scientifique et technique qu'elle m'a apportée au cours de la réalisation de ce travail.*

*Je remercie également **Mr Bousseboua Hacene**, professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université Mentouri- Constantine pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.*

*Je remercie de tout cœur **Mesdames Meraihi Zahia**, professeur à l'Université Mentouri de Constantine et **Djeghri Baida**, Maître de conférence à l'Université Badji Mokhtar Annaba qui ont bien voulu examiner ce travail.*

*Je remercie **Mme Kaabouche Z**, professeur à la faculté des Sciences exacte à l'Université Mentourie de Constantine pour l'aide matérielle qu'elle m'a apportée.*

Mes plus vifs remerciements à toutes mes amies de la promotion pour leur soutien moral tout au long de ces années mémorables.

Je remercie également, toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à

La mémoire de mon père

A ma chère mère

A mes frères

Toutes mes soeurs

A mes oncles et mes tantes

Ainsi qu'à mes cousins et mes cousines

A mes amies et à toute ma famille.

Liste des abréviations

- A.T.C C American type culture collection.
- M S Matière sèche.
- M.O Microorganisme
- Nb Nombre
- C M I Concentration minimale Inhibitrice.
- CMB Concentration minimale bactéricide.
- C I Chromatographie Ionique.
- C C M Chromatographie sur couche mince.
- d Densité.
- H P L C Chromatographie Liquide a haute performance.
- R F Rapport frontal.
- R.M.N Résonance magnétique nucléaire.
- S M Spectrométrie de masse.
- Sp Espèce.
- U V Ultra violet.
- U F C Unité formant une colonie.
- V/V Volume par volume.
- YPG Yeast Peptone Gelose

Introduction

Chapitre I : La plante : *Silybum marianum*

1. Historique	3
2. Description.....	5
3. Systématique de la plante	
3.1. Systématique.....	5
3.2. Caractères des feuilles et des graines.....	6
3.3. Noms vernaculaires.....	6
4. Cycle vital du chardon marie.....	7
5. Constituants chimiques des graines.....	7
6. Usages de la plante.....	9

Chapitre II : Les agents antimicrobiens

Introduction	10
1. Mode d'action des agents antimicrobiens	
1.1. Action germicide.....	10
1.2. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique).....	10
2. Facteurs influençant l'activité des antimicrobiens	
2.1. Nature et état du microorganisme.....	11
2.2. nature de l'agent antimicrobien	12

2.2. Rôle de l'environnement.....	12
3. Détermination de l'activité antimicrobienne	
3.1. Notion de germe test.....	12
3.2. Détermination des doses actives d'un antimicrobien.....	12
3.3. Méthode des porte-germes.....	12
3.4. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides.....	13
4. Types d'agents antimicrobiens	
4.1. Agents physiques.....	13
4.2. Agents chimiques.....	14
4.3. Agents chimiothérapeutiques.....	15
4.4. Les substances naturelles.....	15

Chapitre III : Les flavonoïdes

Introduction.....	16
1. Biosynthèse des flavonoïdes.....	18
2. Propriétés botaniques.....	18
3. Distribution et exemples de flavonoïdes.....	19
4. Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes	
4.1. Action anti-oxydante.....	20
4.2. Protection vasculaire.....	21
4.3. Flavonoides et ménopause.....	21
4.4. Effet contre le cancer.....	21
4.5. Action anti-inflammatoire.....	22
4.6. Action antidiabétique.....	22
4.7. Action anti-infectieuse.....	22
4.8. Effet sur la peau.....	23
5. Autres utilisations des flavonoïdes	
5.1. Edulcorant.....	23
5.2. Engrais.....	23

Chapitre IV : Méthodes d'étude des flavonoïdes

1. Méthode de séparation et de purification	
1.1. Extraction par solvant.....	24
1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	26
1.3. Chromatographie d'adsorption.....	26
2. Méthode d'analyses structurales.....	26

2.1. Facteur de retardement.....	27
2.2. La fluorescence.....	27
2.3. La spectrométrie UV- visible.....	28
2.4. La spectrométrie de masse (SM).....	28
2.5. La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (R.M.N).....	28

Chapitre V : Matériel et méthodes

1. Récolte de la plante.....	29
2. Extraction des flavonoïdes.....	30
2.1. Macération.....	30
2.1. Evaporation.....	30
2.3. Extraction par solvants.....	30
2.3.1. Affrontement à l'ether de pétrole.....	30
2.3.2. Affrontement au chloroforme.....	31
3. La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).....	31
4. Etude microbiologique	
4.1. Microorganismes tests.....	32
4.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques.....	32
4.3. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	33
5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB)	
5.1. En milieu solide.....	34
5.2. En milieu liquide.....	35
6. Thermostabilité des molécules bioactives (flavonoïdes).....	35

Chapitre VI : Résultats et discussion

1. Caractéristiques des échantillons (graines de <i>Silybum marianum</i>)	
1.1. Nombre des graines.....	37
1.2. Couleur des graines	37
2. Rendement massiques des extractions.....	38
3. Chromatographie des flavonoïdes par CCM.....	43
4. Détermination de l'activité antimicrobienne des différents extraits	
4.1. Activité antibactérienne.....	45

4.2. Activité antifongique.....	46
5. Détermination des CMI et des CMB	
5.1. Méthode de dilution en milieu solide.....	48
5.2. Méthode de dilution en milieu liquide.....	50
6. Etude de la thermostabilité des flavonoïdes de <i>Silybum marianum</i>	54
Conclusion et perspectives.....	56
Résumé.....	59
Annexe.....	66
Références bibliographiques.....	75

INTRODUCTION

Silybum marianum, appelé couramment chardon Marie est une plante annuelle ou bisannuelle appartenant à la famille des Asteraceae, endémique de la région méditerranéenne ; notamment en Algérie.

S. marianum est considéré comme une plante médicinale antique employée pour épurer et protéger le foie, pour traiter les troubles menstruels et les congestions du foie, de la vésicule biliaire et les reins, ainsi que pour stimuler la lactation et la protection des cellules hépatiques lors de la chimiothérapie anticancéreuse (Venkataraman et *al.*, 2000 ; Anderson et *al.*, 2002). Ce sont les Allemands qui, pour la première fois en 1968, ont isolé de la plante un groupe de flavonoïdes ayant un puissant pouvoir hépatoprotecteur ; la Silymarine.

Cette plante est également utilisée en Portugal pour la préparation des fromages traditionnels grâce à sa richesse en enzymes protéolytiques.

Par ailleurs, face à la l'augmentation du prix des agents antimicrobiens, plusieurs substituts sont recherchés dans les plantes et les herbes, notamment les substances phénoliques : tannins, alcaloïdes et flavonoïdes, (Alberto et *al.*, 2001 ; Alberto et *al.*, 2004). En effet, comme tous les polyphénols, les flavonoïdes sont reconnus pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anti-radicalaires, mais également antimicrobiennes.

Les activités biologiques multiples des flavonoïdes sur la santé humaine, a poussé les chercheurs à étudier les activités antimicrobiennes de ces substances extraites de nombreuses plantes; le chardon Marie est l'une de ces plantes.

L'objectif de cette étude vise à montrer la richesse de *S. marianum* en flavonoïdes et à tester leurs propriétés antimicrobiennes. Pour cela, le travail réalisé comporte plusieurs étapes:

- Une extraction des flavonoïdes qui consiste à solubiliser les substances actives par macération des graines broyées dans une solution hydro alcoolique.

- Une séparation par fractionnement liquide-liquide comprenant des affrontements par différents solvants organiques de polarités différentes, suivie d'une purification par chromatographie sur couche mince (CCM).

- Une mise en évidence de l'activité antimicrobienne des flavonoïdes réalisée par la méthode de diffusion sur gélose, détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB).

- Une étude de la stabilité des flavonoïdes à différentes températures.

SILYBUM MARIANUM

1. Historique

Silybum marianum ou le chardon marie est une plante annuelle ou bisannuelle robuste, de grande taille, appartenant à la famille des Astéracées ou composées, c'est le seul représentant connu du genre *Silybum* (Vincent, 2000), certains auteurs mentionnent cependant une seconde espèce, *Silybum eberneum* (Julve, 1998).

Le *Silybum* était déjà cité par Plinthe et Dioscoride dans son *materia medica* comme une plante médicinale du genre chardon (Vogel encyclopédie, 2007), le nom dérive du grec *Silybon* ou *Silybos* qui veut dire houppes (Vincent, 2000 ; Vogel encyclopédie, 2007). L'adjectif *marianum* vient du latin et est lié à la vierge Marie : une légende du moyen âge veut que celle-ci, voulant dissimuler son enfant Jésus aux soldats d'Hérode, l'a caché sous un grand chardon, comme elle était entrain de l'allaiter quelques gouttes de son lait

tombèrent sur les feuilles de la plante, qui se trouva ainsi maculée héréditairement (Vincent, 2000).

2. Description de la plante

Le chardon marie est facilement reconnaissable par ses grandes feuilles vertes, brillantes marbrées de blanc (Vogel encyclopédie, 2007) aux lobes découpés, aux bords dentés pourvus d'épines jaunes, à bord moins découpé, mais très épineux. Elles présentent toutes de nombreuses nervures blanches, donnant l'impression que la feuille est maculée de lait (Caremes, 1990) (**voir fig. 1a**).

Les tiges généralement ramifiées, atteignant environ 20 à 150 cm de haut, à leur extrémité portent des touffes bien fournies de fleurs tubulaires, ses capitules ont des bractées épineuses fortement recourbées en arrière ; Luper, 1998 ; Pepping,, 1999 ; Vogel encyclopédie, 2007) (**voir fig.1d**).



a- Les feuilles



b- La fleur



c- Les graines



d- Les tiges

Figure 1. Photographies représentant les différentes parties de la plante :
Silybum marianum (Vogel encyclopédie, 2007).

cm et se réfléchissant vers l'arrière. La corolle est dentée de couleur pourprée, cinq étamines formant un tube autour du style (Guignard, 1998 ; Bezanger, 1990 ; Michael, 2003) (**voir fig. 1b**).

Les fruits sont des Akènes luisantes, ovoïdes et obliques, de 6-7mm, de couleur beige ou brune ; ils sont entourés d'une coquille (Guittonneaire et Huon, 1983) et portent des aigrettes légèrement pendantes avec des poils soyeux et blancs (Vogel encyclopédie, 2007 ; Sindel, 1991). L'aigrette est denticulée en anneaux dur à leur base, chacun d'eux est inséré sur une sorte de disque d'apparence cornée et portant au centre une sorte de cylindre, court de 3 à 5 mamelons (Bezanger, 2003) (**voir fig. 1c**).

3. Systématique et caractères généraux de la plante

3.1. Systématique

Selon Anonyme, 1984 ; Guignard, 1998 et Spichiger *et al.*, 2000, la systématique du chardon-Marie est comme suit :

- Embranchement : Phanérogames.
- Sous-embranchement : Angiospermes.
- Classe : Magnoliopsida.
- Ordre : Asternales.
- Famille : Asteraceae.
- Sous-famille : Tubuliflores.
- Genre : *Silybum*.
- Espèce : *Silybum marianum* (L).

3.2. Caractères des feuilles et des graines

Les feuilles possèdent les caractères suivants.

- Type d'inflorescence : racème de capitules.
- Répartition des sexes : Hermaphrodites.
- Type de pollinisation : Entomogame.
- Période de floraison : mai à juin.

Le type de fruits correspond à des akènes (graines) et leur mode de dissémination est anémochore (Julve, 1998) ; elles permettent au chardon Marie de se reproduire. Les bourgeons non ouverts et entièrement formés de fleur produiront des graines attachées à la plante (Groves et Kaye, 1989).

3.3. Noms vernaculaires

Les noms vernaculaires français sont : chardon marie, artichaut sauvage, chardon argenté, chardon de notre Dame (Passeport santé.net, 2007), Silybum marial (Brouillet, 2002; AAC, 2004), Lait de notre dame, Silybe de marie, chardon marbré, épine blanche (Wiersema et léon, 1999 ; USDA, 2007).

Les noms étrangers sont : en allemand *Mriandistel*, en anglais *Blessed milk thistle*, en castillon *cardo lechoso*, en italien *cardo mariano (cardo di santa maria)* et en chinois *Shui Fei Ji* (Michael, 2003 ; Julve, 1998).

Ses noms vernaculaires targui ou berbère sont : *Tawra*, *Douj-n'ilour man* (Gharb et Bertrand, 1991 ; Belkhada, 1997). Sa nomenclature en Arabe est: *Chouk el Djemel*, *Bou-Zerwal ou Sùk Ez-zerwal*, *Bùzerwal*, *Hacoub* et *Lichilik* (Neger, 1961 ; Belkhada, 1997 ; Beloued, 1998).

4. Cycle vital du chardon marie

Le chardon marie est décrit comme une plante annuelle ou bisannuelle (Burnie, 1997 ; Vial, 1998). Il peut accomplir un cycle de vie annuel s'il peut germer assez tôt dans la saison de croissance. Les jeunes plantes en retard d'hiver et de printemps se comporteront en tant que plantes bisannuelles (Dodd, 1989).

Quelques températures froides sont exigées pour la production de fleurs. La plante a un potentiel de production de 33 capitules en moyenne, chaque tête de fleur produit environ 190 graines, avec une moyenne de 6350 graines par plante dont 94 % sont viables (Sindel, 1991). Les graines peuvent entrer en état de dormance, cependant n'importe quelle

longueur de dormance est affectée par la température et l'humidité (Dodd, 1989) ; elles restent viables pendant neuf années, ou plus (Sindel, 1991).

La croissance et l'allélopathie végétales fortes pendant la germination pourraient expliquer la forte densité du chardon marie (Gaby et *al.*, 1994).

Lorsque la plante meurt, elle peut rester sèche sur place pendant une longue période et maintient le secteur nu de l'autre végétation, permettant la croissance de la prochaine génération de chardon marie. Ces caractéristiques biologiques favorisent la croissance de chardon marie et sa dominance dans un champ (Sindel, 1991).

5. Constituants chimiques des graines

Les graines du chardon contiennent plusieurs composés chimiques ; des huiles essentielles, des protéines (albumine) qui représentent 25 à 30 %, des matières grasses avec prédominance d'acide linoléique et d'acide oléique en plus de l'acide palmitique (Widmer, 2001) ainsi que des flavonolignanes dont la fraction principale porte le nom de silymarine. Celle-ci représente 1 à 4 % ; c'est un mélange de trois flavonolignanes issus de la taxifoline (une flavonone) et de l'acide coniferilique, la Silybine, la Silychristine et la Silydianine. Il existe également d'autres flavonoïdes en faibles quantités tels que la quercétine, la taxifoline, le kaempferol, l'apigénine, la naringine, ériodyctiol, chrysoériol etc. Le fruit renferme également d'autres constituants tels les tocophérols, les stérols (cholestérol, campésterol, Stigmastérol, sitostérol) et le mucilage (Bruneton, 1999)

6. Usages de la plante

Les Grecs de l'antiquité connaissaient déjà les propriétés du chardon marie pour traiter les troubles hépatiques et biliaires. Celui-ci était recommandé dans le plus important traité de pharmacie du moyen âge, le « Kreutterbuck » de Mathiolus de 1626, contre les points de côté et la jaunisse et de Lowitzer (*Lonicereus*) de 1679, contre l'inflammation du foie (Vogel encyclopédie, 2007). Au XIX^e siècle, les médecins de l'école éclectique américaine l'ont employé pour traiter les varices, les troubles menstruels et les congestions du foie, de la vésicule biliaire et des reins (Flora, 1998 ; Susan *et al*, 2000).

De nos jours, le chardon marie se retrouve en Europe dans plusieurs préparations pharmaceutiques destinées au traitement de divers troubles hépatiques pour soulager les troubles de digestion associés au foie (Bradley, 2006 ; Blumenthal, 2003 ; Bradley, 2006 ; UK, 2006 ; Morazzoni et Bombardelli, 1995). Le Chardon marie est également appliqué en cas d'hépatites et hépatopathies latentes et de cirrhoses. Les meilleurs effets sont observés lors d'administrations prophylactiques où il protège la cellule hépatique lors des chimiothérapies anticancéreuses. Il agit également contre la dépression nerveuse et permet la stimulation de la lactation (Compos, 1989 ; Schandalik *et al.*, 1994 ; Venkataraman *et al.*, 2000).

Le chardon marie figure au nombre des compléments nutritionnels dont l'usage est répandu en Amérique du Nord où plusieurs personnes vivant avec la VIH (PVVIH) complètent leur traitement pharmaceutique à l'aide de plantes médicinales (Anderson et Fletcher, 2001 ; Anderson *et al.*, 2002).

Les ingrédients médicinaux actifs de *Silybum marianum*; les flavonoïdes, sont concentrés dans les graines (Combest, 1998). La Silymarine a un rôle dans la protection du foie contre les effets des toxines naturelles des champignons (Pietrangelo *et al.*, 1995 ; Foster, 1995 ; Ody, 2000), des morsures de serpents, de piqûres d'insectes, etc. (Anderson *et al.*, 2001 ; Anonyme, 2001) et des produits de synthèse (solvants, produits de nettoyage, médicaments, etc.) (Pizzorno *et al*, 1999 ; Ernest, 2001). Une étude de Polyak *et al* en (2007) montre l'effet anti-inflammatoire de la silymarine standardisée extraite du chardon-Marie en particulier par inhibition des cytokines des cellules-T et probablement une activité antivirale. Une revue bibliographique de Pradhan et Girish (2006) discute de la sécurité, l'efficacité et les utilisations futures de la silymarine dans les maladies du foie.

Celle-ci pourrait remplacer des formules composées de plusieurs plantes, ce qui réduirait les problèmes de standardisation et de contrôle de qualité.

Les agents antimicrobiens

Introduction

On désigne par agent antimicrobien tout agent chimique, physique ou biologique inhibant la croissance et/ou la survie des micro-organismes (Asada et *al.*, 1998). Ces substances ayant une affinité pour les cellules des parasites et le pouvoir de les tuer plus forts que les dommages qu'elles causent à l'organisme; ce qui rendra possible la destruction des parasites sans perturbation sérieuse de l'organisme (Perry et *al.*, 2002).

1. Mode d'action des agents antimicrobiens

Les agents antimicrobiens agissent par différents mécanismes et peuvent être utilisés de diverses manières, selon les objectifs recherchés et leur spécificité d'action qui peut être germicide ou germistatique.

1.1. Action germicide

Cette action caractérise les agents ayant une action létale sur les microorganismes. En fonction de la catégorie de microorganismes ciblés, les agents antimicrobiens exercent une action bactéricide (agent antibactérien), algicide (agent anti-algues), fongicide (agent anti-champignons), virucide (agent anti-virus) ou antiparasitaire (agent anti- protozoaires) (Bousseboua, 2006).

1.2. Action germistatique (bactériostatique et fongistatique)

Dans ce cas, les agents inhibent la croissance du microorganisme sans le tuer (bactérie ou champignon) (Bousseboua, 2006). Les substances bactériostatiques inhibent temporairement le développement microbien, les microorganismes recommenceront à se développer dès que la concentration de la substance aura diminué ou dès que l'application du procédé physique sera interrompue (Guiraud 1998)

2. Facteurs influençant l'activité des antimicrobiens

Plusieurs facteurs peuvent affecter l'activité d'un agent antimicrobien, modulant ainsi leur efficacité et même plus leur structure, parmi ces facteurs on peut citer la nature et l'état du microorganisme, la nature de l'agent antimicrobien et le rôle de l'environnement.

2.1. Nature et état du microorganisme

Les différences existants entre les espèces microbiennes entraînent une sensibilité variable à l'égard des agents antimicrobiens caractérisé chacun par son spectre d'activité plus ou moins large, et également par leur nature.

L'état physiologique de la cellule microbienne joue également un rôle crucial car les microorganismes sont plus sensibles en phase exponentielle qu'en phases stationnaire à l'égard des antimicrobiens chimiques, ce phénomène pouvant être inversés pour les agents physiques, alors que les formes sporulées sont beaucoup plus résistantes aux agents physiques ou chimiques que les formes végétatives correspondantes, en raison de l'apparition d'un composé nouveau, absent dans les cellules végétatives : l'Acide dipicolinique qui représente environ 10% du poids sec de l'endospore (Bousseboua, 2001).

Il existe une corrélation directe entre l'âge de la culture et le taux de destruction des cellules microbiennes, en fait plus la charge initiale en microorganismes est élevée, plus le temps nécessaire pour obtenir un niveau de destruction donnée sera grand (Guiraud, 1998).

2.2. Nature de l'agent antimicrobien

Les agents antimicrobiens diffèrent par leur efficacité et leur spectre d'activité. Dans le cas des agents physiques, l'activité microbicide augmente souvent avec la dose, alors que pour les agents chimiques, les effets seront d'abord bactériostatiques puis bactéricides. Cependant, l'activité de certains d'entre eux dépend de leur stabilité, pour d'autres elle est liée à leur décomposition ; c'est le cas par exemple de l'hypochlorite de sodium et peroxyde de l'hydrogène (Guiraud, 1998).

2.3. Rôle de l'environnement

La population à détruire ou à inhiber n'est pas isolée mais elle est soumise à des facteurs de l'environnement qui peuvent offrir une protection ou favoriser la destruction par exemple la chaleur tue plus facilement à pH acide. La nourriture et les boissons acides telles que les fruits et les tomates, sont plus facilement pasteurisées que les denrées alimentaires plus neutres comme le lait et les solutions huileuses (Prescott et *al.*, 2003).

3. Détermination de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée par plusieurs tests : « le germe-test » ; mesure des doses actives ; porte-germes ; doses minimales inhibitrices et bactéricides (CMI et CMB).

3.1. Notion de germe test

On utilise des microorganismes pathogènes "modèles" comme témoins d'efficacité d'un traitement: *Mycobacterium tuberculosis*, *Clostridium botilium*, parfois *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et parfois même des virus (virus de la poliomyélite) pour le traitement de l'eau, *Salmonella typhi* pour les désinfectants, *Staphylococcus aureus* pour les antiseptiques lors de la mesure du coefficient phénol, *Clostridium sporogenes* et *Bacillus stearothermophilus* pour la chaleur (Guiraud 1998).

3.2 Détermination des doses actives d'un agent antimicrobien

Il s'agit de comparer l'action d'un antiseptique avec celle du phénol en présence d'un germe test selon un protocole bien précis. Le coefficient phénol est égal au rapport entre la dilution du désinfectant et celle du phénol (Perry, 2002).

3.3. Méthode des porte-germes

Le porte-germes est constitué d'une bandelette de papier filtre. Il est immergé dans une culture d'un germe test, séché puis mis en contact avec le désinfectant pendant des durées croissantes. La survie ou la destruction du germe est mise en évidence par immersion du préalablement séché dans un bouillon nutritif et par essai de culture (Guiraud, 1998).

3.4. Détermination des doses minimales inhibitrices et bactéricides

La construction des courbes de croissance in vitro en présence de concentration croissante en agents antimicrobiens permet de définir des concentrations limites : c'est-à-dire la concentration pour laquelle on n'observe pas de croissance visible.

La concentration inhibitrice 50 % ou CMI correspond à une croissance égale à la moitié de la croissance du témoin et la concentration minimale bactéricide (la CMB) correspond à la concentration permettant de tuer tous les micro-organismes. Celle-ci est appréciée par étalement après culture. Ces méthodes sont adaptables aussi bien aux antibiotiques qu'à d'autres substances bactéricides (Perry, 2002).

4. Types d'agents antimicrobiens

Il existe trois types d'agents antimicrobiens : physiques, chimiques et chimiothérapeutiques.

4.1. Agents physiques

De nombreux agents physiques exercent un effet antagoniste vis-à-vis des microorganismes. La chaleur ou certains types de radiations ont une action létale qui permet leur emploi dans la stérilisation de différents milieux. D'autres agents moins agressifs, comme la dessiccation limitée sont utilisés à d'autres fins.

Les principaux agents physiques sont la chaleur (humide ou sèche), les radiations (micro-ondes, rayons ultra-violets, rayons gamma, rayons bêta, rayons alpha ; rayons X). Chaque type de radiation a une longueur d'onde spécifique qui détermine son énergie, son mécanisme d'action et son domaine d'application (Bousseboua 2001).

4.2. Agents chimiques

Ils correspondent aux substances utilisées comme désinfectants et antiseptiques. Les désinfectants sont des agents antimicrobiens utilisés sur les matériaux inertes ; leur action

est létale ou inhibitrice de la croissance microbienne. Les antiseptiques ont la même nature chimique que les désinfectants mais leur toxicité plus réduite permet leur emploi sur les

tissus vivants. Les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés sont les alcools, les composés phénoliques qui agissent par dénaturation des protéines et altération des membranes cellulaires, les aldéhydes, les halogènes et les détergents (Bousseboua 2001).

Les alcools sont les désinfectants et antiseptiques les plus largement employés, notamment comme désinfectants de la peau. Les composés phénoliques ont une utilisation avantageuse en raison de leur efficacité, de leur persistance dans le temps et de leur insensibilité relative à la présence de matière organique dans le milieu. L'aldéhyde de plus commun est le formaldéhyde, souvent commercialisé en solution à 40% (formol). Les halogènes sont des composés dérivés du chlore, du brome et de l'iode: hypochlorites et chloramines, hypobromites, iodures, qui ont une action bactéricide par l'oxydation dénaturante des protéines et d'autres composés cellulaires. Les détergents enfin, ont la propriété de solubiliser les résidus normalement peu solubles. Seuls les détergents cationiques sont des désinfectants efficaces (Guiraud, 1998).

4.3. Agents chimiothérapeutiques.

Un agent chimiothérapeutique est un composé chimique ou de synthèse qui inhibe le développement des microorganismes. Ce composé agit à faibles doses, il exerce une action très spécifique sur le fonctionnement cellulaire tout en ayant une toxicité sélective. Il inhibe le développement de sa cible ou la tue tout en étant inoffensif pour l'hôte. Dans ce groupe, on retrouve les antibiotiques, les antifongiques et les antiviraux (Guillaume, 2000).

Il existe actuellement deux grandes catégories d'agents chimiothérapeutiques antibactériens : les sulfamides et les antibiotiques ; ils ont des modes d'action comparables et se distinguent principalement par leur origine. Les sulfamides sont des produits de synthèse alors que la majorité des antibiotiques sont d'origine naturelle (les plus anciens) d'autres de synthèse ou d'hémisynthèse. Les agents chimiothérapeutiques comprennent cinq groupes selon qu'ils affectent la synthèse de la paroi, les échanges cellulaires, la réplication et la transcription de l'ADN, la synthèse des protéines ou certaines réactions du métabolisme intermédiaire (Prescott et *al.*, 1995).

Flavonoïdes

Introduction

Le terme *flavonoïde* provient du latin *flavus* signifiant *jaune*. La présence de flavonoïdes a été révélée dans le zeste du citron par les travaux du Hongrois Szent-Gyorgyi en 1936 et 1937 sur le scorbut. Avant lui, la première substance flavonoïde obtenue à l'état pur : le morin, a été isolée par Chevreul en 1814. Le terme "flavonoïde" provient du nom *flavedo* correspondant à la couche externe des écorces d'orange. Ce terme désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols (Gérard, 2004) qui sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, presque toujours hydrosolubles (Riberau-Gayon, 1968).

Les flavonoïdes sont répandus dans toutes les parties de la plante : racines, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois. Certains sont plus spécifiques de certains tissus ; les anthocyanes sont plutôt localisées dans la partie externe des fruits, des fleurs et les cellules épidermiques; les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales assurant ainsi la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements ultraviolets des fleurs. Les flavonoïdes sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées).

1. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont dérivés des phényles propanoïdes caractérisés par l'adjonction au noyau coumaryl en C6- C3 activé par le coenzyme A (Coumaryl – CoA), 3 acétyles (fournis par le malonyl – CoA) ; réaction suivie d'une cyclisation qui aboutit à une chalcone, la tetrahydroxy-chalcone ; l'enzyme est la chalcone synthase (CHS), les légumineuses possèdent en outre une chalcone réductase (CHR) qui co-agissent avec la CHS, peut aboutir à la trihydroxy chalcone (fig) (Heller et *al.*, 1998).

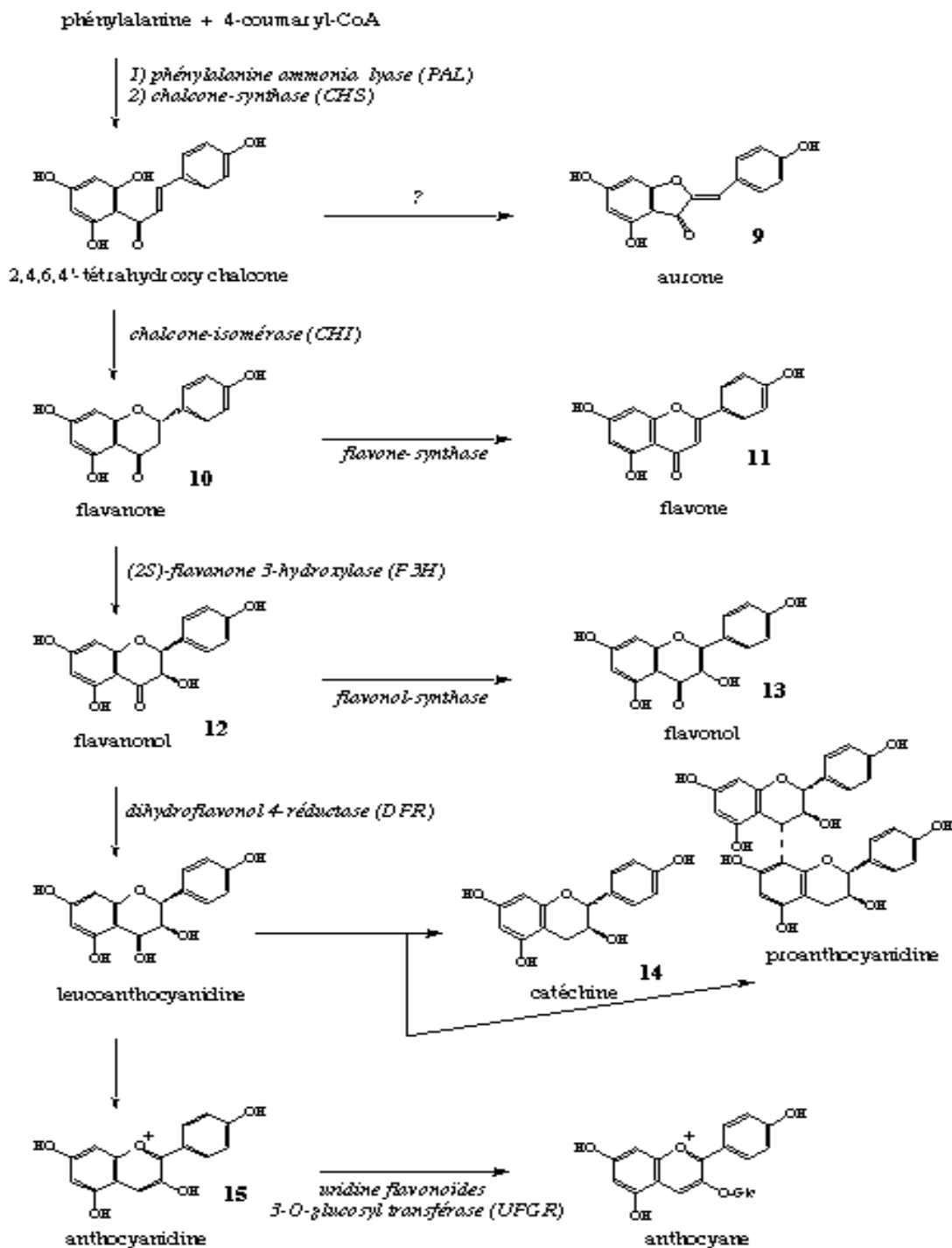


Figure 2.
Différentes réactions conduisant aux principales familles de flavonoïdes (www.Santé.com/flavo-perso.htm)

La chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse

des divers flavonoïdes, elle est en équilibre avec les flavonoïdes, cet équilibre étant contrôlé par une enzyme, la chalcone isomérase, conduisant à une cyclisation stéréospécifique du cycle donnant naissance aux flavanones (Bruneton, 1933). Les chalcones gardent la structure de tri ou tétra-stérols. Les flavonones dérivent des précédentes par une cyclisation du noyau central, conduisant à un hétérocycle, suite à une isomérisation par la chalcone isomérase (CHI) (Heller et al., 1998).

Les flavones, particulièrement abondantes chez les légumineuses (fabales) dérivent des flavanones par une oxydation qui introduit une seconde double liaison dans l'hétérocycle. Les flavonols se différencient des flavones par la présence d'un OH en C3. Les isoflavones dérivent aussi des flavanones, mais après une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C2 au C4 de l'hétérocycle (Heller et *al.*, 1998).

Les anthocyanes dérivent également des flavanones suite à une réduction par la flavone -3 hydroxylase (F₃H) en dihydrokaempférol (un dihydroxyflavonol) ; une deuxième réduction est opérée par une dihydroflavonol réductase (DFR) (Heller et *al.*, 1998)

2- Propriétés botaniques

Sur le plan cellulaire, les flavonoïdes sont synthétisés dans les chloroplastes, puis ils migrent et se dissolvent dans les vacuoles. Ils interviennent comme constituants des chromoplastes (Bruneton, 1933). La plante fabrique des flavonoïdes pour se protéger de l'oxydation et c'est le rayonnement solaire qui stimule cette réaction. Plus l'ensoleillement augmente, plus les teneurs en flavonoïdes augmentent, surtout dans les parties les plus exposées. Ils servent également à attirer l'attention des insectes pollinisateurs, ou au contraire à dessiner des formes pour éloigner les prédateurs, certains flavonoïdes sont mêmes toxiques pour les insectes ([www. Détour Santé.com/flavo-perso.htm](http://www.Détour Santé.com/flavo-perso.htm))

3 – Distribution et exemples de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont généralement présents chez les végétaux supérieurs, le plus souvent sous la forme d'hétérosides (liés à différents sucres). Ils ont pu être isolés des fougères (la cytomine) (Mazza, 2000), mais ils sont totalement absents des microorganismes comme les champignons et lichens (Ribireau-Gayon., 1968). Certaines classes de flavonoïdes sont présentes exclusivement dans certains végétaux; on retrouvera par exemple, les isoflavones dans le soja, les flavanones dans les agrumes, les anthocyanes dans les fruits rouges, les flavonols dans les choux, les brocolis et les oignons. Ces derniers, ont la particularité de se polymériser en composées qu'on appelle des tannins et qui sont présent dans le vin et le thé.

Les flavonoïdes sont largement représentés dans la classe des aurantiacées (les agrumes), mais également dans les rutacées (tomate, sarrasin), les oléacées (cyprès, frêne), les conifères (épicéa, sapin), les ginkgoacées (ginkgobiloba), les théacées (théiers et camélias) et les vitacées (raisin), ainsi que dans les fines herbes. C'est par contre à des concentrations variables, que les substances utilisées comme principes actifs sont présent dans ces familles de végétaux (Fleuriet et *al.*, 2005).

Les aliments les plus riches en flavonoïdes sont : le raisin, le thé, le cacao, l'oignon et les pommes. Les principaux flavonoïdes retrouvés dans le thé sont : la rubigine, la flavine et la catéchine, dont les propriétés antioxydantes sont 20 fois supérieures à celles de la vitamine C. L'artichaut est le seul dépositaire d'un groupe appelé Silymarine. Le soja est riche en isoflavones (génistéine et diazéine) (Heller, 1998). Quatre flavonols sont majoritairement présents chez le raisin: le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnétine. Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants, alors que la myricétine semble être spécifique aux variétés de raisins rouges. On retrouve également de fortes concentrations de flavonoïdes dans l'hamamélis (kaempférol, quercétine), le céleri (apioside), et dans le chocolat (catéchine) (Heller, 1998).

4- Propriétés thérapeutiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes possèdent plusieurs propriétés thérapeutiques, certaines établies depuis longtemps (2000 ans), par leurs propriétés nutritionnelles et thérapeutiques multiples, dans cette partie on va citer certaines actions de flavonoïdes.

4.1. Action antioxydante

Les antioxydants sont largement utilisés dans la prévention primaire et secondaire, les plus connus sont le β -carotène, l'acide ascorbique, le tocophérol, les tanins, les anthocyanes, les acides phénoliques, le lycopène et les polyphénols (Bjelakoyic et *al.*, 2007). Ils ont la capacité de piéger les radicaux libres générés par notre organisme en réponse aux agressions de l'environnement (cigarette, polluants, infectieux, etc.) qui favorisent le vieillissement cellulaire. Les antioxydants renforcent nos défenses naturelles en protégeant les constituants tissulaires. Un exemple de composés antioxydants est résumé dans le tableau n°1.

incluent les flavonoïdes.

La Silymarine, le composant majeur des flavonoïdes de *S. marianum* possède de puissantes propriétés anti radicalaires, empêchant ainsi certains produits toxiques de causer des lésions au foie (Ody, 2000). Elle est plusieurs fois plus puissante que la Vitamine E (Hikino et *al.*, 1984 ; Sarre, 1971).

Constituants	<u>Thé vert</u>	<u>Thé noir</u>
<u>Catéchines</u>	30 - 42	3 - 10
<u>Théaflavines</u>	0	2 - 6
<u>Polyphénols simples</u>	2	3
<u>Flavonols</u>	2	1
<u>Autres polyphénols</u>	6	23
<u>Théanine</u>	3	3
<u>Caféine</u>	3 - 6	3 - 6

Tableau 1 : Antioxydants du thé (M.S) (Bjelakovic et *al.*, 2007).

4.2. Protection vasculaire

Les flavonoïdes sont « veino-actif » c'est-à-dire ayant la capacité de diminuer la perméabilité des capillaires sanguins et de renforcer leur résistance ; une étude menée aux Pays Bas (l'étude Zutphen) a mis en évidence le fait que les personnes chez qui l'on a donné une dose importante de flavonoïdes sont moins exposées aux maladies cardiaques que les autres (Hertog et *al.*, 1995). Grâce à l'effet synergique des flavonoïdes, de nombreuses plantes sont maintenant classées dans la catégorie des protecteurs vasculaires (Rice et *al.*, 1996). C'est ainsi que l'on classe les flavonoïdes de raisins dans cette catégorie (Fleuriet et *al.*, 2005).

4.3. Flavonoïdes et ménopause

Les flavonoïdes ont également des effets protecteurs contre les maladies hormono-dépendantes. En effet, les isoflavones du soja par exemple, interagissent de manière spécifique avec les récepteurs des oestrogènes et inhibent les bouffées de chaleur chez la femme ménopausée, pour cela, ils sont maintenant considérés comme phyto-œstrogènes. La quercétine de l'oignon et le kaempferol de la chicorée, possèdent de leur côté des propriétés pseudo-oestrogéniques qui inhibent la perte osseuse chez la rate ovariectomisée. De nouvelles études restent cependant nécessaires pour valider ces effets sur l'être humain (Fleuriet et *al.*, 2005).

4.4. Effet contre le cancer

Les flavonoïdes ont pour effet d'inhiber l'activité d'une enzyme, la topoisomérase II, qui joue un rôle essentiel dans l'apparition du cancer, notamment la maladie de Hodgkin. Ils ont largement montré leurs effets protecteurs contre plusieurs cancers, dont la prostate, le colon et le poumon (Rice et *al.*, 1996).

Par ailleurs, la Silymarine, fraction principale des flavonoïdes de *Silybum marianum*, a la capacité de bloquer la fibrose, un processus qui contribue au développement de la cirrhose chez des personnes ayant une inflammation du foie consécutive à une maladie, à un abus d'alcool ou à une hépatite et favorise l'écoulement de la bile (Ferenci et *al.*, 1989; Alarcon, 1995). Les flavonoïdes de raisins permettent la prévention et le traitement des cancers; ils ont également des activités anti-tumorales et chimiopréventives ([www. Détour. Santé.flavonoïdes.htm](http://www.Détour.Santé.flavonoïdes.htm))

4.5. Action anti-inflammatoire

Des recherches récentes ont démontré que les flavonoïdes, notamment les flavonols du cacao, peuvent prévenir la douleur musculaire en accélérant la réparation des tissus au niveau moléculaire. De manière spécifique, ils éliminent la synthèse de l'oxyde nitrique, déclencheur chimique de l'inflammation. Il a été également démontré que d'autres flavonoïdes inhibaient la sécrétion des mastocytes impliqués dans les phénomènes inflammatoires (Fleuriet et *al.*, 2005), cette activité concerne de nombreux composés phénoliques et en premier lieu l'acide salicylique sous sa forme acétylé (acétyl salicylique) commercialisée sous le nom d'aspirine. Ainsi que certaines anthocyanes, la cyanidine extraits de cerises, les flavonoïdes des agrumes (Manthey, 2000).

4.6. Action antidiabétique

En raison de ses propriétés antioxydantes et de son long passé d'utilisation dans le traitement des désordres hépatiques, la Silymarine est utilisée pour décliné la glycémie chez des diabétiques. Une équipe de chercheurs de l'hôpital Oronfalcone à Gorizia en Italie a traité 60 patients diabétiques quotidiennement pendant 12 mois avec 600 mg de Silymarine ou un placebo (Anonyme, 1997).

D'autres études cliniques ont montré également l'efficacité de la Silymarine dans la régulation de la glycémie sanguine, qui descend d'une moyenne de 190 mg/dl à 174 mg/dl. Bien qu'une telle diminution des niveaux sanguins de sucre puisse augmenter le risque d'hypoglycémie. Les patients traités par la Silymarine n'ont pas eu d'augmentation du nombre d'épisodes légers ou sévères d'hypoglycémie, suggérant que la Silymarine stabilise la glycémie en même temps qu'elle la diminue (Nutranews, 2003).

4.7. Action anti-infectieuse

Les flavonoïdes accélèrent le processus de destruction des agents pathogènes en améliorant la capacité des macrophages à les neutraliser. La transformation des macrophages en antigène est donc plus rapide et les lymphocytes-T peuvent intervenir avec plus d'efficacité (Fleuriet et *al.*, 2005).

4.8. Effet sur la peau

Des composés extraits de myrtilles ou des épinards amélioreraient la signalisation des messages nerveux et pourraient ralentir le processus de vieillissement (Rice et *al.*, 1996 ; Martini, 2006), les polyphénols participent à la lutte contre le vieillissement cutané en tant que molécules antiradicalaires ou en tant que protecteurs de protéines de dégradation des protéines de structure de la peau comme l'élastine et le collagène (Closs, 2002). Par ailleurs, une étude préliminaire sur l'utilisation d'extraits de plantes comme filtres UV a démontré que l'incorporation de flavonoïdes à une solution à 2% de filtre solaire synthétique, augmente sensiblement l'indice de protection de celui-ci (Ramos et *al.*, 1996).

5. Autres utilisations de flavonoïdes

5.1. Edulcorant

Un puissant édulcorant, la néohesperidine dihydrochalcone (E958) est utilisé en alimentation pour les boissons non alcoolisées. Cet édulcorant est synthétisé à partir d'un

flavonoïde particulier : la néohéspéridoside (molécule naturelle amère).(www. Détour. Santé.flavonoides.htm).

5.2. Engrais

Le généticien Don Smith a associé les flavonoïdes à un cocktail de bactéries fixatrices d'azote. Le résultat a été concluant : la récolte a augmenté d'au moins 10%.) (www. Détour. Santé.flavonoides.htm).

Méthodes d'étude des flavonoïdes

1. Méthodes de séparation et de purification

Les méthodes les plus utilisées pour la séparation et la purification des flavonoïdes sont l'extraction par les solvants, la C.C.M. et la chromatographie de partage.

1.1. Extraction par solvant

L'extraction par solvant consiste à séparer les constituants d'un mélange à l'aide d'un solvant volatil (éthanol , hexane) qui ne se mélange pas avec l'eau. Le solvant se charge des molécules à extraire grâce à sa forte affinité avec elles. On sépare ensuite le solvant et l'eau dans une ampoule à décanter. Pour récupérer les molécules, on élimine ensuite le solvant par évaporation (Audigié, 1995 ; Kamoun, 1975).

La solubilité des flavonoïdes dans les solvants dépend généralement de leur nature, les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools, alors qu'un nombre d'entre eux sont faiblement hydrosolubles (rutoside, hespérideside). Les génines sont pour la plupart solubles dans les solvants organiques apolaire, lorsqu'elles ont au moins un groupe phénolique libre se dissolvent dans les solutions d'hydroxydes alcalins les lipides et la chlorophylle sont éliminés par l'éther de pétrole.

Les flavonoïdes lipophiles des tissus superficiels des feuilles (ou des frondes) sont directement extraits par des solvants moyennement polaires comme le dichlorométhane (chloroforme), (Ribereau -Gayon, 1968), les hétérosides sont extraits le plus souvent à chaud avec de l'acétone ou d'autres alcools (Ethanol, Méthanol) additionnés d'eau (20 à 25 pour cent).

Une extraction par des solvants de polarité croissante tels le chloroforme qui permet l'extraction des aglycones méthoxylés et peu hydroxylés, l'acétate d'éthyle pour extraire les aglycones poly hydroxylés, le n- butanol qui accède aux hétérosides polyglycosylés et aussi les hétérosides de type c-glycosyl (Ribereau-Gayon, 1968).

1.2. La chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie de manière générale est une méthode physique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile (Audigié, 1995 ; Edith et *al.*, 1998). Selon la technique mise en jeu, la séparation des composants entraînés par la phase mobile, résulte soit de leur adsorption et de leur désorption successive sur la phase stationnaire, soit de leur solubilité différentes dans chaque phase (Edith et *al.*, 1998).

La C.C.M. est une chromatographie de partage ; elle est basée sur la différence de solubilité des substances à séparer dans deux fluides parfaitement miscibles (René, 2002). Le facteur principal qui intervient est le coefficient de partage entre chaque phase. Les substances les plus solubles dans la phase mobile se déplacent plus facilement que celles qui le sont moins (Audigié, 1995).

La C.C.M. est une technique d'analyse très utile et simple à mettre en œuvre, on l'utilise en général pour suivre l'avancement d'une réaction, pour connaître la composition d'une fraction séparée sur colonne ou pour visualiser la pureté d'un produit (Edith et *al.*, 1998). Les adsorbants les plus employés sont par ordre d'importance décroissante: le gel de silice, le kieselguhr et la cellulose.

L'éluant est formé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvants. Un éluant qui entraîne tous les composants de l'échantillon est trop polaire, celui qui empêche leur migration ne l'est pas suffisamment.

Le choix de l'éluant dépend des composés à séparer :

- Pour les hydrocarbures : hexanes, éther de pétrole ou benzène.
- Pour les groupements fonctionnels courants : hexane ou éther de pétrole mélangé en proportions variables avec du benzène ou de l'éther diéthylique forment un éluant de polarité moyenne.
- Pour les composés polaires : ethanoate de l'éthyle, propanone ou méthanol.

1.3. Chromatographie d'adsorption

Son principe est essentiellement différent, en ce sens que l'on commence par former le chromatogramme par dépôt au sommet de la colonne d'un petit volume de la solution initiale, mais que l'on développe ensuite le chromatogramme par dépôt au sommet de la colonne d'un petit volume de la solution initiale, mais que l'on développe ensuite le chromatogramme au moyen d'une solution d'un corps plus fortement adsorbé que ne l'est aucun des constituants du mélange. Généralement utilisée pour la séparation des colorants, des protéines, des alcaloïdes etc. (Loiseleur, 1963 ; Audigié, 1995).

2. Méthodes d'analyses structurales

Plusieurs méthodes sont appliquées pour l'étude structurale des flavonoïdes, ce sont le facteur de retardement (le Rf) dans les systèmes de solvants connus, la fluorescence du produit en question permettent d'avoir une première approche structurale qui facilitera énormément l'identification, puis par ordre d'utilisation, la spectrophotométrie UV-visible, la spectrométrie de masse et la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) (Fleuriet et al., 2005).

2.1. Facteur de retardement

Le rapport frontal (Rf) est défini comme étant le rapport de la distance entre la tache du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part. Il est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant déterminé (organique ou aqueux) sur un support qui constitue "la phase stationnaire" (gel de silice, polyamide, cellulose). La valeur du rapport frontal Rf varie avec le type de squelette flavonique (aglycone ou glycoxyde) ainsi que la dispersion de ses différents substituants

(Markham, 1982 ; Mabry et *al.*, 1970 ; Berthillier, 1972). La relation entre les Rf et la structure flavonique est résumée dans le tableau 3.

Tableau 2 : Relation entre Rf et la structure flavonique (Yaou, 2001).

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 méthyles	- Rf augmente dans un solvant alcoolique
Méthylation d'un OH en C5	- Rf diminue dans un solvant alcoolique
Hétérosides de flavones avec 3-OH	- Rf nul dans l'eau

2.2. La fluorescence

Une analyse chromatographique est généralement suivie d'un dosage absorptiométrique, la précision de ces méthodes d'analyse, dépend du but que l'on vise si on désire doser des traces d'un élément, c'est souvent l'ordre de grandeur de la teneur en cet élément qui a de l'importance; de la teneur en cet élément qui a de l'importance; on peut alors se permettre sur le résultat une erreur relative de 10,20 % ou par fois même 100%.

Deux méthodes sont le plus souvent utilisées: l'absorbionmétrie visuelle.

Par comparaison à des étalons ou par la méthode de dilution. Un appareil très simple peut être utile est alors suffisante. La précision de cette méthode peut atteindre peut

attendre celle des méthodes volumétriques ou gravimétriques, pour le dosage des quantités importantes doivent être prise.

Les inconvénients de cette technique sont de trois types : des erreurs systématiques calculables, et des erreurs mesurables, et des erreurs dues à la sensibilité de l'appareil ou de la méthode utilisée.

2.3. La spectrométrie UV –Visible

La spectroscopie dans l'ultraviolet constitue une technique majeure de détection, de contrôle de pureté et d'information des composés phénoliques, en particulier, les flavonoïdes. Ces derniers sont caractérisés en milieu méthanolique par deux bandes d'adsorption (Bande I, entre 330 et 550 nm ; Bande II entre 240 et 285 nm). Ces deux bandes sont attribuables au fait que les flavones et flavonols présentent des formes limites de type cinnamoyle, ou benzoyle. La position précise et les intensités relatives des maximums d'adsorption fournissent des renseignements précieux sur la nature du flavonoïdes et de sa substitution (Jurd et al ;1962).

2.4. La spectrométrie de masse (SM)

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire qui donne globalement le nombre et la nature des substituant hydroxyles ou méthoxyles (Fleuriet et *al.*, 2005), ainsi que la détermination du poids moléculaire des aglycones et leur nombre (Moller et *al.*, 1970). Il existe plusieurs analyses en spectrométrie de masse : l'ionisation par impact électronique ; l'ionisation par impact électronique à haute résolution et *the Fast Atom Bombardement* (Es-Safi et *al.*, 2005)

2.5. La spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire est un phénomène qui apparaît lorsque les noyaux de certains atomes, immergés dans un champ magnétique uniforme B_0 , sont exposés à un autre champ magnétique variable B_e . La RMN est utilisée pour étudier les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la matière organique.

Dans le cas des flavonoïdes, c'est une technique qui permet de connaître :

- Le nombre de sucres liés à l' aglycone et la nature de leur liaison (A ou B).

- La liaison et le nombre de substituant méthoxyles sur le squelette flavonique (Auder, 1966 ; Moller et *al.*, 1970).

Matériel et méthodes

1- Récolte de la plante

La récolte de la plante a été effectuée en mai 2006, au niveau du campus Chaab -Ersas de l'Université Mentouri de Constantine. Les fleurs sont coupées et séchées; les graines sont récupérées et pesées à l'aide d'une balance de précision (OHAUS). Les caractéristiques des graines échantillon sont résumées dans le tableau 3.

Fleur	Nombre de graines viables	Nombre de graines non viables	Total par fleur
1	32	04	36
2	30	05	35
3	67	20	87
4	36	110	146
5	15	05	20
6	13	02	15
7	45	01	46
8	84	4	88
9	44	04	48
10	50	03	53
11	40	06	46

12	32	6	38
13	54	02	56
14	72	20	92
15	186	9	195
Total	800	201	1001
Nb Moyen	53	13	67
%	80 %	20 %	100 %
Poids moyen	26,6 mg /graine	-	-

Tableau 3. Caractéristiques des graines de *Silybum marianum*.

2- Extraction des flavonoïdes

La méthode d'extraction des flavonoïdes appliquée est celle utilisée dans le laboratoire de Phytochimie de l'Université de Constantine; elle correspond à une macération suivie d'une évaporation, puis une extraction par les solvants.

2.1. Macération

A 100 g de graines broyées en une poudre fine, on ajoute un volume du mélange du mélange Ethanol / Eau (80:20) puis on laisse macérer pendant trois jours avec renouvellement du solvant chaque 24 heures (350 ml x 3). Les solutions hydro-ethanoliques obtenues sont réunies dans un même récipient pour subir une filtration afin d'obtenir une solution limpide.

2.2. Evaporation

Elle est réalisée à l'aide d'un évaporateur rotatif (*Rotavapor*) R 120 à une température comprise entre 35 à 45°C. L'extrait sec est repris par 200ml d'eau distillée bouillante, il est ensuite laissé pendant 24 heures afin de subir une décantation, puis il est filtré sur papier filtre Whatman n°1.

2.3. Extraction par les solvants

La phase aqueuse limpide issue des extractions successives est placée dans une

ampoule à décanter de 1 l afin de subir des affrontements successifs par différents solvants. Pour cela, nous avons utilisé l'éther de pétrole, le trichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

2.3.1. Affrontement à l'éther de pétrole

100 ml de phase aqueuse sont déversés dans une ampoule à décanter à laquelle on rajoute 100 ml d'éther de pétrole. Après une agitation énergique et un repos de quelques minutes on observe deux phases :

- la phase éther de pétrole supérieure contenant les boues,
- la phase aqueuse inférieure contenant des flavonoïdes.

La phase éther de pétrole est récupérée dans un bécher, alors que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter afin de subir l'affrontement au chloroforme.

2.3..2. Affrontement au chloroforme

La phase aqueuse obtenue après affrontement à l'éther est remise dans l'ampoule à décanter pour subir les mêmes opérations que précédemment. La phase aqueuse se retrouve en haut de l'ampoule et la phase chloroforme en bas; celle-ci est récupérée dans un bécher, alors que la phase aqueuse est remise dans l'ampoule à décanter pour être affrontée au solvant suivant. Le même protocole est répété pour les deux autres solvants; l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Les différentes phases (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol, et eau) sont évaporées à sec; chaque extrait est repris par un minimum de méthanol (5ml) pour être utilisé dans les tests phytochimiques et antimicrobiens.

3- La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)

Le but de cette étape est d'avoir une idée générale sur le contenu en flavonoïdes de l'échantillon à analyser et de choisir le système de solvants adéquat pour la séparation. Pour cela, nous avons préparé des plaques de verre (10x20 cm) sur lesquelles nous avons étalé le gel de silice.

L'échantillon est déposé sur la plaque à l'aide d'une micropipette de 10 μ l ; on laisse sécher puis de place les plaques dans des cuves contenant l'un des systèmes de solvants suivant :

S₁ : toluène/butanol/méthanol/éther de pétrole

20/10/10/20.

S₂ : chloroforme/acétone/acide formique

75/16,5 /8,5.

S₃ : acétate d'éthyle/méthanol/eau.

50/ 20 /10.

La chromatographie est arrêtée lorsque le solvant a parcouru une distance à 2 à 3 cm du bord supérieur de la plaque. Le solvant est éliminé par évaporation à température ambiante

4. Etude microbiologique

4.1. Microorganismes tests

Les microorganismes testés proviennent des laboratoires de Microbiologie et de Parasitologie de l'hôpital Universitaire de Constantine. Ils correspondent aux espèces suivantes:

Catégorie	Genre et espèce
Bactéries Gram-	<i>Escherichia. coli</i> , <i>Serratia sp</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>

Bactéries Gram+	<i>Staphylococcus albus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> .
Moisissures	<i>Penicillium sp</i> , <i>Aspergillus sp</i> .
Levures	<i>Candida albicans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiea</i> .

2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des disques

La méthode de diffusion à partir d'un disque a été utilisée pour mettre en évidence l'activité antimicrobienne (Collin et *al.*, 1970).

Des disques de papier Whatman n°1 de (6 mm) de diamètre sont stérilisés dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée puis séchés à l'étuve. Ces disques sont ensuite imbibés de 20µl d'extrait à tester (butanolique ou chloroformique).

Par ailleurs, la gélose de Mueller-Hinton stérile est coulée dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre jusqu'à une épaisseur de 4 mm puis laissées refroidir.

Une suspension bactérienne de 18 à 24h est préparée avec le bouillon nutritif (voir annexe2) et ajustée sur 0,5 de turbidité de Mc Farland. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage à l'aide d'un coton-tige stérile en tournant la boîte d'environ 60°. Deux boîtes sont utilisées pour chaque souche bactérienne.

La dernière étape consiste à déposer à l'aide d'une pince stérile à la surface de la gélose ensemencée par la souche à tester d'une boîte de pétri des disques imbibés de 20 µl d'extrait (butanol, chloroforme) .

La sensibilité des bactéries au méthanol est appréciée selon le même protocole que précédemment, mais avec les disques contenant 20 µl de méthanol. Cinq disques sont déposés au maximum dans chaque boîte.

L'incubation dure de 18 à 24h. Durant cette période, les substances diffusent dans la gélose à partir des disques selon un gradient de concentration jusqu'à une limite où sa concentration est la plus faible, déterminant ainsi des zones d'inhibition.

Après incubation, le diamètre d'inhibition autour des disques est mesuré et les valeurs sont exprimées en mm.

4.3. Mise en évidence de l'activité antifongique

La méthode utilisée est la même que celle utilisée pour l'activité antibactérienne (diffusion à partir d'un disque solide selon Collin et *al.*, 1970).

L'incubation des boîtes se fait à 37°C pendant 18 à 24 h pour les levures et les moisissures. A la fin de la culture, si l'extrait inhibe le développement microbien, un halo clair est visible autour des disques.

5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et bactéricides (CMI, CMB)

Les méthodes de dilutions sont effectuées en milieu solide et en milieu liquide.

5.1. Détermination des (CMI, CMB) En milieu solide

La méthode utilisée est celle de (Collin et *al.*, 1970). Une double série de dilutions est préparée à partir de 200 µl de chaque extrait dans des tubes contenant 100 µl de méthanol. 100 µl de chaque tube sont alors prélevés puis transférés dans le tube suivant pour obtenir des concentrations réduites de moitié ($C_{1/2}$, $C_{1/4}$, $C_{1/8}$, etc).

Pour cette étude, seules deux souches sont utilisées: *S. albus* et *C. albicans*. Les cultures pures de *S. albus* et de *C. albicans* sont inoculées dans le bouillon nutritif et

incubées pendant 18 à 24 h à 37°C. Elles sont ensuite ensemencées sur gélose de Mueller-Hinton pour *S. albus* et sur Sabouraud pour *C. albicans* en boîtes de Pétri. L'ensemencement se fait par écouvillonnage, en trempant un coton tige stérile dans la suspension bactérienne ou levurienne en tournant la boîte d'environ 60° afin d'assurer une bonne répartition des microorganismes à la surface de la gélose.

Les disques sont chargés de 20 µl de l'extrait de butanol ou de chloroforme puis déposés à la surface sur la gélose (Mueller-Hinton ou Sabouraud). L'incubation des souches se fait pendant 18-24 h à 37°C pour *S. albus* et *C. albicans*. La lecture se fait en mesurant le diamètre d'inhibition autour des disques.

Chaque essai est réalisé en double.

5.2. Détermination des (CMI, CMB) En milieu liquide (Macro dilution)

La méthode de dilution en milieu liquide a été utilisée pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les concentrations minimales bactéricides (CMB). La CMI est la plus faible concentration d'extrait alcoolique à laquelle le microorganisme testé ne montre aucune croissance visible à l'œil nu.

La méthode consiste à distribuer 200 µl de méthanol dans une série de tubes auxquels on ajoute 100 µl de différentes dilutions ($C_{1/2}$, $C_{1/4}$, $C_{1/8}$, $C_{1/6}$ etc) d'extrait butanolique ou chloroformique dans chaque tube, à l'exception du premier qui servira de témoin positif. Ensuite, on prélève 100 µl du mélange que l'on ajoute à 5 ml de bouillon nutritif et 200 µl de suspension microbienne. On laisse incuber 18 à 24 h à 37°C, puis on effectue la lecture des tubes visuellement.

La croissance bactérienne est indiquée par la turbidité ; le résultat est positif lorsque un trouble apparaît dans les tubes. Le premier tube où il n'y a plus de culture visible indique la concentration minimale inhibitrice (Kamagate *et al.*, 2001). Un tube de contrôle négatif et un tube de contrôle positif sont préparés pour chaque test.

Les CMB peut se mesurer à temps variable et consiste à déterminer le nombre de survivants au cours du temps (Archambaud, 2000).

6. Thermostabilité des molécules bioactives (Flavonoïdes)

La thermostabilité des extraits de butanol et de chloroforme mélangés repris dans du méthanol est mesurée selon le protocole suivant (Doughari et *al.*, 2006).

Les extraits sont répartis dans des tubes de 18 ml, à raison de 6 ml par tube, puis placés à différentes températures pendant 30 min : au réfrigérateur à (-5°C; 4°C) et dans un bain-Marie (40°C; 60°C et 100°C). Ils sont ensuite testés vis-à-vis de *S. albus* et *S. cerevisiae* par la technique des disques imbibés par 20 µl de chaque extrait.

Le test antimicrobien est réalisé selon le même protocole que précédemment.

Couleur	Taille
Beige à marron foncé	5-8 mm *
Beige ou brune	6-7 mm (1)
Beige ou brun chiné	6-7 mm (2)

Tableau 4. Caractéristiques des graines de *Silybum marianum*. Comparaison avec la bibliographie.

Figure 3. Echantillon des



graines utilisées.

Résultats et discussions

1. Caractéristiques des échantillons (Graines de *Silybum marianum*)

1.1. Nombre et poids des graines

D'après le tableau 4 (voir matériel et méthodes), le nombre de graines produites par chaque tête de fleur varie entre 15 à 195 avec une moyenne de 67 graines. Le nombre de graines viables varie de 15 à 186 avec une moyenne de 53 graines par fleurs, ce qui représente environ 80 %. Ces valeurs sont relativement différentes de celles obtenues par Sindel (1991) qui mentionne un nombre de 192 graines par fleur dont 94 % sont viables. Cela doit être lié à l'origine phylogénétique des échantillons ainsi qu'aux facteurs climatiques

et pédologiques. La pesée de 200 graines viables de l'échantillon a donné 5.32 g. soit 2,66 mg par graine.

1.2. Couleur des graines

D'après le tableau, les graines sont de couleur variable; elle s'étend du beige au marron foncé, ce qui correspond aux caractéristiques des graines décrites par différents auteurs (Guittonneaire et Huon, 1983; Sindel, 1991 et Widmer, 2001) (voir fig 3).

2. Rendement massique des extractions

La macération hydroalcoolique et l'affrontement par différents solvants de 100 g de poudre de graines a donné les rendements massiques et les pourcentages résumés dans le tableau 5.

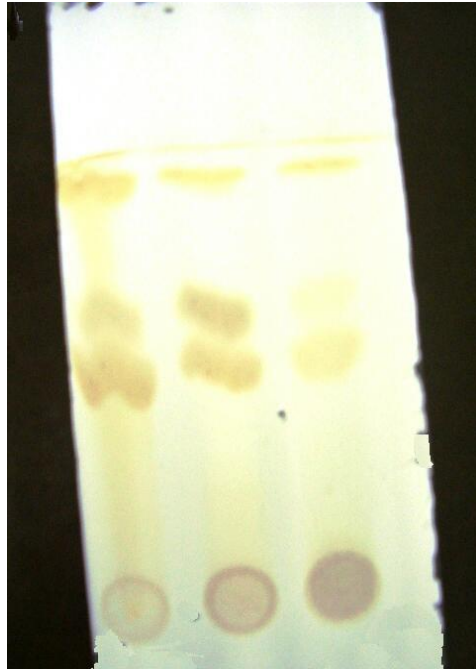
L'extrait	M.S (g)	Rendement (%)
Extrait brut	2,56	100
Extrait chloroformique	0,41	16,01
Extrait de l'acétate d'éthyle	0,38	14,84
Extrait de butanol	0,28	10,94
Extrait aqueux	0,19	7,42

Tableau 5. Rendements des extractions exprimés en g. de matière sèche et en % par rapport à l'extrait brut.

D'après le tableau n°5, on constate que le rendement d'extraction en masse diminue d'une phase à l'autre, il passe de 2,56 g dans l'extrait brut à 0,19 g pour la phase aqueuse. Cette diminution est due à la rétention des molécules par la phase où elles possèdent la plus forte affinité; chaque phase va récupérer des groupes de molécules de polarité croissante. La phase chloroformique renferme des aglycones (molécules moyennement polaires : Queurcétine, Apiginine etc); la phase acétate d'éthyle des aglycones poly hydroxylés (plus polaires que les aglycones : La silymarine); la phase butanolique des hétérosides de type C-glycosyl alors que la phase aqueuse retient les molécules insolubles dans les solvants utilisés (Ribereau-Gayon, 1968).

3

Figure 4. Photographie chromatographique des chloroforme; 2: acétate



1

2

représentant la plaque
extraits alcooliques (1:
d'éthyle; 3: butanol)

3. Chromatographie des flavonoïdes par CCM

La chromatographie sur couche mince des extraits des différentes phases (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, butanol et eau) dans 3 systèmes (voir chapitre matériel et méthodes) a donné une bonne séparation des molécules dans le système n°2 uniquement; les molécules extraites des graines de *Silybum marianum* sont solubles dans le mélange de solvants du système (Chloroforme / acétone / acide formique:75/16,5/8,5 v/v). On observe trois spots indiquant la séparation d'au moins trois molécules différentes dans chaque phase. Les rapports frontaux donnent les mêmes valeurs pour les 3 phases, soit 0,36 cm pour la première tache, 0,4 cm pour la deuxième et 0,53 cm pour la troisième. Ces résultats indiquent que les 3 extraits contiennent des molécules ayant des propriétés similaires (polarité et masse moléculaire); l'intensité des tâches correspond à des concentrations différentes.

Les molécules ont des polarités différentes et se solubilisent donc chacune dans un solvant différent. Les mêmes molécules sont solubles dans des solvants variés.

D'après le profil chromatographique obtenu (fig 4), la dernière est la plus probable. Selon Guernet et Hamon (1981), il peut co-exister des caractères polaires et apolaires chez les molécules organiques, ce qui entraîne une affinité pour des solvants très divers. Par ailleurs, la structure des flavonoïdes est généralement complexe (formés de plusieurs cycles) (Hiller, 1998); ils ne sont pas solubles dans un solvant spécifique mais plutôt dans divers solvants de polarités différentes.

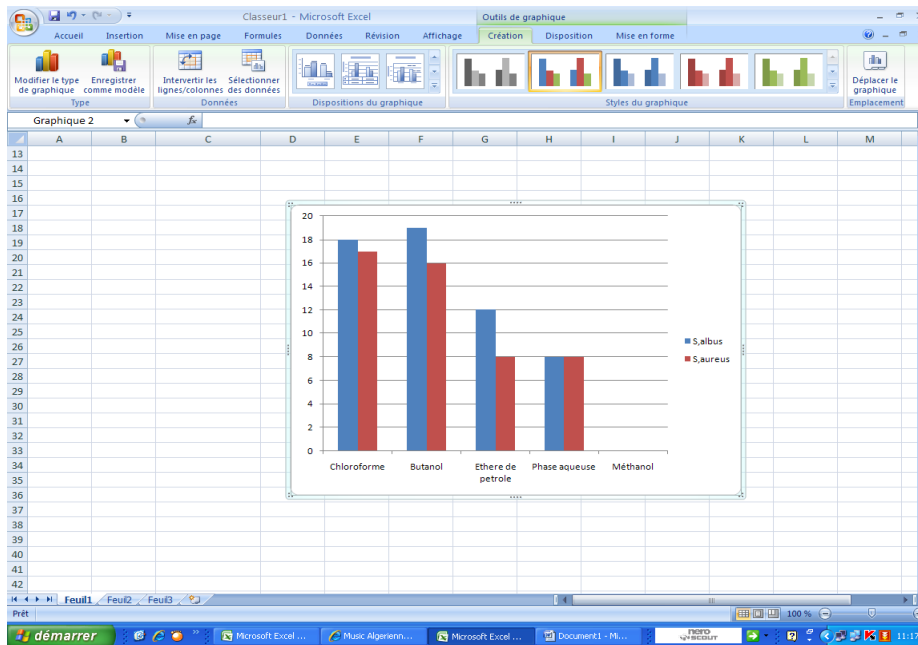


Figure 5. Diamètres d'inhibition (mm) de la croissance de *S. aureus* et *S. albus* par les différents extraits

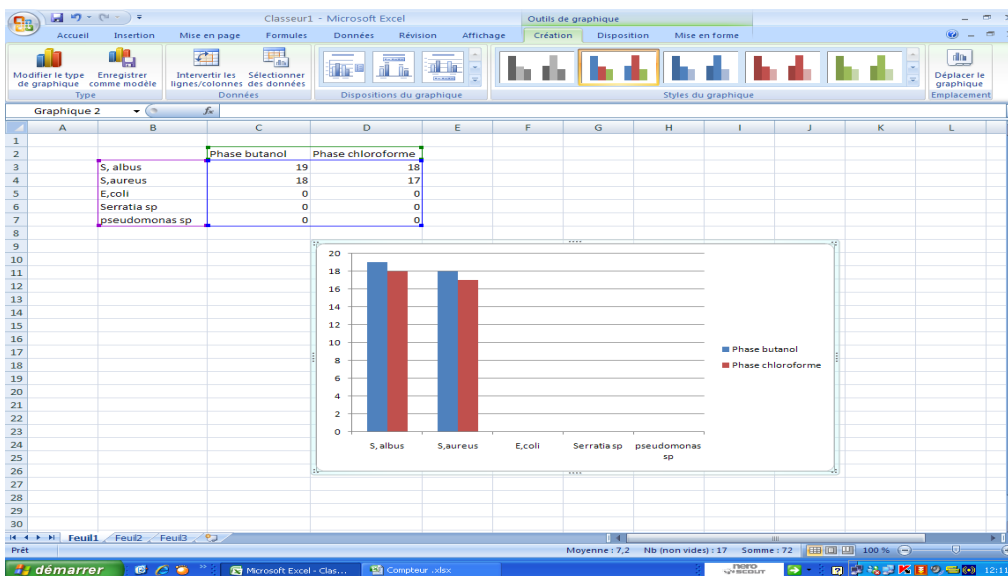


Figure 6. Diamètre d'inhibition de la croissance des bactéries par les extraits butanolique et chloroformique.

4. Détermination de l'activité antimicrobienne des différents extraits

4.1. Activité antibactérienne

La méthode utilisée pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne est la diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Grâce à sa spécificité et à sa composition, ce milieu, souvent rencontré dans la littérature, permet une bonne croissance aux bactéries-tests tout en offrant des résultats clairs. L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage afin d'assurer une distribution uniforme de l'inoculum sur la gélose et faciliter la diffusion des molécules actives dans une fine couche de surface (Horikawa et *al.*, 1999 ; Woo et *al.*, 2002).

Les résultats rassemblés dans l'annexe 5 et les figure 5 et 6 montrent que tous les extraits possèdent une activité antimicrobienne sur au moins une des souches bactériennes testées. Cependant, seules les zones d'inhibition supérieures à 10 mm sont considérées comme positives (Hassan et *al.*, 2006). Celles-ci varient d'un extrait à l'autre et d'un germe à l'autre. Les extraits chloroformique et butanolique sont les plus actifs; les diamètres d'inhibition varient de 8 à 19 mm, la plus grande inhibition est obtenue avec *S. albus* avec 18 mm pour l'extrait chloroformique et 19 mm pour l'extrait butanolique. La plus petite inhibition est obtenue avec *S. aureus* avec 17 mm et 16 mm pour les extraits chloroformique et butanolique respectivement.

L'extrait éther de pétrole est moins actif que les deux premiers; il présente un diamètre d'inhibition de 12 mm pour *S. albus* et 8 mm pour *S. aureus*. L'extrait aqueux est le moins actif avec un diamètre d'inhibition de 8 mm pour chacune des 2 souches sensibles. Le méthanol n'est actif sur aucune souche-test; il sert de contrôle négatif.

L'étude de la sensibilité aux extraits de la plante montre que les souches bactériennes *Serratia* sp, *E. coli*, *Pseudomonas* sp sont résistantes, les zones d'inhibition sont toutes inférieures à 10 mm.



Figure 7. Inhibition de la croissance de *Staphylococcus albus*
Par les extraits de chloroforme et de butanol.

Un deuxième essai des extraits butanolique et chloroformique sur les bactéries confirme la forte inhibition provoquée sur *S. albus* avec un diamètre de 19 mm et sur *S. aureus* avec un diamètre de 18 mm (voir histogrammes fig. 5, 6 et 7). Les deux extraits ont une action signifiante sur les bactéries gram positif (diamètre d'inhibition supérieur à 10) et insignifiante sur les bactéries gram négatif.

L'activité des agents antimicrobiens sur les bactéries gram positif peut s'expliquer par l'accessibilité directe de ces molécules aux peptidoglycanes constituant la paroi, provoquant ainsi la dissolution complète de cette dernière. Les bactéries perdent alors leur rigidité et se lysent sous l'effet de leur pression osmotique interne qui rompt leur

membrane cytoplasmique d'une part, d'une autre part la configuration spatiale des molécules l'empêchent de traverser les protéines de transport (porines) de la membrane externe des bactéries gram négatif, et ne peuvent pas donc atteindre le peptidoglycane de la paroi bactérienne (Bousseboua, 2001).

D
i
a
m
è
t
r
e

d
'
i
n

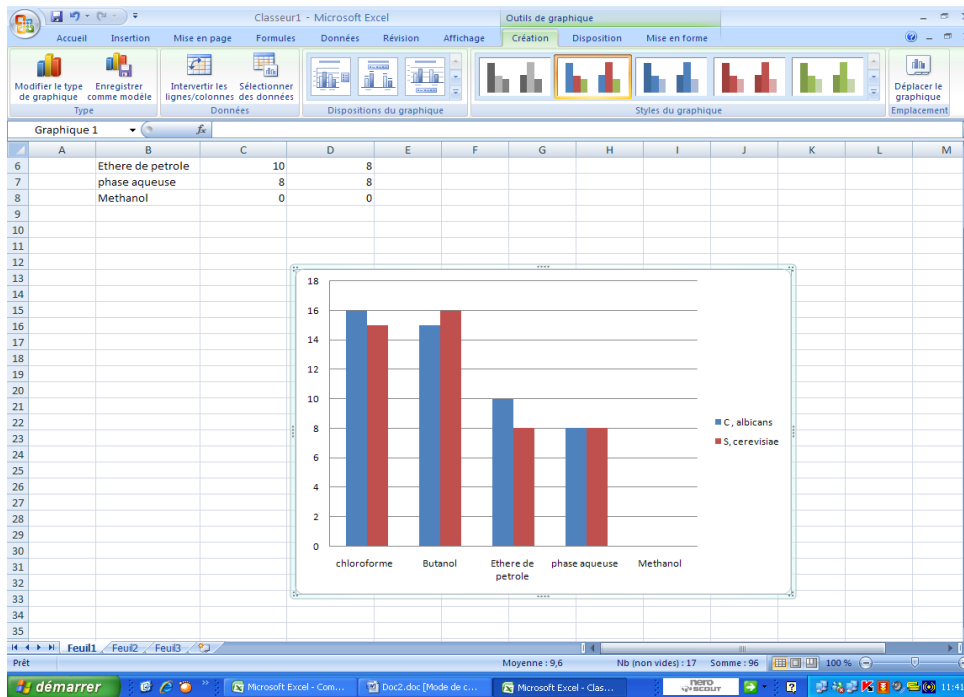


Figure 8 Diamètre d'inhibition de la croissance de *C. albicans* et *S. cerevisiae* par les différents extraits.

D
i
a
m
è
t
r
e

d
'
i
h

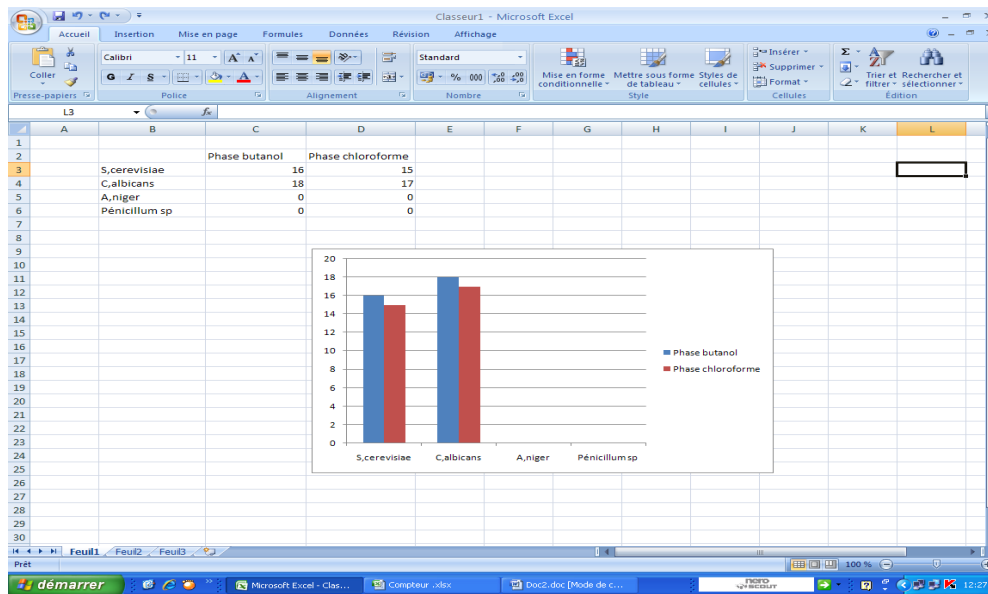


Figure 9. Diamètre d'inhibition de la croissance des champignons par les extraits butanolique et chloroformique

La sensibilité des bactéries (*S. albus*, *S. aureus*) aux extraits chloroformique et butanolique peut s'expliquer par le fait que les flavonoïdes de la plante exercent une inhibition de la croissance via plusieurs mécanismes: inhibition de la biosynthèse des protéines et des phospholipides membranaire, inhibition de leur acide nucléique (Franklin et *al.*, 1987; Hassan et *al.*, 2006); les extraits flavonoïdiques de *S. marianum* exercent probablement leur action par l'un de ces deux mécanismes.

4.2. Activité antifongique

La méthode utilisée pour la mise en évidence de l'activité antifongique est la diffusion sur gélose Sabouraud. Comme pour les bactéries dans le milieu Muller-Hinton, cette méthode est utilisée le plus souvent à cause de sa spécificité et de sa composition; elle assure une bonne croissance des champignons-tests et elle donne des résultats clairs (Horikawa et *al.*, 1999; Woo et *al.*, 2002).

Les résultats rassemblés dans les figures 8 et 9, Annexe 6 montrent que tous les extraits ont une activité sur *Candida* et *Saccharomyces*, mais celles-ci varient selon l'extrait. Elles sont positives (diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm) vis-à-vis des deux levures *C. albicans* et *S. cerevisiae* pour les extraits de chloroforme et de butanol. En effet, les diamètres d'inhibition de l'extrait chloroformique est de 16 mm sur *C. albicans* et de 15 mm sur *S. cerevisiae*. Ceux de l'extrait butanolique sont de 15 mm sur *C. albicans* et de 16 mm sur *S. cerevisiae*.

Les activités sont non significatives (inférieures ou égales à 10 mm) par rapport à l'extrait éther de pétrole qui entraîne une inhibition de 10 mm sur *C. albicans* et de 8 mm sur *S. cerevisiae*. La phase aqueuse présente la plus faible activité antifongique avec un diamètre d'inhibition de 8 mm pour chacune des levures. Les résultats montrent une résistance des moisissures (*Aspergillus sp* et *Penicillium sp*) (voir fig.8)

La comparaison des valeurs extrêmes des zones d'inhibition montre que les extraits de butanol et de chloroforme sont les plus actifs. Un deuxième essai de l'action des extraits butanolique et chloroformique sur les champignons confirme la forte inhibition provoquée sur *C. albicans* et *S. cerevisiae* (voir histogramme de la figure 9) on constate que les extraits butanolique et chloroformique exercent une action significative sur *C. albicans* avec des diamètres d'inhibition de 18 et 17 mm, et sur *S. cerevisiae* avec des diamètres

d'inhibition de 16 et 15 mm. Ces extraits ont donc une action significative sur les levures et pas d'action sur les moisissures. (fig 10)



C. albicans.



S. cerevisiae.

Figure 10. Inhibition de la croissance de *C. albicans* et *S. cerevisiae*
Par les extraits de chloroforme et de butanol.

Il n'est pas possible d'expliquer la cause précise des inhibitions observées; en effet, les différents extraits contiennent un ensemble de molécules et on ne sait pas si l'inhibition est provoquée par une ou par plusieurs molécules. Cela peut s'expliquer cependant par l'accessibilité directe de la paroi des levures et ce n'est pas le cas pour les moisissures protégés par la structure mycélienne rigide, en effet, certains auteurs ont mentionnés que leur paroi est constituée de trois polysaccharides : β - 1,3 glucane, la chitine et la mannane associées par des liaisons chimiques (Farkas et al., 1985). Il est probable que les molécules contenues dans les extraits inhibent la synthèse de la chitine et agissent alors comme certains antibiotiques (Isono et Suzuki, 1979). D'autre part, le mécanisme d'action des agents antimicrobiens sur les levures reste mal connu (Isono et Suzuki, 1979 et Hassan et al., 2006).

5. Détermination des CMI et des CMB

La CMI et la CMB ont été déterminées pour les extraits possédants la plus forte activité antimicrobienne (diamètre d'inhibition supérieur à 10 mm), il s'agit de l'extrait butanolique et chloroformique sur la bactérie *S. albus* et sur la levure *C. albicans*. Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 6, 7, 8 et 9.

5.1. Résultats des CMI et des CMB par la méthode de dilution en milieu solide

dilution	C_0	$C_{1/2}$	$C_{1/4}$	$C_{1/8}$	$C_{1/16}$
chloroforme	17,33	14,66	11,33	10	7
Butanol	17	14	12	9	7

Tableau 6. Diamètre d'inhibition de *S. albus* (exprimés en mm) par l'extrait chloroformique par la méthode de dilution en milieu solide.
(Les résultats sont les moyennes de trois répétitions).

dilution	C_0	$C_{1/2}$	$C_{1/4}$	$C_{1/8}$	$C_{1/16}$
chloroforme	16	15	12	10	7
butanol	15	14	11	8	7

Tableau 7. Diamètres d'inhibition de *C. albicans* (exprimés en mm) par l'extrait chloroformique par la méthode de dilution en milieu solide.

Il apparaît d'après les tableaux 6 et 7 que la valeur des diamètres d'inhibition diminue au fur et à mesure de la diminution des concentration en extraits (butanol ou

chloroforme) jusqu'à la concentration de 1/8 ou on constate que le diamètre d'inhibition atteignent des valeurs inférieures à 10 (activité insignifiante).

D'après (Ganiere *et al.*, 2004) les résultats de la méthode des disques à l'échelle pratique doit être considérée comme uniquement qualitative en raison de la variabilité expérimentale des diamètres et de l'erreur sur les valeurs car à la limite des zones d'inhibition, il existe dans la gélose des concentrations en agent antimicrobien égales aux CMI. Les méthodes de diffusion sur gélose ne permettent pas de chiffrer directement ces valeurs.

5.2. Résultats des CMI et des CMB par la méthode de dilution en milieu liquide

dilution	C ₀	C _{1/2}	C _{1/4}	C _{1/8}	C _{1/16}	C _{1/32}
phase						
chloroforme	---	---	---	+++	+++	+++
Butanol	---	---	---	+++	+++	+++

(+) : présence de trouble dans le tube; (-) : absence de trouble

Tableau 8. Inhibition de la croissance de *S. albus* par l'extrait chloroformique par la méthode de dilution en milieu liquide.

dilution	C ₀	C _{1/2}	C _{1/4}	C _{1/8}	C _{1/16}	C _{1/32}
phase						
Chloroforme	---	---	---	+++	+++	+++
Butanol	---	---	---	+++	+++	+++

(+) : présence de trouble dans le tube; (-) : absence de trouble dans le tube.

Tableau 9. Inhibition de la croissance de *C. albicans* par l'extrait butanolique par la méthode de dilution en milieu liquide.

D'après les résultats des tableaux 8 et 9 l'apparition du trouble dans les tubes débute dès la concentration de 1/8 pour les deux extraits de butanol et de chloroforme étudiés sur *S. albus* et *C. albicans*.

L'absence de trouble dans les concentrations de $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{4}$ des deux souches s'explique par l'inhibition de leur croissance par les deux extraits, l'apparition de trouble à partir de la concentration de $\frac{1}{8}$ est due au fait que les extraits à ces concentrations sont trop dilués et sont alors incapables d'inhiber la croissance des deux souches (concentration inefficace pour l'inhibition de la croissance).

	Extrait chloroformique		Extrait butanolique		Rapport CMB / CMI	
	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CMB (mg/ml)	Extrait chloroforme	Extrait butanolique
<i>S. albus</i>	10,25	41	7	28	4	4
<i>C. albicans</i>	20,5	41	14	28	4	2

Tableau 10. Résultats des CMI et CMB; CMI/CMB des extraits actifs sur *Staphylococcus albus* et *Candida albicans*.

Les CMI de l'extrait chloroformique varient de 10,25 mg/ml à 20,5 mg/ml pour *S. albus* et *C. albicans* respectivement. La CMB est la même pour les deux souches, soit 41 mg/ml. Le germe ayant la plus faible CMI, donc le plus sensible est *S. albus*.

Les CMI de l'extrait butanolique sont comprises entre 7 mg/ml et 14 mg/ml pour *S. albus* et *C. albicans* respectivement. Au regard des CMI, le germe le plus sensible est *S. albus*. La CMB est de 28 mg/ml pour les deux germes.

La comparaison des CMI obtenus avec chacune des méthodes montre qu'il existe une corrélation positive dans les résultats. Les CMI déterminées en milieu solide correspondent aux CMI déterminées en milieu liquide, lorsque les diamètres des zones d'inhibition sont importantes, les CMI en milieu liquide sont faibles (Kamagate et al., 2001). Tandis, que la CMB ne peut être déterminée qu'en milieu liquide.

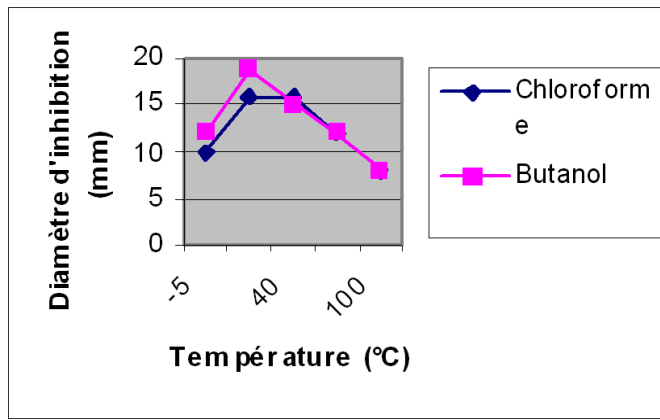
D'après ces résultats, on constate que les CMI varient d'un microorganisme à l'autre, tandis que les CMB sont les mêmes pour les deux microorganismes ceci est observé aussi bien pour l'extrait butanolique et chloroformique. D'après la littérature la mesure du rapport CMB/CMI permet de juger si l'action des agents antimicrobiens est bactériostatique ou bactéricide (tableau 10)

-Si $CMB/ CMI \leq 1$ l'action est bactéricide.

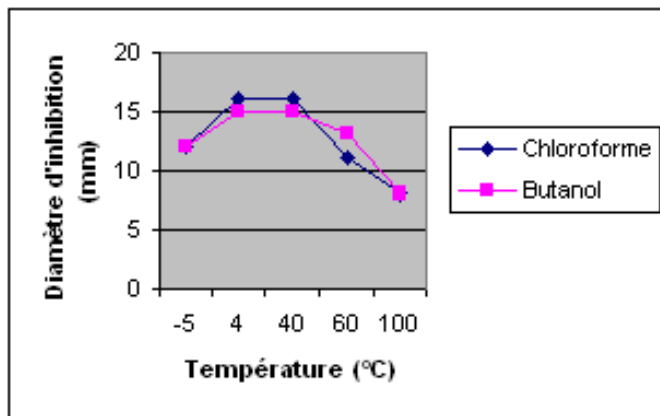
-Si $CMB/ CMI > 1$ l'action est bactériostatique (Archambaud, 2001)

Les résultats résumés dans le tableau 11 montrent que dans le cas de *S. albus* et *C. albicans*, le rapport CMB/ CMI est égal à 4 pour l'extrait chloroformique. Pour l'extrait butanolique, ce rapport est égal à 2 dans le cas de *C. albicans* et à 4 dans le cas de *S. albus* ; ces valeurs permettent de dire que les deux extraits ont une action bactériostatique.

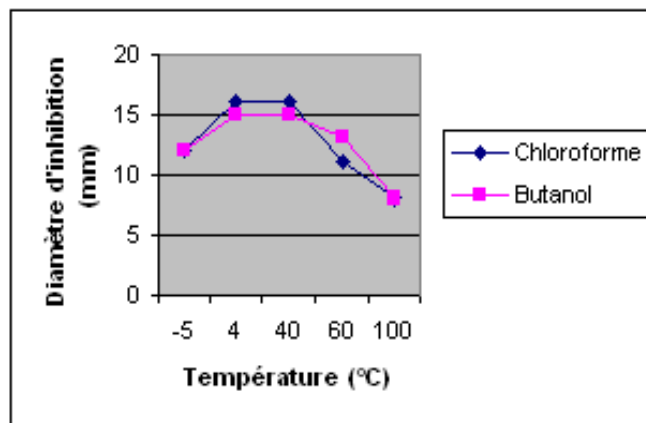
Les extraits de la plante ont donc une action bactériostatique vis-à-vis des bactéries gram positif (*S. aureus*, *S. albus*) et mycostatique vis-à-vis des levures (*C. albicans*, *S. cerevisiea*). Ceci confirme l'étude de Lee et al en (2003) qui a montré l'effet antibactérien de la silymarine sur les bactéries Gram+ et complète les conclusions de (Polyak et al., 2007) concernant une activité sur d'autre microorganisme de cette substance.



a



b



c

Figure 11. Diamètre d'inhibition de la croissance des M.O. par les extraits de chloroforme et de butanol à différentes températures (a: *S. albus*, b: *S. cerevisiea* c: *C. albicans*).

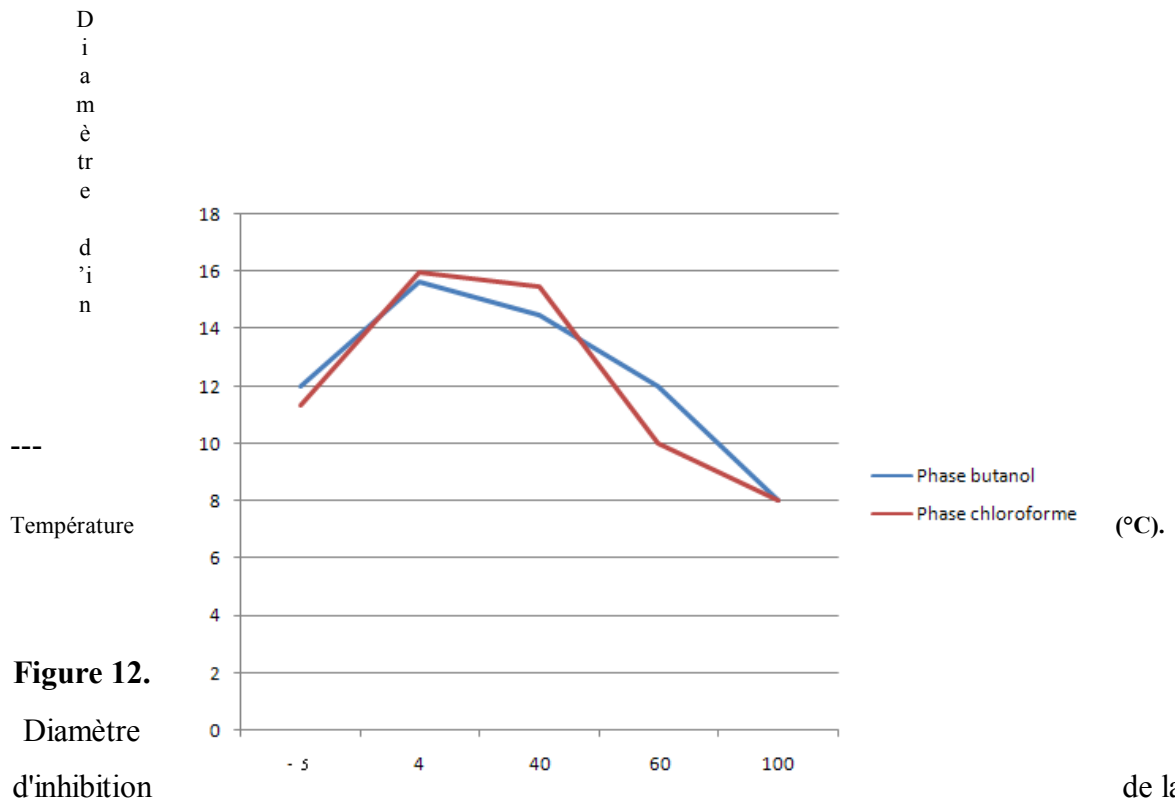


Figure 12. Diamètre d'inhibition de la croissance des M.O. par les extraits butanolique et chloroformique à différentes températures (moyenne des 3 souches).

6. Etude de la thermostabilité des flavonoïdes extraits de *Silybum marianum*

L'étude de l'activité des fractions flavonoidiques extraites par le chloroforme et le butanol puis traitées pendant 30 min par différentes températures a donné les diamètres d'inhibition de la croissance de la bactérie (*S. albus*) les courbes suivantes (figure 11, Annexe 7).

D'après la figure n°12 il apparaît 3 intervalles de températures (voir valeurs en annexe 7):

- de -5°C à 4°C: la valeur du diamètre d'inhibition augmente; elle passe de 12 mm à -5°C à 15 mm à +4°C pour l'extrait de butanol, et de 11 mm à 16 mm pour l'extrait de chloroforme.

- de 4°C à 40°C: le diamètre d'inhibition reste relativement constant, il se situe entre 15 et 16 mm pour les deux extraits.

- de +40°C à 100°C: la valeur du diamètre d'inhibition diminue jusqu'à atteindre la valeur de 8 mm pour les 2 extraits.

Ces résultats montrent que les extraits de butanol et de chloroforme conservent leur activité antimicrobienne après congélation (à -5°C) et au froid à 4°C, les diamètres d'inhibition supérieurs à 10 mm permet de conclure que les molécules bioactives contenues dans les deux extraits résistent la baisse de température. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus par Doughari (2006) qui a travaillé sur les flavonoïdes de *Tamarindus indica linn* ; ces molécules ont une bonne activité antimicrobienne dans des températures comprises entre 40 et 60°C. Ils confirment les travaux de Bibitha et al. (2002), Daughari (2006) et de Hassan et al., (2006), qui ont montré que les molécules d'usine y compris les flavonoïdes, restent actives à des températures élevées durant 30 min et plus.

A 100°C pendant 30 min, les diamètres d'inhibition des bactéries et levures sont de 8 mm environ, l'action est donc insignifiante. Ceci est dû à la perte de l'activité des molécules, contrairement à Daughari (2006) qui mentionne une stabilité des flavonoïdes à 100°C pendant 30 min.

De ces résultats, on peut conclure que les flavonoïdes de *S. marianum* conservent leur activité à des basses températures et restent actives à des températures comprises entre

40 et 60°C. Elles deviennent inactives à 100°C. La température optimale de ces molécules se situe entre 40 et 60°C.

Conclusion et perspectives

L'extraction de flavonoïdes de *Silybum marianum* est effectuée par un fractionnement de type liquide- liquide par divers solvants de polarité différentes (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle, n-butanol) a permis d'évaluer les rendements massiques de chaque phase. Les masses des extraits passent de 2,56g dans l'extrait brut à 0,41; 0,38; 0,28; 0,19 g dans l'extrait de chloroforme, acétate d'éthyle, butanol, et l'extrait aqueux, successivement.

La séparation des composés actifs est réalisée par CCM utilisant le gel de silice. Les résultats ont montré l'apparition de trois taches différentes dans chaque phase migrant de la même façon avec des rapports frontaux de 0,36; 0,41; 0,53 cm.

Le choix des phases à haut potentiel antimicrobien est réalisé par la méthode de diffusion sur milieu solide (Gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons). Les résultats ont montré que l'extrait butanolique et chloroformique sont les plus puissants vis-à-vis des germes sensibles (*S. aureus*, *S. albus*; *C. albicans*, *S. cerevisiea*). Un deuxième criblage de l'activité antimicrobienne utilisant ces deux extraits est effectué par la méthode des disques. Les résultats ont montré une action significative sur les bactéries gram positif et les levures avec des diamètres d'inhibition atteignant 19 mm.

La détermination des CMI et CMB est réalisée par la méthode de dilution en milieu solide et liquide. Les résultats des CMI vont de 10,25 à 7 mg/ml pour l'extrait de chloroforme et de butanol respectivement dans le cas de *S. Albus* et de 20,5 à 14 mg/ml pour la levure *C. albicans*, tandis que les CMB vont de 41 à 28 mg/ml pour l'extrait de chloroforme et de butanol respectivement pour *S. albus* et de 41 à 28 mg/ml pour *C. albicans*.

Le rapport CMB/ CMI est égal à 4 pour l'extrait chloroformique avec les deux souches *C. albicans* et *S. albus*, tandis qu'il prend une valeur de 4 avec *S. albus* et de 2 avec

C. albicans dans le cas de l'extrait butanolique. Ces résultats montrent que les deux extraits sont bactériostatiques vis-à-vis des microorganismes (*S. albus* et *C. albicans*).

L'étude de la thermostabilité de ces molécules a montré leur résistance dans la gamme de température étudiée -5 °C à 60 °C et deviennent inactives à 100 °C.

Cette étude révèle que la plante *S. marianum* renferme des molécules flavonoidiques douées d'activité antibactérienne et antifongique.

Les perspectives de la recherche consistent à la purification des molécules par des techniques plus efficaces (HPLC, chromatographie en phase gazeuse, etc). La réalisation d'une analyse structurale par RMN permet la détermination de la structure exacte des substances à analyser.

- Identification des molécules responsables de l'activité antimicrobienne.
- Etude du mécanisme d'action de ces molécules sur les microorganismes inhibés.

ةيحاتفملا تاملكلا :

ملا زيكرت ىندأ ،تابوركيملل طبثملا طاشنلا ،يفارغوتاموركلا لزغلا ةينقت ،تاديونوفالف، *S. marinum*

((CMB) لتاق زيكرت ىندأ ، (CMI)

ANNEXES

Annexe 1 : Composition des milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne :

Mueller-hinton :

- Agar.....10g.
- Extrait de viande.....02g.
- Hydrolysate acide de caséine..... 17,5g.
- Amidon..... 1,5g.
- Eau distillée.....1000ml.

PH 7,4.

Milieu Sabouraud :

- Agar.....15g.
- Glucose..... 40g.
- Peptone.....10g.
- Eau distillée.....1000ml.

PH 7,00.

Annexe 2 : Composition des bouillons nutritifs utilisés pour la culture des microorganismes-tests :

-Bouillon nutritif pour les bactéries :

-Extrait de viande.....	5g.
-Peptone.....	10g.
-Na cl.....	5g.
-Eau distillée.....	1000ml.

Ph 7,35.

Stérilisation à 110°C pendant 20mn.

-Bouillon nutritif pour les champignons (YPG) :

-glucose.....	20g.
-extrait de levure.....	05g.
-peptone.....	10g.
-eau distillée.....	1000ml.

5 < ph < 5,2.

Annexe 3 : Préparation des solutions :

-Solution de Mc Farland :

Solution A	Solution B	Composition de la solution de Mc Farland
Ba cl ₂ 2(H ₂ O) à 1% (10g/l).	H ₂ SO ₄ à 1% (10ml/l)	0,5 ml de la solution A +99,5 ml de la solution B.

-la densité optique de la solution (DO) varie de 0,08 à 0,1 lue à 625 nm.

-Solution d'eau physiologique :

-Na cl.....9g.

-Eau distillée.....1000ml.

Stérilisation à 120 °C pendant 20mn.

-Réactif de GODIN

Solution mère		Réactif de Godin
Solution A à 1 %	Solution B à 3 %	
-Ethanol pur 1000ml. -Vanilline 10g.	-HclO ₄ à 3 % d = 1,67	50ml de la solution A + 50ml de la solution B.

Révélation

-Solution éthanolique d'acide sulfurique :

-Ethanol..... 100ml.

-Acide sulfurique..... 10ml.

Annexe 4 :

Valeur des rapports frontaux correspondant aux figures (2).

-La première tache :

R_f = 0,36 cm calculé à partir de la phase acétate d'éthyle.

-La deuxième tache :

R_f = 0,41 cm calculé à partir de la phase éther de pétrole.

-La troisième tache :

R_f = 0,53 cm calculé à partir de la phase chloroforme.

Poids de chaque phase après évaporation :

Après chaque évaporation la masse de chaque phase est pesée par une balance de précision puis repris dans 5ml de méthanol.

-l'extrait brute : 2,56g.

- la phase chloroforme : 0,41g.

-la phase acétate : 0,38g.

-la phase butanol : 0,28g.

-la phase aqueuse : 0,19g.

-Annexe 5 : Données pour la représentation de la figure (6 et 9)

- Bactéries-tests :

Phases Souches-tests	Butanol	Chloroforme
<i>Staphylococcus albus</i>	19	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	17
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Serratia sp</i>	0	0

- Les champignons-tests :

Phase Souches-tests	Butanol	Chloroforme
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	15
<i>Condida albicans</i>	18	17
<i>Aspergillus niger</i>	0	0

Penicillium sp	0	0
----------------	---	---

Les résultats sont des diamètres d'inhibition exprimés en (mm).

Annexe 6 : données pour la représentation de la figure (5 et 8) :

Souche	Staphylococcus albus	Staphylococcus aureus
Phase		
Phase éther de pétrole	12	8
Phase chloroforme	18	17
Phase butanol	19	16
Phase aqueuse	8	8
méthanol	0	0

Souche	<i>Condida albicans</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Phase		
Phase éther de pétrole	10	15
Phase chloroforme	16	16
Phase butanol	15	8
Phase aqueuse	8	8
Méthanol	0	0

Annexe 7 : Données pour la représentation de la figure (11 et 12) :

Extrait butanolique (les diamètres d'inhibition sont exprimés en mm).

Souches-tests	<i>S.albus</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.albicans</i>	Moyenne
Température				
-5°C	12	12	12	12
4°C	19	13	15	15,66
40°C	15	14	15	14,66
60°C	12	11	13	12
100°C	8	8	8	8

Extrait chloroformique :

Souches-tests Températures	<i>S.albus</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.albicans</i>	Moyenne
-5°C	10	12	12	11,33
4°C	16	16	16	16
40°C	15,5	15	16	15,5
60°C	12	12	11	10
100°C	8	8	8	8

Références bibliographiques

AAC. (2004). Agriculture et agroalimentaire Canada. Jardin d'herbes médicinales *Silybum marianum* L. Centre de recherche du sud sur la phytoprotection et les aliments.

Alarcon ; A.C. (1995). Gastroprotection induced by silymarine; the hepato- protective principle of *Silybum marianum* in its chemia. Role of neutrophils. *Planta. Med.* 6 (2):116-19.

Anderson. pl., Fletcher., C.V., (2001). Clinical pharmacological considerations for HIV- I protease inhibitors. *Current infections disease reports.* 3(4): 381-87.

Anderson.; P.L., Brundage., R.C., kakuda ., T N. and Fletcher., C.V. (2002). Response is correlated with peak plasma concentrations of indinavir in adults with undetectable human immunodeficiency virus ribonucleic acid. *Clinical pharmacokinetics.* 71: 280

- Anonyme. (1984). document technique N° 1 station national d'essais de semences. Liste alphabétique des principales espèces de plante cultivées et des mauvaises herbes. Noms latins et noms communs français. 2^{ème} Ed Geues.
- Anonyme. (1998). Rational phyto therapy). A physicians guide to herbal medecine. 3^{ème} édition. Springer-Verlage. Germany. 218.
- Archambaud M. (2000). Méthodes d'évaluation de l'activité des antibiotiques. Brulures, Vol.1.ed. Carr. Méd.
- Asada Y., Oshikawa T., Welli. (1998). Antimicrobial flavonoids from Glycyrrhiza glabra hairy root cultures. *Planta medica.* 64(8): 746-747.
- Audigié C.L., Dupont G., Tonszain F. (1995). (Chromatographie) principes d es méthodes d'analyses biochimiques. Tome 1 Doin. 44-85.
- Barry A.L., Garcia F., Thrup. P .L .D. (1970). An improves single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. *Am. J. Clin. pathol.* 53: 149-58.
- Bayer E., Buller K. P. (1990). Guide de la flore méditerranéenne: Caracteristiques, Rabitats, distributions et particularités de 536 espèces. Ed. Delachaux et Neisthe. Paris. P222.
- Belkhada J. (1997). La Pharmacopée marocaine traditionnelle. Ed. IBIS Press. P. 202.
- Beloued A. (1998). Plantes médicinales d'Algérie. Ed .Office des publications.
- Beneston N.T., W.S. (1984) .Fleurs d'Algérie. Ed. Entreprise National de livre. Algérie .P 274.
- Berner, D. K., Paxson, L. K., Bruckart, W. L., Luster, D. G., McMahon, M. B., Michael, J. L. (2002). First report of *Silybum marianum* as a host of *Puccinia punctiformis*. *Plant Disease.* 86:1271.
- Bezanger., beauquesne L., Pinka M., Trotin F. (1990). Plantes medicinales des regions tempérées. 2^{ème} édition .Maloin .Paris: 45-65.
- Bibitha B., Jisha V.k., Salitha P.V., M.ohans., valsa A K. (2002). Activité antibactérienne de différents extraits d'usine. Communication courte. *Microbiologie indienne.* 42: 361 – 63.
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. The Cochrane Hepato-Biliary Group, Copenhagen Trial Unit, Centre for Clinical Intervention Research, Copenhagen University Hospital, Rigshospitalet, Copenhagen, Denmark.

- Blumenthal M., A.B. C. (2003). Clinical guide to herbs. New York. Theime .
- Bohm H., Boeing H., Hempel: (1998). J. Flavonols, Flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*. 37 (2): 147 – 63.
- Bournemouth U. K. (2006). British herbal Medicine Association.
- Bousseboua H. (2001; 2006). *Eléments de microbiologie générale*. 32, 160-167
- Bradly P. R. (2006). British herbal compendium: Ahand book of scientific information on widely used plants drugs. Volume 2.
- Brouillet L., Hay S. G., Goulet I., Marie-victorin. (2002). Flore laurentienne. 3^{eme} éd. Boucherville: Edition Gaëtan Morin. . Quebec.
- Bruneton J. (1933). Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales, techniques et documentation. Lavoisier. Paris.
- Bruneton J. (1999). Pharmacognosie et phytochimie des plants médicinales. 3^{eme} édition. Lavoisier. Paris.
- Burdas S., Oleszek W. (2001). Antioscidant and untiradical activities of flwonordes J Agric. food. Chem. (6): 2774 -9 jun, 49.
- Burnie G. (1997). Encyclopédie de botanique et de l'horiculture. Plus de 10.000 plantes du monde entier. Ed. Random house Autralia ptyltd. P 843.
- Carames C. (1990). Les adventices des cultures méditerranéennes en Tunisie, leurs plantules, leurs semences. Publication agricole n' 27. p 102 – 3. Chem. Enge. News. (1991) .69 (37): 25.
- Charlot G. (1978). Dosage calorimétrique des éléments minéraux. Ed Masson Paris. 56.
- Chum J., Kim .S.b., O H. Y. K., seang C.N., lee D. H., Baek. S., lee. K. J. Kangs. O., Ya H.Y. C and good fellow. M. (1999). Amycolatopsis thermoflava. sp. Nov., a novel soil. Actinonycete from hainan is land, china. Int. J. Syst. Bacteriel. 49: 1369- 1373.
- Combest W.L. (1998). Milk thistle. US. Pharmacist. September. 23 (9).
- Compos R., Garrido., Guerra R. (1989). Silybin dihemisuccinate protects against glutathione depletion and lipid peroxidation induced by acetaminophen on rat liver. *Planta Medicva*. (55): 417-419.
- Daughari J.H. (2006). Activité antimicrobienne de *Tamarindus indicalinn*. Journal tropical de la recherche pharmaceutique. Vol 5. Nom. 2 December .P 597 – 603.
- Dicarlo G., N. Mascolo., A.A. Izzo., Caposso. (1999).Flavonoids: old and new aspect of a class of natural therapeutic drugs. *Review Life Science*. 65:337-53.

- Edith A., Robert M., Jean. U. (1988). Chromatographie: Théorie. 26 et 28 Janvier. Lycée Louis Vincent – METZ.
- Es-Safi., Kerhoas N., Einhorn J., Ducrot. (2005). Contribution à l'étude des tannins d'Eucalyptus. International journal of mass spectrometry. 247: 93-100.
- Farkas V. (1985). Ultra structural cytology of pathogenic fungi .In: Howard .D.H. (Ed). Fungal protoplasts .application in Biochemistry and genetics. 3-30. Marcel Dekker New York.
- Ferenci R, et al. (1989). Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J. Hepatol.* 9:105-13.
- Flora ., Hahn M ., rosen H., Benner K. (1998). Milk thistle (*Silybrim marianum*) for the therapy of liver disease. *Am.J.Gastro enterol.* 93 (2): 139 – 43.
- Foster S. (1983). Milk Thistle: *Silybum marianum* as a prophylaxis against toxic chemicals. *Hum Toxicol* 2 (2): 183-95.
- Gaby., R. P. Litmann., Damin. (1994). Facteurs affectant le domaine du *marinum*. L. (*Asteraceae*) de *Silybum* dans ses habitats spécifiques. *Flore* (189): 201-206.
- Ganiere J.P., Mangion C., Péridy. (2004). Détermination des concentrations minimales inhibitrices de la cefquinone, la marbofloxacin, la tylosine et la spiramycine en solution du lait. *Revue méd. Vét.* 155:8-9,411-416.
- Groves, R.H. and P.E. Kaye. (1989). Germination and Phenology of Seven Introduced Thistle Species in Southern Australia. *Aust. J. Bot.* 1989. 37(1): 351-359.
- Guernet et Hamon. (1981). Abrégé de chimie analytique. Tome I. 2^{ème} Ed. Masson. Paris.8-12.
- Guignard J.L. (1998). Botanique. 11^{ème} ED. Ed Masson. NP 278.
- Guignard J.L. (2000) .Biochimie végétale. 2^e Edition, Dunod. Paris.
- Guillaume, 2000: Www. Second euro-bioweb.com/microbiologie/ microbiologie cours. Html.
- Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod. P 71-75.
- Guittonneau G., Huon A. (1983). Connaître et reconnaître la flore et la végétation méditerranéennes. Ed. Ouest France. P 331.

- Hassan S.W., Umar R.A., Lawal M., Biblis L.S., Muhammed B.Y., Dabai Y.U (2006). Evaluation of antibacterial activity and phyto chemical analysis of root extracts of *Boxia angustifolia*. *African Journal of Biotechnology*, **5**. (18): 1602-07.
- Heller R., Esmault R., Lance C. (1998). *Physiologie Végétale*. 6^{ème} édition. Dunod, Paris. p:290.
- Hertog M.G.L., Kromhout., Aravanis et al. (1995). Apport en flavonoides et risque à long terme de coronaropathie et le cancer, étude dans sept pays. *Arch. Intern. Med* .155:381-86.
- Hertog., M.G.L., Hollman., P. C. H. , Van de putté .(1993). Content of potentially. Anti carcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of agricultural and food chemistry*.41: 1242-6.
- Hikino, H Kiso, Y, Wagner, H and Fieig M, "antihépatotoxique actions of flavonolignans from *Silybum marianum* fruits ", *Planta Medica*, 1984, 50, pp 248-50.
- Hillali.L.,Khattab :A.,Nassarlah.N.,Malkin.N et Finance.c. (2002). Isolement de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Revue. Biol. Biotech*. 2:49-53.
- Horicawa.M., Nora.T. Kamei.Y. (1999). In vitro antiméthycilline.résistant *Staphylococcus aureus* activité trouvée dans l'extrait d'algues marines indigènes à la côte du Japon. *J. Antibiot*. 52: 186-89.
- Hostettman: K., Nakanishi K. (1979). Moronicacide a simple triterpénoïde Keto acide urique antimicrobienne isolée de *Ozoroa mucronata* J. med. Plant. Res. 31: 358-366.
- Isono., Kand., Suzuki. S. (1979). Les polyxins, pyrimidine nucléoside, peptide antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi cellulaire fongique. *Heterocycles* 13:333-51.
- Julve P.R. (1998). Base flore. Indexe botanique. Ecologique et chronologique de la flore de France.
- Kamagate., Kone D., Coulibaly N.T., Brou E., Sixou M. (2001). Etude comparative de différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques. *Ordo-Stomatologie tropicale*. N° 95.
- Kamoun P. (1975) Appareils et méthodes en biochimie, Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- Lacaille-Dubois., M.A., Wager. H. (1996). Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta botanica. Gallica*. 143(6): 555-62.

- Lee D. G.(2003). Gram positif bacteria spécifique properties.of silybine derived from *Silybum marinum*. Arch Pharm Res.:26(8):597-600.
- Loiseleur.J. (1963). Chimie technique de laboratoire (Tome I), Chimie physique et chimie biologique, Eds Masson. 634, 635, 638.
- Luper S. (1998). A review of plants used in treatment of liver disease: part I. Altern. Med. Rev. Dec. 3 (6): 410-21.
- Manthey., Fleuriet.A., Macheix.J.J., Sarni.M. (2005). Les composés phénoliques dans la plante: Structure, Biosynthèse, Répartition et roles.In: les polyphénols en agroalimentaires. Eds, Tech & Doc, Lavoisier, Paris. 32, 150, 153-155, 160-161.
- Marby.T.J.,Markham.K.R.,Thomas.M.B.(1970). The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. Newyork. Heidelberg. P 254.
- Maria rosa Alberto., Matias Andrés rinsdahl- canavosio., Maria Cristina Mancade., Nadra. (2006). Effet antimicrobien des polyphénomènes dans peaux de pomme sur les microbes pathogènes bactériens humains. Biotechnologie et environnement. (9):3.
- Markham K.R. (1982). Technic of flavonords identification. Academic Press. London.
- Martini M.C. (2006). Introduction à la dermopharmacie et à la cosmétologie. P 331.
- Mazza. (2000).Programme de recherches alimentaires, Agriculture et agroalimentaire Canada. Numéro spécial du *Journal of food. Science and Agriculture*. 80 (7).
- Mickael. (2003). First report of *Silybum marianum* as a host of *Puccinia punctiformis*. *Plant Disease*. 86:1271.
- Mira, L., M. Silva, and C. F. Manso, 1994: Scavenging properties of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol*. 48, 753–759.
- Moller.J.,Neilsen.J.G.(1970). Acta.Chem. Scand. 24: 2665.
- Morazzoni P., Bombardelli E. (1995). *Silybum marianum* (Carduus marianus). *Fitoterapia*, 66 : 3-42.
- Niger (1961). *Silybum marianum* : an other host for *Puccinia punctiformis*. 221.
- Nutra news. (2003). Information et actualité santé, nutrition, prévention du vieillissement –
htm.
- Ody P. (2001). Complete Guide to Medicinal Herbs. Dorling-Kindersley, London.
- Owayale. j. A., Olatun ji. G. A., Oguntoye. S. O. (2005). Antifungal and antibacterial acivities 17. Of an acloholic extract of *Senna alata* leaves. *J. appl. sci. Environ. Mgt*. 9 (3):105-

- Pepel jnjak.S., zdenka Kalodera., Marijana Zovko (2005). Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (cav) l'herit. Acta pharm. 55: 431-35.
- Pepping (1999). Milk thistle: *Silybum marianum*. AM. J Health system pharm. (56): 551-556.
- Perry J., Staley J., Lory S et al. (2002). Microbiologie. Cours et question de révision. Dunod: 159-160.
- [Pietrangelo A.](#), [Borella F.](#), [Casalgrandi G.](#), [Montosi G.](#), [Ceccarelli D.](#), [Gallesi D.](#), [Giovannini F.](#), [Gasparetto A.](#), [Masini A.](#) (1995). Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats. *Gastroenterology*. 109: 1941-9.
- Piquemal G. (2004). Documents and setting/mb/Flavo-perso.htm.
- Pizzorno JE, Murray MT, (1999). Clinical Applications of *Silybum marianum* in Oncology. Textbook of Natural Medicine. EDS.
- Polyak S. J., Chihiro Morishima, Margaret C., Shuhart, Chia C. Wang, Yanze Liu, David Y.-W. Lee (2007). Inhibition of T-Cell Inflammatory Cytokines, Hepatocyte NF-KB Signaling, and HCV Infection by Standardized Silymarin (Milk thistle), *Gastroenterology*, 132 (5): 1925-1936.
- [Pradhan. S C.](#) [Girish. C.](#) (2006). Hepatoprotective Herbal Drug. Silymarin from Experimental Pharmacology to Clinical Medicine, [Indian Journal of Medical Research](#) <http://www.redorbit.com/news/health/917767/>
- Prescott., Harley & Klein (1995). *Microbiologi*. Bruxelles. DeBoeck Université.
- Ramos.M., Santos.E.P., Bizarri.C.H.B., Mattos.H.A., Padilha.M.R.S., Durate.H. (1996). Preliminary studies toward utilization of various plant extracts as antisolar agents. *International journal of cosmetic science*.18: 87-101.
- René L. (2002). Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules. <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>
- Ribereau-Gayon P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Dunod.paris.
- Fleuriet.A., Rice.E., Macheix.J.J. (2005). Les composés phénoliques des végétaux. press polytechniques et universitaires, Romandes.160.
- Robin valerie.,Amoros Maryvonne.(1999). Travaux universitaires.université de rennes1. INST- CNRS, INIST: T127173.
- Sarre H. (1971). "Experience in the treatment of chronic hepatopathies with Silymarin ". *Arzeim Forsch.* 21 (1): 209-12.

Schandalik R., Perruca E. (1994). Pharmacokinetics of silybin following oral administration of silybin in patients with extrahepatic biliary obstruction. Ed. *Drugs-Exp-Clin-Research*. Vol 20(1): p37-42.

Sindel, B.M. (1991). A review of the ecology and control of thistles in Australia. *Weed Research*. Vol. 31. Pp. 189-201.

SPICHIGER R., SAVOLAINEN V., FIGEAT M. (2000). LA BOTANIQUE DU SYSTÈME DES PLANTES À FLEURS. ED. : [PRESSES POLYTECHNIQUES ET UNIVERSITAIRES ROMANDES](#).

Susan.G., Wynn.D.V.M.(2002). *Silybum marianum* Milk Thistle. Veterinary. botanical Medicine- Association.

Talaj S., Czechowicz., A.S. (1989). Herbal Remedies Harmful and Beneficial Effects, Hill of Content, Melbourne. P 221.

USDA. , ARS. (2007). National genetic resources program. Germplasm resources laboratory. Beltsville (MD).

Varro E., Tyler Ph. (1994). Herbs of choice the therapeutic Use of Phytomedicinals, P.P.P. N.Y. P 64.

Velussi M., Cerginói .A.M., de Monte.A., et Al.(1997). Long term treatment with an antioxidant drug (silymarin) is effective on hyper insulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *Journal of hepatology*.

Venkataraman et al. (2000). R., Ramachandran R., Komoroshi B. (2000). Milk thistle, an herbal supplement, decrease the activity of CYP3A4 and uridine diphosphoglucuronosyl transférase in human hepatocyte cultures. *Drug metabolism and disposition*. 28 (11): 1270-1273.

Vial B. (1998). *Botanique médicale*. Ed. Imilia. Paris. 363-40.

Volak J., Stodola J. (1984). *Plantes médicinales. Illustrations de Frantisek severa*. Ed. Arita grand. Paris.319.

Vincent. R. (1999-2000). *Abécédaire de phytothérapie*.

Vinson.J.A., Dabbagh.y.A., Serry.M.M.(1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using in vitro oxidation model for heart disease. *Journal*.

Widmer.N. (2001). *Cardui maria fructus (Dosage des flavonolignanes)*. 1-2.

www.homopage.mac/nwidmer/chardon.htm

Wiersema.j.,leon.B.(1999).world economic plants : A standard reference. Boca raton (FL):

CRC press. LLC.

Woo.J.H., Kitamura.E., Myouga.H., Kanei.Y. (2002). An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain Ap77 is specific for *Pytium porphyrae*, a causative agent of red rad disease in porphyra SPP. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6) : 2665-75. www.fao.org/docrep/004/y2775f/y2775f07.htm.

Yaou A. (2001). Contribution à l'étude des composés flavonique d'une labiée. Le *Teucrium polinum*. Thèse de magistère.

Sites internet

www.avogel.fr/encyclopedie-plantes/silybum_marianum.php (2007)

www.detoursante.com/flavo-perso.htm

www.fao.org/docrep/004/y2775f/y2775f07.htm

www.Lycee.ac-rouen.fr/galilee/Ies_p27/chromatographie.3htm

www.passeportsante.net/chardon_marie

Larodz. Chez- alicefr.

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>

www.homopage.mac/nwidmer/chardon.htm

Abstract

New antimicrobial vegetal compounds are researched from an endemic medicinal plant, widely répandue in Mediterranean region, particularly in Algeria, *Silybum marianum*. For that, flavonoids have been extracted using several adapted solvent systems then separated by a thin layer chromatography (TLC) on silica gel.

The antimicrobiol effect of the compounds extracted was tested using disk method against the following bacteria and fungi : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia coli*, *Serratia sp* ; *Aspergillus sp*, *Penicillum sp*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cereviseae*. The highest inhibitory effect is corresponding to chloroform and butanol extracts; both extracts presented strong activity against: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cereviseae*.

The minimum bacteriostatic and bacteriocidal inhibitory concentrations against sensitive germs were determined by solid and liquid dilution methods.

Determination of CMB/CMI ratio revealed a bacteriostatic action of these flavonoids. The study of thermostability revealed their resistance at cold and heat temperatures (-5°C ; 4°C ; 40°C ; 60°C)but it will be and inactive at 100°C.

These results highlight antimicrobial activities of flavonoids extracted from *Silybum marianum*, which broadens the therapeutic properties of this plant.

Key words : *Silybum marianum* ; Flavonoids ; splitting ; antimicrobial activity ; TLC ;
CMB ; CMI ; Thermostability.

ص خ لم

م ة عوم جم جارختساب انمق يتابن ردصم تاذ ةيره جملا تانئ الكلل ةطبثم ةديج تابكرم نع ثحبل ا راطل يف
مبتنم رئا زجلا ةصاخ طسوتمل اضيبأل رحبل ا ضوح يف ةرشتنم ةيبط تاتابن نم تاديونوفالفل

(Asteraceae): *Silybum marianum*

ةراضلا ةيره جملا تانئ الكلا نم ةعوم جم يلع تابكرملا هذهل طبثمل طاشنلا ةبرجت مت
مت نم و ،صئاصخلا ةعونتم ةيلو حكلا تابيذمل نم ةعوم جم ةطساوب تاديونوفالفل جارختساب انمق لكلذل
لسلا ماله) ةقيرلا تاقبطلا يلع يفارغوتاموركل لصفلا ةينقت لامعتساب
تايري تكبل نم ةعوم جم دض بلص طسو يف راشتنالا ةينقتب طبثمل طاشنلا دي دحت مت

Escherichia coli, Staphylococcus albus, Staphylococcus aureus, Serrati sp, Pseudomonas

sp,

:تايرطفلا ضعبو

Aspergillus niger, Penicillium sp, Condid albicans, Saccharomyces cereviseae

طبيثت ةوق يلع ارهظا ناذلل يمروفورولكلا و يلوناتيبلا صلختسمل طبثمل طاشنلا بسني
دض ةلتاقل و ومنلل ةقير عملا زيكارتل ا يندأ *S. aureus, S. albus, C. albicans, S. cereviseae*: ةيلاتل تالالسل
بلص و لئاس طسو يف فيفختل ا قيرطب ددح ةساسحل تالالسل

روفورولكلا و يلوناتيبلا صلختسمل يف ةدوجومل تاديونوفالفل نأ رهظأ CMB/CMI ةبسنلا باسح
يونيونوفالفل ةمواقم جئانتلا ترهظا ةفلتخم ةرارح تاجرد يف تابكرملا هذو ةساردب انمق ،ومنلل قير عم طاشن تاذ
م 100 دن ع اهطاشن دقت امنأ ال م 60، 40، 4، 5- ةيلاتل ا ةرارحل تاجردل

رختسمل تاديونوفالفل تابوركيملل داضمل طاشنلا يلع ءوضلا طلست اهيلع لصحتمل ا جئانتلا
تابنلا اذهل ةيجالعل ا صئاصخلا نم عسوي امم ، *S. marianum*

Nom: LAHLAH

Prénom : Fatima Zohra

Titre: EXTRACTION DES FLAVONOÏDES A PARTIR DE *SILYBUM MARIANUM* PAR LE BUTANOL ET LE CHLOROFORME ET ETUDE DE LEUR ACTIVITE SUR QUELQUES MICROORGANISMES.

Résumé

Ce travail a pour but d'étudier et de valoriser une plante sauvage largement répandue en Algérie, et de rechercher de nouveaux composés à activité antimicrobienne. Pour cela, les flavonoïdes de *Silybum marianum* sont extraits et leur effet antimicrobien a été examiné sur quelques microorganismes pathogènes humains.

Les flavonoïdes sont extraits par fractionnement par plusieurs systèmes de solvants puis séparés et identifiés par chromatographie sur couche mince (CCM).

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries-tests *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Eischerichia coli*, *Serratia sp*, *Pseudomonas sp*, et sur gélose Sabouraud pour les champignons *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*.

L'effet inhibiteur le plus élevé est obtenu par l'action des extraits butanolique et chloroformique qui ont présenté une forte activité antimicrobienne sur *S. albus*, *S. aureus*, *C. albicans* et *S. cerevisiae*.

Les concentrations minimales inhibitrices bactéricides et bactériostatiques vis à vis des germes sensibles ont été déterminées par la méthode de dilution en milieu solide et liquide.

D'après le rapport CMB/CMI, les flavonoïdes contenus dans les extraits butanolique et chloroformique ont une action bactériostatique ; l'étude de leur thermostabilité à différentes températures (-5°C, 4°C, 40°C, 60°C) a montré que les molécules restent actives 30 min tandis qu'elles deviennent inactives à 100 °C.

Ces résultats mettent en évidence les activités antimicrobiennes des flavonoïdes de *Silybum marianum*, ce qui élargit les propriétés thérapeutiques de cette plante.

Mots clés : *Silybum marianum*, flavonoïdes, extraction, activité antimicrobienne, CCM ; CMB ; CMI ; thermostabilité.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie et Environnement Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université, Constantine.