

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMARI DE TIZI OUZOU  
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES



# Mémoire

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Filière : Biotechnologie

Option : Biotechnologie Microbienne

*Thème*

**Etude phytochimique, et évaluation de activité  
antioxydante et antibactérienne de la partie  
aérienne de la plante *Raphanus sativus* L.**

**Réalisé par :**

M<sup>elle</sup> CHEKLAT Meriem.

M<sup>elle</sup> HEMDANI Lidia.

**Devant le jury composé de :**

M<sup>me</sup> BENAHMED DJILALI A. Maitre de conférences classe « A » à l'UMMTO Président

M<sup>me</sup> BENZAOUZ K. Maitre Assistante classe « A » à l'UMMTO Promotrice

M<sup>elle</sup> OUSSAID S. Maitre Assistante classe « A » à l'UMMTO Examinatrice

M<sup>me</sup> HELLAL Z. Maitre Assistante classe « A » à l'UMMTO Examinatrice

**2017/2018**

## ***Remerciements***

*Nous tenons à remercier tout d'abord le Dieu tout puissant de nous avoir donné la force et le courage pour accomplir ce travail.*

*Une grande part de notre reconnaissance s'adresse à madame BENAZZOUZ. K Maitre assistante classe A à l'UMMTO pour son encadrement très précieux, sa disponibilité, ses conseils, sa gentillesse, qu'elle trouve ici toute notre reconnaissance et notre respect.*

*Nous tenons à remercier monsieur HOUALI. K professeur à l'UMMTO de nous avoir accueillis dans son laboratoire de biochimie Analytique et de Biotechnologie (LABAB) de la faculté des sciences biologiques et des sciences Agronomiques.*

*Nos vifs remerciements vont aussi à M<sup>elle</sup> BENAHMED DJILALI. A Maitre de conférences classe A à l'UMMTO de nous avoir honoré en acceptant de présider le jury.*

*Un immense merci à M<sup>elle</sup> OUSSAID. S Maitre Assistante classe A à l'UMMTO d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un grand merci à madame HELLAL.Z Maitre Assistante classe A à l'UMMTO d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un profond merci à monsieur SEBANE.H et TITOUCHE.Y maitres assistants classe B de nous avoir accueillis dans leur laboratoire.*

*On adresse également un grand merci aux techniciens du laboratoire de microbiologie et physicochimie commun pour leur aide et leur générosité.*

*Nous ne remercions toute personne ayant participé de loin et de près à la réalisation de ce travail.*

## Dédicaces

*A l'aide d'Allah, le tout puissant, j'ai pu réaliser ce travail que je dédie*

*A Mes très chers parents, je ne saurais trouver les mots pour vous dire merci, car aucune parole ni expression ne serait suffisamment puissante pour vous exprimer mon immense gratitude et ma reconnaissance éternelle.*

*A toi, mon ami, mon accompagnant, mon enseignant, mon conseiller, mon confident et mon exemple dans cette vie, à toi qui m'a toujours montré comment faire et continuer pour arriver là où je veux. Cher papa(Brahim), que dieu te protège, et te garde pour nous.*

*A toi my best, celle qui me fait échapper les mots et expressions quand je veux parler d'elle. A la personne pour qui je dis je suis vraiment chanceuse pour avoir être ta fille à toi. Maman(sadjia), je t'aime infiniment, que dieu te garde pour nous, et qu'il m'aide à être assez reconnaissante pour tous ce que tu m'as donné.*

*A mes meilleurs sœurs du monde : Ouissam, Dalila, Lidia, qui sont aussi mes meilleurs amies je vous aime. Qui m'ont toujours appris à garder de l'espoir pour un demain qui doit toujours venir, et à ne jamais laisser tomber mes rêves. Les mots me manquent mais je suis sûre que vous me compreniez.*

*A mes deux chers petits frères: Houssine et Anis, qui m'ont toujours entouré d'amours, de respect, la vie est un paradis sur terre parce que vous y existez.*

*A ma grand-mère que dieu te garde.*

*Aux enfants de la famille que j'adore :Yanis, Amine, Anila, Manel, Melissa, Imane, Khadija.*

*A la personne qui a toujours été dans mes yeux, près de mon cœur, à l'une des rares personnes qui sont chers Ouidad Dahbi.*

*A toute la famille. A ma chère binôme Lidia, je veux te dire merci pour tous les moments inoubliables que j'ai passés avec toi, où on a beaucoup travaillé et rit, reçois tous mes remerciements et mon amitié.*

*A mes chers amies : Hayat, Rosa, Karima, Saïda, Houda, Ferial, Louisa, Sonia.*

**Meriem**

# Dédicaces

## ***A mon très cher père***

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Tu as fait plus qu'un père puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

## ***A ma très chère mère***

*Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Je t'aime plus que toute maman.*

## ***A ma grand-mère***

*Puisse Dieu, le Très Haut, t'accorder santé, bonheur et longue vie.*

## ***A mes très chères sœurs et frère***

*Souhila, Moumouh, Salima, Assia et ma petite sœur adorée Leatitia :*

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère.*

*Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite. Et sans oublier mes beaux frères et ma belle sœur.*

## ***A mes neveux que j'aime le plus Nelia & Ahcene Elyas***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.*

## ***A mon cher beau frère Toufik***

*Qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main lorsque j'avais besoin d'aide. Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse. Tu a été comme un grand frère pour moi je te souhaite tout le bonheur du monde.*

## ***A mes chères amies***

*Meriem, Louisa, Razika, Aziza, Yousra, kenza, Sonia, Celia, Siham, Dihia, Taous, Ryma, Ferial.*

***Lidia***

## Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection

AX : Amoxiciline

CN : Gentamycine

CMI : Concentration minimale inhibitrice

EAG/g.MS : Equivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche

Fox 30: Foxomycine

FRAP: Ferric reducing antioxidant power

IC<sub>50</sub>: Concentration inhibition 50%

K : Kanamicyne

mg EAG: Milligramme équivalent d'acide gallique

MH: Mueller Hinton

P : Phosphomycine

PN : Pénicilline

PPT: Polyphénols totaux

ROS: Reactive Oxygen Species

AAT: Activité Antioxydante Totale

Vit C: Vitamine C

## Liste des figures

Figure 1: Morphologie de <i>Raphanus sativus L</i> .....	4
Figure 2 : Section longitudinale de la fleur de <i>Raphanus sativus L</i> .....	4
Figure 3 : structure chimique de l'acide benzoïque.....	9
Figure 4 : Structure chimique de l'acide cinnamique .....	10
Figure 5: Structure chimique de benzo-2-pyrone (iso-coumarine) .....	10
Figure 6 : Exemple de coumarine.....	10
Figure 7 : La structure transe-resveratol.....	11
Figure 8 : La structure chimique de lignanes .....	12
Figure 9: Structure chimique des principaux aglycones des flavonoïdes.....	13
Figure 10 : Structure chimique d'anthocyanes.....	14
Figure 11: Les étapes d'obtention d'une poudre .....	22
Figure 12: Schéma illustrant l'extraction des composés phénoliques .....	29
Figure 13 : Les étapes de dosage de polyphénols totaux.....	31
Figure 14 : Protocole du test phosphomolybdate .....	33
Figure 15: Mécanismes réactionnel intervenant lors du test de FRAP entre la complexe Fe (II) et un antioxydant (AH).....	34
Figure 16 : Protocole du test de réduction du fer (FRAP).....	35
Figure 17 : Structure chimique du radical DPPH et de sa forme réduite .....	36
Figure 18 : Aspect d'extrait après filtration et après évaporation .....	41
Figure 19 : Courbe de test ATC de l'extrait hydrométhanolique et de l'acide ascorbique .....	43
Figure 20 : Courbe de test DPPH pour le pourcentage d'inhibition du l'extrait.....	44
Figure 21 : Courbe de test FRAP de l'extrait et de l'acide ascorbique .....	45

## Liste des tableaux

Tableau I : Activité biologique de quelques composés phénoliques.....	20
Tableau II : Souches bactériennes pour l'évaluation du pouvoir antibactérien de <i>Raphanus sativus L</i> et les antibiotiques de référence.....	22
Tableau III : Les dilutions d'extrait pour la détermination des CMI .....	38
Tableau IV : Les résultats de l'analyse phytochimique.....	39
Tableau V : Aspects, rendement et couleurs d'extrait phénolique.....	41
Tableau VI : Les diamètres des zones d'inhibition (moyenne $\pm$ ET) exprimés pour l'extrait hydrométhanolique de <i>Raphanus sativus L</i> .....	46
Tableau VII : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes .....	47

## Résumé :

Dans la présente étude nous avons tenté d'évaluer la plante médicinale *Raphanus sativus* L qui a été sélectionnée afin d'estimer sa composition en métabolites secondaires (composés phénoliques, flavonoïdes, tanins...etc.) et son activité antioxydante et antibactérienne.

L'analyse physicochimique a montré une teneur en eau importante, ainsi en cendre cela explique que la plante est riche en eau et en minéraux de plus son pH est peu acide.

Nous avons eu recours à des tests phytochimiques par plusieurs méthodes qualitatives basées sur des phénomènes de précipitations ou de coloration à l'aide des réactifs spécifiques. Les résultats de ce screening phytochimiques confirme la richesse de cette plante en composés phénoliques (tanins catéchiques et galliques, flavonoïdes, flavones, leucoanthocyanes, coumarines, anthocyanes, quinones combinés), en composés terpéniques (saponosides, stéroïdes, stérols), en composés azoté (alcaloïdes).

L'estimation quantitative des polyphénols totaux a montré que l'extrait hydrométhanolique de *Raphanus sativus* L. est riche en polyphénols totaux (136.6 mg GAE/ml). En outre, une évaluation de l'activité antioxydante de cette espèce vis-à-vis de FRAP (64.14%), DPPH (65.65%), TAC (61%), a montré que son extrait exhibe un pouvoir antioxydant intéressant.

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique de *Raphanus sativus* L étaient positifs sur *S. aureu* (ATCC 25923) avec un diamètre d'inhibition de 12 mm et 10 mm de Ø pour *E. coli* (ATCC 25922) et *P. aeruginosa* (ATCC 25922), par contre nous avons enregistré une faible activité contre *K. pneumoniae* (ATCC27853) avec un diamètre d'inhibition de 9 mm de Ø.

**Mot clés:** *Raphanus sativus* L. analyse phytochimique, polyphénols totaux, extrait hydrométhanolique, activité antioxydant, activité antibactérienne.

## Abstract

In the present study we tried to evaluate the medicinal plant *Raphanus sativus* L which was selected to estimate its composition in secondary metabolites (phenolic compounds, flavonoids, tannins....), its antioxidant activity, and its antibacterial activity.

The physicochemical analysis has shown significant water content, so as that explains that the plant is rich in water and minerals and its pH is low acid.

We used photochemical tests with several qualitative methods based on precipitation or staining phenomena using specific reagents. The results of this phytochemical screening confirm the richness of this plant in phenol compounds: (some catechic and gallic, flavonoids, flavones, leucoanthocyanins, coumarins, anthocyanins, quinones combined), in terpene compounds: (saponosides, steroids, sterols), and alcaloides.

Quantitative estimation of total polyphenols (by the Folin-Ciocalteu method), showed that the hydromethanic extract of *Raphanus sativus* L (136.6 mg GAE/ml). In addition, an evaluation of the antioxidant activity of this species vis-à-vis FRAP, DPPH, TAC has shown that its extract exhibits an interesting antioxidant power suggesting their use in agri-food, cosmetics and pharmaceutical industry. The antibacterial activity of the extract was evaluated by the diffusion method on agar medium with respect to four reference bacterial strains; three negative grams: (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiellapneumoniae*, *Escherichia coli*), and a positive gram (*Staphylococcus aureus*), the results show antibacterial activity of the extract. However, the best activity was obtained with *S.aureus* (12 mm). Minimum inhibitory concentrations of the extracts not revealed antibacterial properties by the dilution method in solid medium.

**Keywords:** *Raphanus sativus* L, photochemical analysis, antioxidants activity, FRAP, DPPH, TAC, antibacterial activity, CMI.

# Table des matières

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Liste des tableaux

## Résumé

Introduction .....	1
--------------------	---

## Première partie : Recherches bibliographiques

### Chapitre I : Généralités sur le radis (*Raphanus sativus* L.)

I.1. Présentation .....	2
I.2. Origine et répartition de la plante.....	2
I.3. Systématique de <i>Raphanus sativus</i> L. ....	3
I.4. Description .....	3
I.5. Conditions pédoclimatiques .....	5
I.6. Différents variétés du radis .....	5
I.7. Composition chimique et valeur nutritionnelle.....	6
I.7.1. Les principes actifs de <i>Raphanus sativus</i> L .....	6
I.7.2. Valeur nutritive .....	7
I.8. Propriétés pharmacologique de la plante .....	7

### Chapitre II : Généralités sur les métabolites secondaires

II.1. Introduction.....	8
II.2. Classification de métabolites secondaires .....	8
II.2.1. Les composés phénoliques .....	8
II.2.1.1. Les acides phénoliques simples.....	9
II.2.1.1.1. Acide phénoliques dérivés de l'acide benzoïque .....	9
II.2.1.1.2. Acide phénoliques dérivés de l'acide cinnamique .....	9
II.2.1.2. Coumarine .....	10
II.2.1.3. Les stilbènes .....	11
II.2.1.4. Les lignanes .....	11
II.2.1.5. Les flavonoïdes .....	12
II.2.1.6. Les anthocyanes .....	14

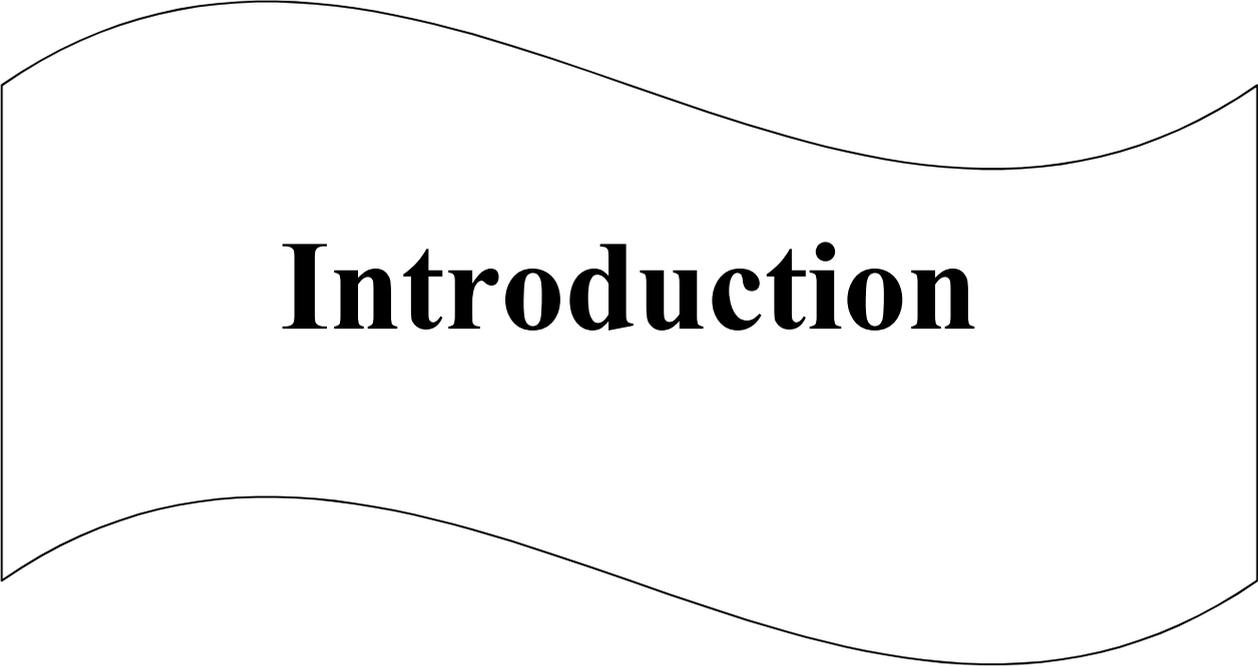
II.2.1.7. Tannins .....	14
II.2.2. Les stéroïdes et les terpènes .....	15
II.2.2.1. Les stéroïdes .....	15
II.2.2.2. Les Terpènes .....	15
II.2.3. Les composés azotés .....	16
II.2.3.1. Les alcaloïdes .....	16
II.3. Propriété antioxydante .....	17
II.3.1. Les radicaux libres .....	17
II.3.1.1. Les principaux antioxydants naturels .....	17
II.3.1.2. Mécanisme d'action des antioxydants .....	18
II.4. Activité antimicrobienne .....	18

## **Deuxième partie : Partie expérimentale**

### **Chapitre III : Matériels et méthodes**

III.1. Matériels .....	21
III.2. Matériels biologique .....	21
III.2.1. Matériels végétal .....	21
III.2.2. Souches microbienne .....	21
III.3. Méthodes d'analyse .....	22
III.3.1. Séchage à l'air libre .....	22
III.4. Caractérisation physicochimique de la plante sèche .....	23
III.4.1. Détermination de la teneur en eau .....	23
III.4.2. Détermination de la teneur en cendre .....	23
III.4.3. Mesure du pH .....	24
III.5. Analyse phytochimique de <i>Raphanus sativus</i> L. ....	24
III.5.1. Préparation de l'infusée .....	25
III.6. Détermination de la teneur en polyphénols (PPT) .....	29
III.6.1. Extraction des polyphénols .....	29
III.6.2. Calcul du rendement en polyphénols .....	29
III.6.3. Le dosage de polyphénols .....	30
III.7. Test de l'activité antioxydante .....	31
III.7.1. Test de capacité antioxydante totale .....	32

III.7.2. Test de la réduction de fer (FRAP) .....	34
III.7.3 .Test de piégeage du radical libre DPPH.....	36
III.8. Test de l'activité antibactérienne .....	37
III.8.1. Evaluation de l'activité antibactérienne .....	37
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	
IV.1 Résultats d'analyse physicochimiques .....	39
IV.2 Résultats d'analyses Phytochimiques.....	39
IV.3 Le rendement en polyphénols .....	41
IV.4 Résultat du dosage de polyphénols .....	42
IV.5 Résultat de l'activité antioxydante .....	42
IV.5.1 Capacité antioxydante total .....	43
IV.5.2 Réduction de radical DPPH .....	44
IV.5.3 Test réducteur du fer(FRAP).....	45
IV.6 Résultat d'analyse de l'activité antibactérienne .....	46
IV.6.1 Caractères microscopiques et macroscopique de micro-organismes testés .....	46
IV.6.2 Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait hydrométhanolique.....	46
<b>Conclusion .....</b>	<b>49</b>
Références bibliographiques	
Annexes	



# **Introduction**

### Introduction

Face au phénomène grandissant de l'émergence et de la réémergence des maladies dans le monde, les pays en développement sont les plus vulnérables. Ainsi, les maladies infectieuses constituent une préoccupation importante de santé publique à cause de leur fréquence et de leur gravité dans ces pays (TRAORE *et al.*, 2012).

Les agents responsables de ces infections sont divers et variés comprenant aussi bien les champignons, les bactéries, les protozoaires et les virus. Pour lutter contre ces agressions microbiennes, le monde scientifiques à développer de nombreux traitement pour soulager les patients (TRAORE *et al.*, 2012). Cependant l'acquisition de ces médicaments s'avère extrêmement difficile à cause des couts élevés et rend l'accessibilité aux soins médicaux

la médecine traditionnelle.

Effectivement, les plantes sont utilisées depuis la préhistoire par l'homme pour des besoins nutritionnelles et thérapeutiques et sont la source majeure de drogues à cause de leur richesse en métabolites secondaires (KONATE *et al.* 2011 ; NOSTRO *et al.* 2000 ; NSIAKOUÉ *et al.*, 2013).

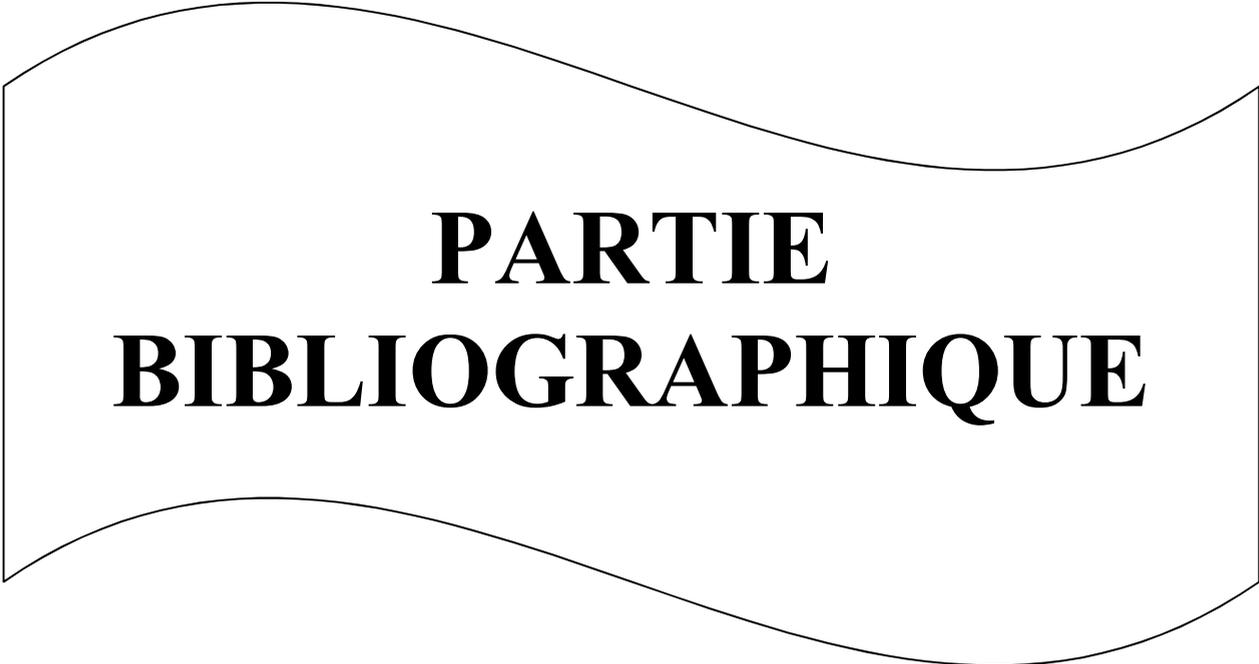
La communauté scientifique s'est orientée vers les substances d'origines naturelles notamment les plantes médicinales dans l'optique de trouver des nouvelles molécules qui contribueront non seulement à lutter de façon efficiente aux affections microbiennes mais également de valoriser la médecine traditionnelle.

Notre choix s'est dirigé vers la plante *Raphanus sativus L* qui fait partie delà famille de Brassicaceae, elle est connu pour ses propriétés thérapeutiques dont antispasmodiques, antioxydante, laxative...etc.

Les vertus thérapeutiques du radis sont bien connues, surtout dans la campagne pour soigner la coqueluche (ROSFELD et GETTY, 2008).

Notre étude a pour objectif de déterminer la composition de la partie aérienne (feuilles et tige) en métabolites secondaire, et d'évaluer l'activité antimicrobienne et antioxydante de cette plante.

Notre travaille est subdivisé en quatre chapitres, le premier traite la plante *Raphanus sativus L.*, le deuxième détermine les métabolites secondaires, le troisième chapitre matériels et méthodes, le quatrième chapitre résultats et discussions.



**PARTIE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

# **Chapitre I**

## **Généralités sur *Raphanus sativus* L.**

**I.1. Présentation**

Le radis, est une plante annuelle ou bisannuelle de la famille des moutardes, cultivée pour sa grande racine pivotante succulente. Le radis commun est probablement d'origine asiatique ou méditerranéenne et est cultivé dans le monde entier.

*Raphanus raphanistrum* L. est l'ancêtre plus que probable de l'espèce polymorphique *Raphanus sativus* (SHIPPER, 2004).

Les romains disposaient de trois noms différents pour désigner le gros radis : armoracia, radix et *Raphanus armoracia* dérive du grec. Mis à part l'espagnol Remolacha qui a pris le sens de betteraves, tous ses descendants sont des noms locaux qui désignent de gros radis. En dehors de l'Italien ramolaccio (CHAUVET, 2007).

Le radis fait partie, de la famille des crucifères. Aujourd'hui cette famille est appelée Brassicacées, nom qui vient de brassica, c'est-à-dire du chou. Cela signifie que ses fleurs ont quatre pétales disposés en croix, forme typique de cette famille (SHIPPER, 2004).

**I.2. Origine et répartition du *Raphanus Sativus* L.**

L'aire de diversité maximale du radis se situe entre l'est de la Méditerranée et la mer caspienne, qui est probablement le centre d'origine de cette espèce.

Le radis était déjà cultivé dans les temps anciens dans la Méditerranée, de là s'est diffusé en chine avant J-C et au japon après J-C. Sa variabilité diminue graduellement de la mer caspienne jusqu'à la chine, et encore plus vers le japon, c'est aussi une espèce cultivée depuis les temps anciens dans les oasis du Sahara et au Mali.

Le radis peut maintenant se trouver comme plante cultivée à travers le monde sous de nombreuses formes différentes, allant de petites plantes annuelles à des bisannuelles à grosses racines charnues (SHIPPER, 2004).

**Systématique de *Raphanus sativus* L.**

Selon Cronquist, 1981 la classification du radis est la suivante :

Règne :	Plantae
Sous règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Dilleniidae
Ordre :	Capparales
Famille :	Brassicaceae
Genre :	<i>Raphanus</i>
Espèce :	<i>Sativus</i>

**I.4. Description botanique de la plante**

Les radis cultivés sont considérés comme des plantes annuels. Cependant, les grosses variétés tardives devraient plutôt être classées en bisannuelles. Les graines sont rougeâtres, arrondies ou un peu allongées, avec des faces ordinairement un peu aplaties. Les feuilles sont de forme obovales et peuvent être sinueuses, crénelées, dentées ou dentelées ; les feuilles situées à la périphérie sont à limbes entiers, les feuilles centrales peuvent être fortement découpées en lobes. Les tiges florales de 50 à 80 Cm sont rameuses, dressées et creuses (figure 1) (BOUCOURT *et al.*, 1995) .

Les fleurs du radis, typique de celle des Brassicaceae sont constituées de 4 sépales, 4 pétales (blanc rosés), de 6 étamines et d'un ovaire formé de 2 carpelles, elles sont disposées en une panicule lâche aux extrémités des tiges ou hampes florales. Les nectaires sont situés à la base des étamines (figure 2) (MC GREGOR ,1976).

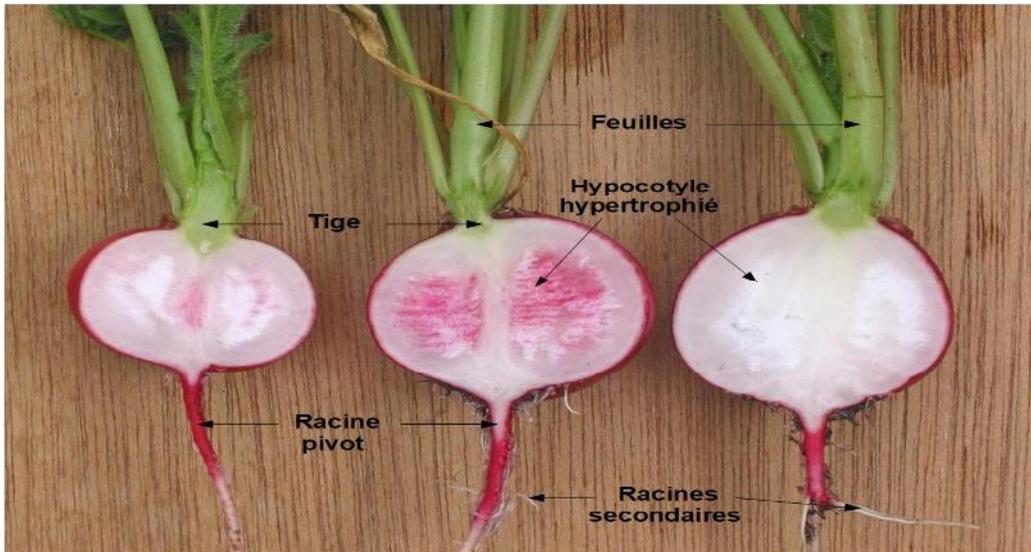


Figure 1: Morphologie d'un tubercule de radis. (Anonyme 1).

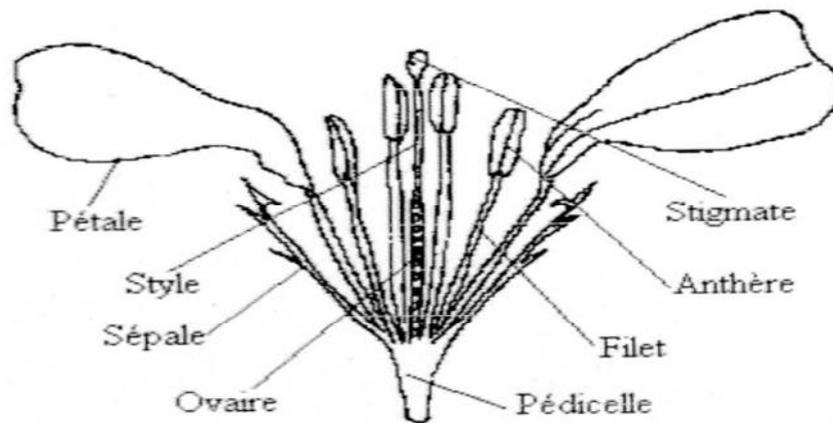


Figure 2: Section longitudinale de la fleur de *Raphanus sativus* (Gregor, 1976).

Les fleurs de l'espèce *Raphanus sativus* L. sont complètes, bisexuées, c'est-à-dire avec un mâle fonctionnel (androcée) et une femelle (gynécée) (Anonyme 2)

### **I.5. Conditions pédoclimatiques**

En général, les Brassicacées demandent un sol profond, pourvu en matière organique gardant bien l'humidité.

Afin d'éviter les risques de maladies et parasites la culture ne doit pas se succéder à elle-même ni à aucune autre culture de la même famille pendant au moins 4-5 ans, de plus elle ne doit pas être implantée à proximité d'une autre culture de la même famille.

Les Brassicacées supportent en général assez mal la chaleur et la sécheresse, particulièrement au moment de la floraison (ce sont des plantes printanières qui démarrent tôt et fleurissent tôt).

Elles sont exigeantes en soufre. Elles sont également sensibles, surtout au stade jeune, à l'altise, insecte sauteur de 2 à 5 mm qui se nourrit de cotylédons et de jeunes feuilles en les criblant de trous et qui peut entraîner de sérieux dégâts voire détruire une jeune culture.

Une chaleur excessive et une attaque d'altises vont entraîner une diminution de la quantité et la qualité des graines récoltées (Anonyme 3, 2013).

### **I.6. Différentes variétés du radis**

D'après MAZOLIER (2009), il existe plusieurs variétés du radis

- **Le demi-long rouge à bout blanc:** le plus courant. On distingue 2 aspects : à petit bout blanc et à grand bout blanc.
- **Le rond rouge:** moins cultivé, risque d'éclatement plus important, feuillage plus court.
- **D'autres types sont parfois cultivés :** rond rouge à bout blanc (National), rond rose, cylindrique rose (Gaudry).
- **Radis d'hiver :** radis noir très allongé et assez volumineux. (MAZOLIER, 2009).

**I.7. Composition chimique et valeur nutritionnelle**

Les plantes produisent une gamme étonnante de produits chimiques organiques avec une énorme diversité de types structuraux. Ces produits naturels sont synthétisés à travers un réseau diversifié de voies biochimiques, dont la plupart appartiennent au métabolisme secondaire (CSEK *et al.*, 2006).

**I.7.1. Principes actifs de *Raphanus sativus* L.**

- **Les antioxydants**

Le radis renferme différents types d'antioxydants, composés qui protègent les cellules du corps des dommages causés par les radicaux libres et préviendraient le développement de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies liées au vieillissement.

Le radis rouge contient des anthocyanines, principalement les pelargonidines, tandis que le radis blanc renferme du Kaempférol (un flavonol). Les différentes variétés de radis contiennent aussi la peroxydase, une enzyme antioxydante.

Ces composés ont démontré *in vitro* et chez l'animal des effets prometteurs pour la prévention du cancer (MANSFELD, 2011).

- **Les glucosinolates**

Comme la majorité des légumes crucifères, le radis renferme des glucosinolates qui ont la capacité de se transformer en molécules actives (des isothiocyanates) lorsque l'aliment qui en contient est haché, mastiqué ou au contact de la flore bactérienne intestinale. La cuisson des légumes crucifères entraîne cependant une perte de glucosinolates dans l'eau de cuisson.

Le radis noir renferme de deux à cinq fois plus de glucosinolates que certaines variétés de radis rouges ou blancs. Plusieurs de ces molécules contribueraient à limiter le développement de certains cancers (MANSFELD, 2011).

- **Méthylidogermabullone :**

Des chercheurs ont identifié un composé présent dans la racine du radis, le méthylisogermabullone, qui aurait la propriété d'accentuer la motilité intestinale chez

l'animal. Ces travaux pourraient expliquer l'emploi du radis en médecine traditionnelle (MANSFELD, 2011).

### **I.7.2. Valeur nutritive**

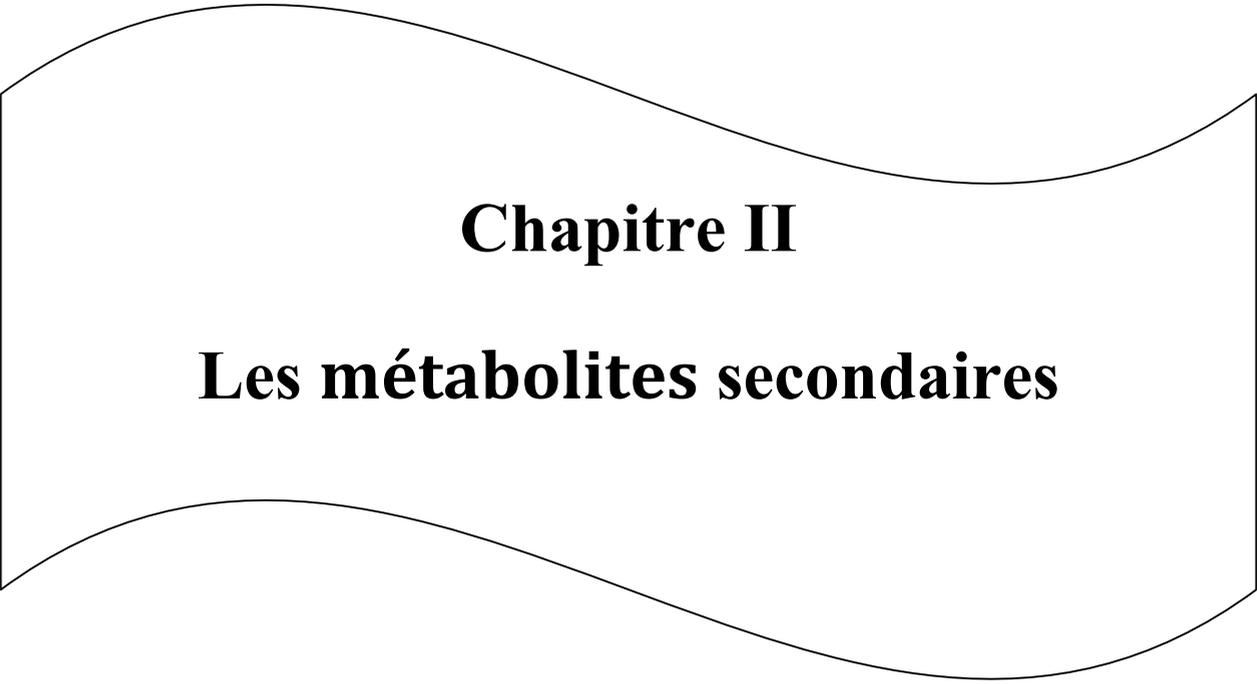
Peu énergétique, les radis roses fournissent à peine 15 calories pour 100g, ce qui les place parmi les aliments les moins énergétiques. Les protéines et les lipides n'étant présents qu'à l'état de traces, ce sont les glucides (2,5 à 3,5g) qui apportent l'essentiel des calories, constitués en majorité par les sucres simples (glucose et fructose).

Les radis présentent aussi une haute densité en minéraux et oligo-éléments pour 100 calories. Ils fournissent 1620mg de potassium, 133mg de calcium, 47mg de magnésium, 5,3 de fer, cela leur confère d'intéressantes propriétés reminéralisantes. Les radis constituent également une bonne source de vitamine C puisqu'ils en apportent en moyenne 23mg aux 100g (MANSFELD, 2011).

### **I.8. Propriétés pharmacologiques de la plante**

Les vertus thérapeutiques du radis sont bien connues, surtout à la campagne où l'on a depuis longtemps recours à ce tubercule pour soigner la coqueluche et la toux opiniâtre et d'irritation, connu aussi comme expectorantes, antispasmodiques, laxatives, cholagogues. Il semble que, consommé comme aliment, le radis ait la faculté d'éliminer et de prévenir les calculs rénaux et de stimuler la fonction digestive.

Contenant un puissant révulsif, cette plante soigne efficacement les sciaticques les plus rebelles extrêmement vénéneuse quand elle est fraîche, elle perd sa toxicité avec le séchage (ROSENFELD *et al.*, 2008).



## **Chapitre II**

### **Les métabolites secondaires**

**II.1. Introduction**

À côté des métabolites primaires classiques (glucides, protides et lipides), les végétaux accumulent fréquemment des métabolites dits « secondaires » qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (HERBERT, 1989). Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes, parmi lesquels, on cite les composés phénoliques, les terpènes les stéroïdes, et les composés azotés dont les alcaloïdes (BRUNETON, 1999). Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés, qui possèdent une très large gamme d'activité biologique (Li, 2007). Les métabolites secondaires sont réputés par leurs activités biologiques nombreuses comme antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques, analgésiques, anti-inflammatoires, diurétiques, gastro-intestinales et antioxydante (HARBORNE, 1998; BRUNETON, 2009).

Les métabolites secondaires des plantes constituent un groupe diversifié de composés chimiques d'origine naturelle qui n'ont généralement aucune fonction primaire évidente en ce qui a trait à la croissance des cellules de la plante. Ils sont synthétisés par la plante en réaction à des stimuli extérieurs et ont souvent une fonction régulatrice dans le cadre d'une série de réactions physiologiques et métaboliques en cascade à la suite d'un stress environnemental ou d'une attaque par des ravageurs (BRANDT *et al.*, 2001).

**II.2. Classification de métabolites secondaires****II.2.1. Les composés phénoliques**

Les composés phénoliques sont des métabolites secondaires végétaux. Ils peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes (d'où la dénomination de métabolites secondaires). Par opposition aux métabolites primaires qui alimentent les grandes voies du métabolisme basal, mais ils sont essentiels dans l'interaction de la plante avec son environnement.

Ces composés ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (URQUIAGEA et LEIGHTON, 2000). La structure des composés phénoliques naturels varie depuis les molécules simples (acides phénoliques simples) vers les molécules les plus hautement polymérisées (tanins condensés) (MACHEIX *et al.*, 2005). Avec plus de 8000 structures phénoliques identifiées

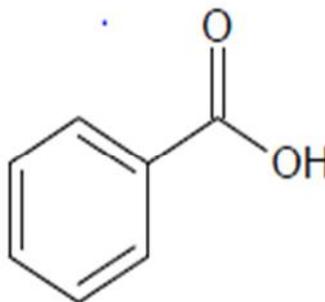
(URQUIAGA et LEIGHTON, 2000). D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on trouve chez les plantes médicinales. Chez l'homme, ces molécules traces jouent un rôle important en agissant directement sur la qualité nutritionnelle des fruits et légumes et leur impact sur la santé des consommateurs (effet antioxydant, effet protecteur contre l'apparition de certains cancers...) (MACHEIX *et al.*, 2005).

### II.2.1.1. Les acides phénoliques simples

Le terme d'acide phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique.

#### II.2.1.1.1. Acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque

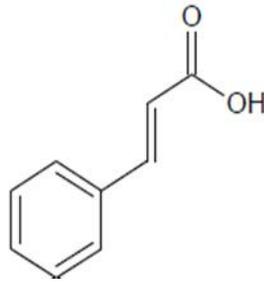
Les acides phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre que combinés à l'état d'ester ou d'hétéroside (figure 3). L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique (BRUNETON, 1999).



**Figure 3** : Structure chimique de l'acide benzoïque (BELAICHE, 1979)

#### II.2.1.1.2. Acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique

La plupart des acides phénols en C6-C3 (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large, les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents (BRUNETON, 2009). Les acides cinnamiques et caféique sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation (figure 4) (COWAN, 1999).

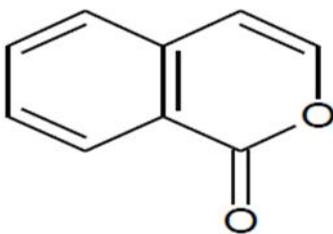


**Figure 4 :** Structure chimique de l'acide cinnamique (BELAICHE, 1979)

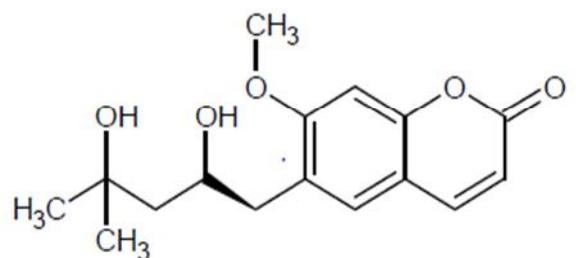
### II.2.1.2. Coumarines

Les coumarines qui sont aussi les dérivés de C6-C3, appartiennent au groupe des composés connus par des benzo- $\alpha$ -pyrone (figure 5) (O'KENNEDY et THORMES, 1997) et toutes sont substituées en 7 par un hydroxyle (figure 6). Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combiné avec des sucres. Elles sont responsables de l'odeur caractéristique du foin (COWAN, 1999).

- Les coumarines dérivent des acides hydroxycinnamiques par cyclisation interne de la chaîne latérale.
- Les coumarines ont fréquemment un rôle écologique ou biologique, En outre, les coumarines présentent des activités cytotoxiques, antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, vasodilatatrices, anticoagulantes, hypotensives. Elles sont aussi bénéfiques en cas d'affections cutanées (GONZALEZ-GALLEGO *et al.*, 2007).



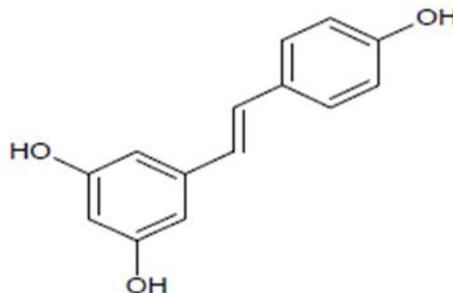
**Figure 5:** Structure chimique de Benzo-2-pyrone (iso-coumarine) (GONZALEZ-GALLEGO *et al.*, 2007).



**Figure 6:** Exemple de coumarine (GONZALEZ-GALLEGO *et al.*, 2007)

### II.2.1.3. Les stilbènes

Présentent une structure en C6-C2-C6, avec un cycle A portant deux fonctions hydroxyles en position méta et un cycle  $\beta$  portant des fonctions hydroxyles ou méthoxyles en méta, ortho et para. Les deux noyaux aromatiques sont reliés par un double liaison, formant un système conjugué (figure 7). Cette particularité leur confère une grande réactivité due à la délocalisation des électrons  $\pi$  sur la totalité de la molécule. Les stilbènes se trouvent en petites quantités dans l'alimentation humaine (BELKHIRI, 2010). Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés, méthylés, esterifiés, glycosylés ou même prenylés. Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques (JEAN-DENIS, 2005).

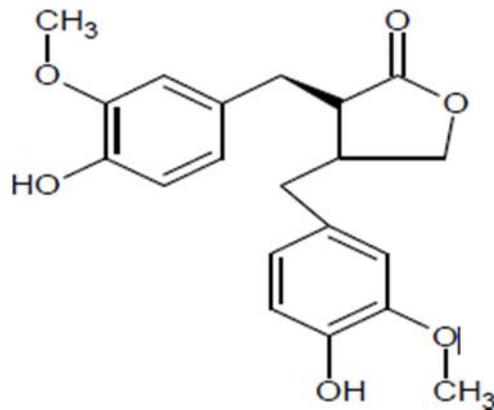


**Figure 7:** Structure chimique du trans-resveratol (FLEURIET *et al.*, 2005)

### II.2.1.4. Les lignanes

Les lignanes répondent à une représentation structurale de type (C6-C3)<sub>2</sub> l'unité (C6 - C3) (figure 8) est considérée comme un propylbenzène. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs, non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame et en faibles concentrations dans les fruits et les légumes (PETERSON, 2010).

Il ont été définis comme étant les dimères des phénylpropanoïdes où deux unités de phénylpropane C6-C3 sont liées par leur 8 carbones (SAINVITU *et al.*, 2010). Ils proviennent de la condensation initiale de deux molécules phénoliques de type monolignol comme l'alcool coniférylique (MUANDA, 2010). Ce sont des substances phénoliques apparentées aux lignines, ils n'ont guère de valeur alimentaire humaine. Ils sont présents dans la plante sous forme de glucosides (DESCHEE, 2003).

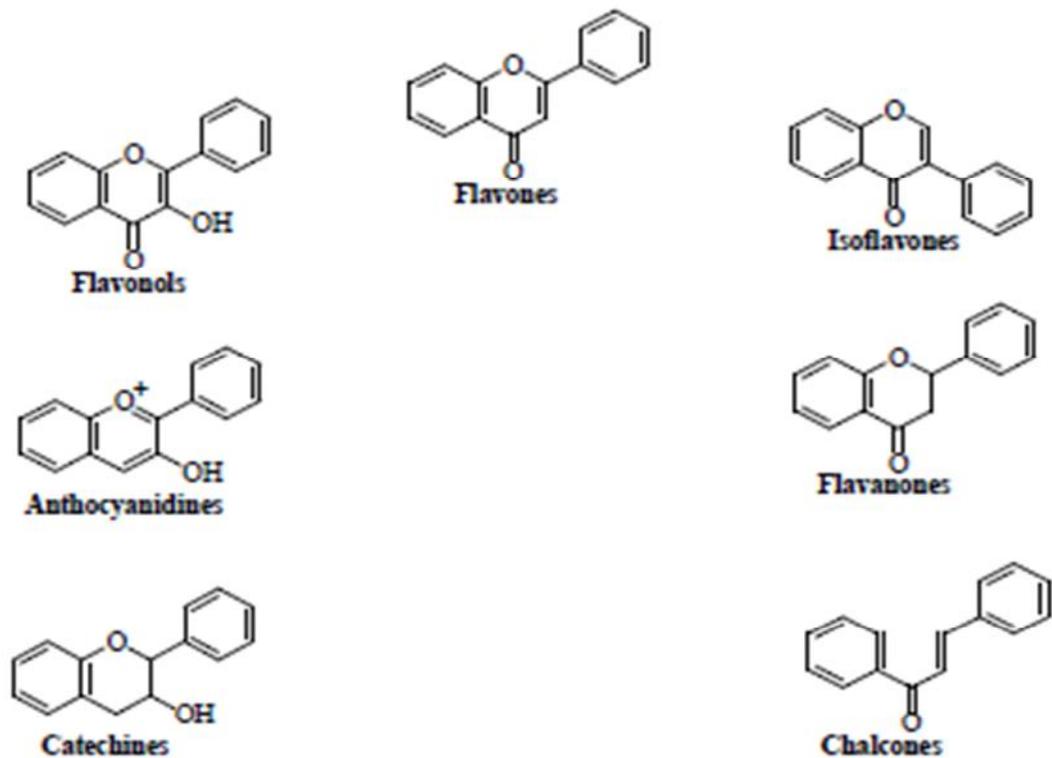


**Figure 8:** Structure chimique de lignanes (JUTIVIBOONSUK, 1968)

#### II.2.1.5. Les flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ils sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>). Ces composés existent sous forme d'aglycones (génines) ou sous forme de glycosides et plus de 4000 structures sont connues à ce jour (GERT et STEPHANE, 2001). Les principaux aglycones sont représentés dans la figure 9. Tous les flavonoïdes peuvent être regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central (BRUNETON, 1999).

Les flavonoïdes les plus étudiés appartiennent aux groupes des flavones, des flavonols, en particulier, la quercétine et son hétéroside la rutine, mais aussi à ceux des flavanes, flavanones et chalcones.



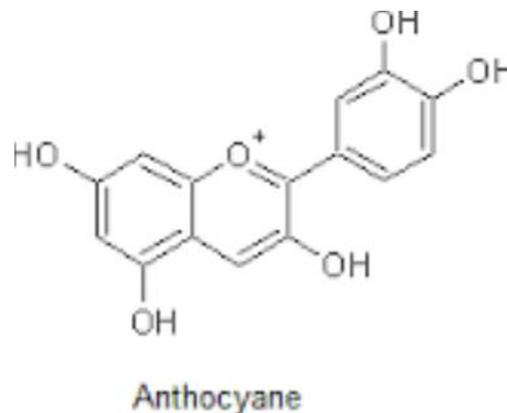
**Figure 9:** Structure chimique des principaux aglycones des flavonoïdes (BRUNETON, 1993).

D'après BRUNETON (1993), on peut remarquer que :

- ❖ Les **flavones** sont des 2-phénylchromones, incolores ;
- ❖ Les **isoflavones** sont des 3-phénylchromones, beaucoup moins répandues que les flavones ;
- ❖ Les **flavonols** sont des 3-hydroxyflavones. Ce sont des pigments végétaux que l'on trouve souvent sous forme de glycosides ;
- ❖ Les **flavanones** sont des 2,3-dihydroflavones ;
- ❖ Les **chalcones** sont des isomères des flavanones avec ouverture du noyau pyronique entre les positions 1 et 2 ;
- ❖ Les **anthocyanidols** sont des dérivés réduits des flavonols avec formation d'un oxonium ;
- ❖ Les **flavanes** ou catéchines sont également des produits de réduction, au moins formellement, des flavonols.

### II.2.1.6. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des composés hydrosolubles, de teinte rouge, violette ou bleue, qui colorent les fleurs, les fruits et parfois les feuilles. Les anthocyanes sont présents dans la nature uniquement sous forme d'hétérosides appelés anthocyanosides. Ces pigments sont très répandus dans le règne végétal et proche de flavonoïdes sur le plan de l'origine, de la structure et la propriété pharmacologique (figure 10) (RIBEREAU *et al.*, 1968)



**Figure 10:** La structure chimique d'Anthocyane (RIBEREAU *et al.*, 1968)

### II.2.1.7. Les Tannins

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structures variées, ayant en commun la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de rendre imputrescible. Ces substances ont en effet la propriété de se combiner aux protéines, ce qui explique leur pouvoir tannant. Très répandus dans le règne végétal ils peuvent exister dans divers organes, mais on note une accumulation plus particulièrement dans les tissus âgés ou d'origine pathologique. Ils sont localisés dans les vacuoles, quelques fois combinés aux protéines et aux alcaloïdes. On distingue: les tanins hydrolysables et les tanins condensés (ROUX *et al.* 2007).

- les tanins hydrolysables : ils sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement scindés par les enzymes de tannases en oses et en acide phénols, selon la nature de celui-ci on distingue : les tanins galliques et les tanins ellagiques.
  - ✓ tanins galliques: ils donnent par l'hydrolyse des oses et de l'acide gallique.
  - ✓ tanins ellagiques : ils sont scindés par les enzymes en oses et en acide ellagiques.

- les tanins condensés : ce sont des prothoanthocyanidine, c'est-à-dire des composés polyphénoliques hétérogènes : dimères, oligomères ou polymères de flavones flavon-3-ols, 5-dioxy-3,4-diols. Les tanins condensés sont des molécules hydrolysables, leur structure voisine de celle des flavonoïdes est caractérisée par l'absorbance du sucre (BOUDJOUREF, 2011).

Les tanins sont largement répandus dans les organismes végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les graines de céréales et diverses boissons. Dans l'alimentation humaine, les sources les plus importantes de tannins sont le vin et le thé (PENICAUD, 2009).

## **II.2.2. Les stéroïdes et les terpènes**

### **II.2.1. Les stéroïdes**

Les stéroïdes ne sont pas des terpènes mais des composés de biodégradation de triterpènes. Ils constituent une classe de composés abondamment présent dans la nature (règne animal et végétal). Le squelette de base des stéroïdes comprend 17 atomes de carbone inclus dans un système tétracyclique.

Le squalène est le précurseur de tous les triterpènes (carotènes, stéroïdes et autres). Ce dernier est un composé achiral, formé par dimérisation réductive du pyrophosphate de farnésyle, il subit une époxydation enzymatique pour conduire à un seul énantiomère de l'époxyde correspondant présentant un seul centre chiral (ODILE et ROUX, 2011).

### **II.2.2. Les Terpènes**

Les terpènes ou les isoprénoïdes, ou les terpénoïdes, représentent le groupe le plus ancien de petits produits moléculaires synthétisés par des usines et sont probablement le groupe le plus répandu des produits naturels. Ce sont des constituants habituels des cellules végétales, impliqués ou non dans des fonctions métaboliques essentielles (LAMARTI et *al.*, 1994).

Les terpènes sont présents chez tous les êtres vivants et possèdent des structures, des propriétés physiques et chimiques, et des activités biologiques très diverses.

Plusieurs d'entre eux sont exploités à l'échelle industrielle (industrie des cosmétiques et des parfums, industrie du caoutchouc, industrie agroalimentaire pour les arômes et les colorants alimentaires...etc.) (MINKUE, 2000). Parmi eux, certains sont des substances

odorantes, comme par exemple le menthol et thymol, provenant d'huiles essentielles extraites respectivement de feuilles de menthe et de fleurs de thym. Le myrcène est un constituant du houblon et le sclaréol est notamment utilisé en parfumerie pour la synthèse de l'ambre gris. D'autres isoprénoïdes possèdent des rôles physiologiques très importants. Les ubiquinones et les ménaquinones permettent le transport d'électrons lors des processus respiratoires. La vitamine E, connue pour son action anti-oxydante, stabilise *in vitro* les acides gras insaturés et les protège en empêchant leur peroxydation par piégeage des radicaux libres (ODILE et ROUX, 2004).

### **II.2.3. Les composés azotés**

Les alcaloïdes sont les composés azotés les plus connus. Ils ont une distribution restreinte car ils sont rencontrés chez 20% des angiospermes seulement. En plus des alcaloïdes, on trouve dans ce groupe les acides aminés non protéiques, les glucosides cyanogéniques et les glucosinolates (WALTON et BROWN, 1999).

#### **II.2.3.1. Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale, azotées, basiques donnant des réactions de précipitation avec certains réactifs (appelés réactifs des alcaloïdes) et doués à faible dose, de propriétés physiologiques marquées.

Sur le plan chimique il constitue un groupe très hétérogène possédant cependant quelques propriétés physicochimiques communes.

On les rencontre chez de nombreux végétaux, ils peuvent être présents dans tous les organes. Une plante renferme rarement un seul alcaloïde ; en général on a un mélange d'alcaloïdes de constitution plus ou moins apparentée ou l'un d'entre eux domine. Les alcaloïdes existent rarement à l'état libre dans la plante, mais le plus souvent ils sont combinés à des acides organiques ou à des tannins. Leur teneur est très variable, généralement comprise entre 0.1 et 2 à 3% du poids sec de la drogue (ODILE et ROUX, 2004). Ils présentent des propriétés pharmacologiques marquées, ils ont de nombreuses utilisations en thérapeutique, notamment au niveau du système nerveux central et du système cardiovasculaire (YINYANG et *al.*, 2014). De nombreux travaux ont d'ailleurs montré l'intérêt des alcaloïdes dans l'activité antiplasmodiale, antispasmodique, anticancéreuse, antimycobactérienne. Leurs effets laxatif et anti-rhumatismal, antalgique et analgésique ont

aussi été révélés (SANTHOSH et SURIYANARAYANAN, 2014 ; YINYANG *et al.*, 2014). Ces nombreuses activités conduisent à une utilisation importante des drogues à alcaloïdes, soit sous forme de préparations galéniques, soit, le plus souvent, pour l'extraction des alcaloïdes qu'elles renferment (GAZENGEL et ORECCHIONI, 2013).

### **II.3. Les propriétés antioxydante**

#### **II.3.1. Les radicaux libres**

L'oxygène est la source de vie pour les organismes aérobies. Mais l'oxygène peut être également une source d'agression pour ces organismes (EKOUMOU, 2003). (En effet des dérivés hautement réactifs de l'oxygène peuvent apparaître au cours des réactions enzymatiques ou sous l'effet des rayons U.V, des radiations ionisantes et de métaux de transition. Les formes de l'oxygène provoquant ces troubles sont: l'oxygène singulet  $O_2$ , le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , les peroxydes alkyles ROOH, le radical superoxyde  $O_2$ , les radicaux hydroxyles HO, peroxydes ROO et alkoxydes RO (CAVIN, 1999). Les conséquences au niveau de l'organisme se font ressentir sur l'ADN, les lipides et les protéines (AHAMET, 2003).

Les propriétés des antioxydants découlent de la présence des noyaux aromatiques, à doubles liaisons conjuguées et les groupements hydroxyles permettant le piégeage des radicaux libres (KNERT *et al.*, 2002). Ils permettent de maintenir la qualité du produit et d'augmenter la durée de conservation de ce dernier. Ils peuvent retarder la peroxydation des lipides et de minimiser efficacement les rancissements. L'antioxydant naturel doit être efficace à faible dose, non toxique, soluble dans les graisses et stable dans le produit fini (POKNORY *et al.*, 2001).

##### **II.3.1.1. Les principaux antioxydants naturels**

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants *in vivo* ont été proposées. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les œstrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E...etc. Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres.

Quelques exemples d'antioxydants naturels :

- **Acide ascorbique : Vitamine C**

La vitamine C est un antioxydant puissant. Elle participe dans les réactions avec la vitamine E et l'enzyme glutathion peroxydase pour la neutralisation des radicaux libres (CHEICK TRAORE, 2006). La vitamine C agit principalement en piégeant directement les ROS (majoritairement l'O<sub>2</sub> et l'ONOO<sup>-</sup>). Il est présent dans les légumes, le chou, le poivron et les agrumes (COLETTE E, 2003). Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E (BOSSOKBI, 2002).

- **Vitamine E**

La vitamine E prévient la peroxydation des lipides membranaires in vivo en captant les radicaux pyroxyles. Elle est présente dans les huiles végétales (huiles d'arachide, de soja, de chardon, de tournesol et d'olive pressées à froid) ainsi que dans les noix, les amandes, les graines, le lait, les œufs, et les légumes à feuilles vertes (AHAMET, 2003). Elle joue un rôle préventif dans le développement des cancers et sur le vieillissement (CHEICKTRAORE, 2006).

### **II.3.1.2. Mécanisme d'action des antioxydants**

D'une manière générale, en s'oxydant lui-même plus rapidement qu'un autre, un antioxydant pourra empêcher l'oxydation d'un autre substrat. Un tel effet résulte d'une structure de donneurs d'atomes d'hydrogène ou d'électrons souvent aromatiques, cas des dérivés du phénol. Les antioxydants interviennent en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un autre acide gras (BERSERT et CERVELIER, 1996).

### **II.4. Activité antimicrobienne**

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

La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents a entraîné la sélection de souches multirésistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base des plantes, sous forme de métabolites secondaires dont les composés phénoliques, sont toujours utilisés dans l'industrie alimentaire et cosmétique et comme agents antimicrobiens en médecine populaire.

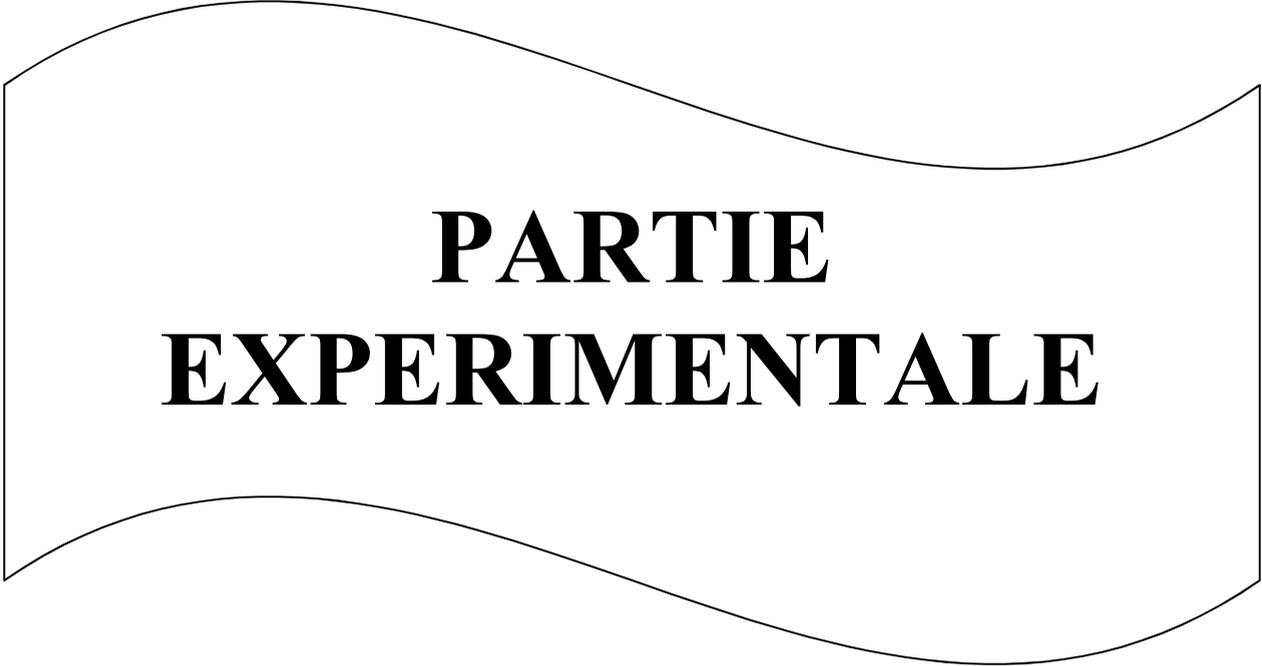
Les phénols notamment les flavonoïdes et les tannins sont reconnus par leur toxicité vis-à-vis des microorganismes. Le mécanisme de toxicité peut être lié à l'inhibition des enzymes hydrolytiques (les protéases et les carbohydrolases) ou d'autres interactions pour inactiver les adhésines microbiens, les protéines de transport et d'enveloppe cellulaire (HAMIDI, 2013).

Les flavonoïdes montrent une activité antimicrobienne, exemple des travaux de HARIKRISNNA *et al.* (2004), ont démontré le pouvoir antimicrobien d'un flavonoïde glycoside " prunine-6"-O-pcoumarate" contre deux souches de bactéries Gram+ (*Bacillus subtilis et Staphylococcus albus*) et deux bactéries Gram- (*Escherichia coli et Proteusvulgaris*). In vitro, chez les animaux de laboratoire, ils ont montré une inhibition de la croissance de diverses variétés de lignées de cellules cancéreuses (NARAYANA *et al.*, 2001). Les résultats de BENARBA *et al.* (2015) montrent que les flavonoïdes possèdent des effets thérapeutiques contre plusieurs maladies telle que la toux, la grippe, la fièvre, l'asthme, l'hypertension, et les intoxications,

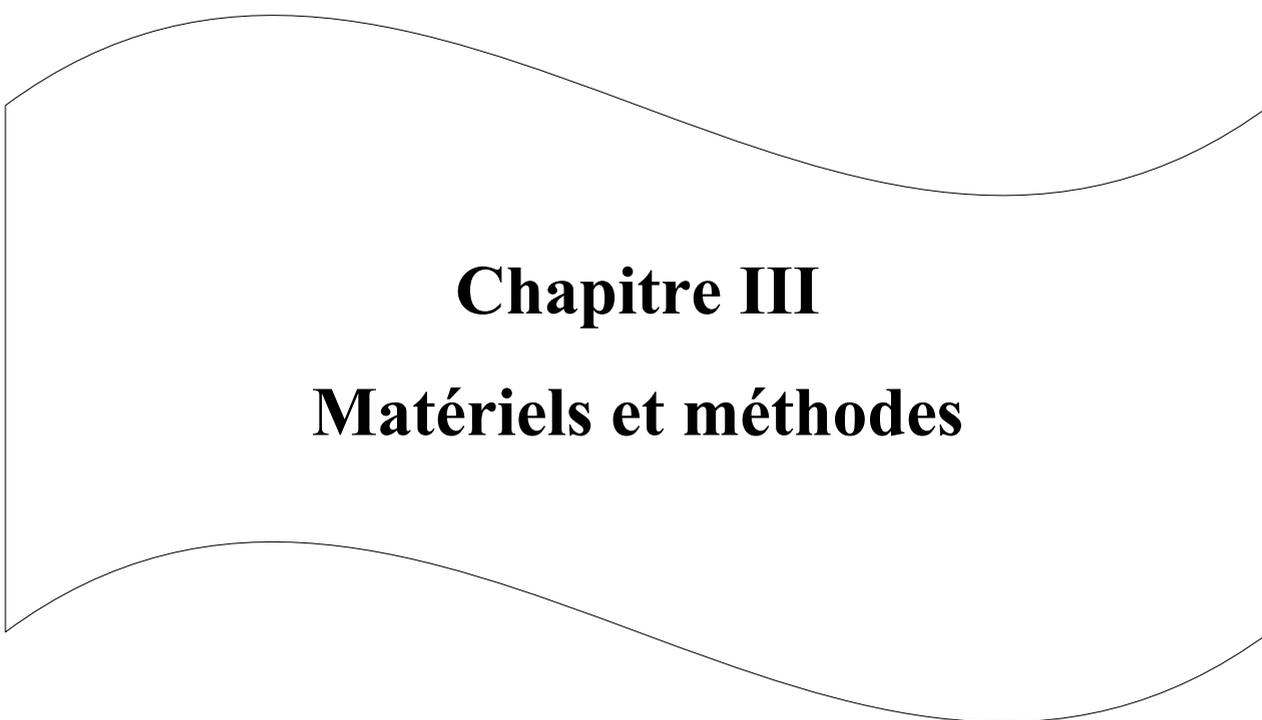
Des exemples de phénols et leurs activités sont présentés dans le tableau I.

**Tableau I :** Activité biologiques de quelques composés phénoliques

<b>Polyphénols</b>	<b>Activités</b>	<b>Auteurs</b>
Acide phénoliques	Antibactérien	(Didryet <i>al.</i> , 1982)
	Antifongique	(Ravnet <i>al.</i> , 1984)
	Antioxydants	(Haase et Kato, 1984)
Coumarines	Vasoprotectrices et antioedématisque	(Mabry et Ulubelen, 1980)
Flavonoïdes	Anti tumorales	(Stavric et Mutula, 1992)
	Anti carcinogènes	(Daset <i>al.</i> , 1994)
	Anti-inflammatoire	(Daset <i>al.</i> , 1994)
	Hypotenseur et diurétiques	(Bidet <i>et al.</i> , 1987)
	Antioxydants	(Bruneton, 1993)
Anthocyanes	Protection des veines et capillaires	(Bruneton, 1993)



**PARTIE  
EXPERIMENTALE**



## **Chapitre III**

### **Matériels et méthodes**

Notre étude expérimentale a été réalisée au sein de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou au sein des laboratoires pédagogiques des analyses physicochimiques et microbiologiques.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer certaines propriétés biologiques (activité antibactérienne) d'extrait phénolique d *Raphanus sativus* L.

Le travail pratique est subdivisé en trois parties suivantes :

- Caractérisation phytochimique de la partie aérienne (feuilles et tiges) ;
- Extraction et dosage des polyphénols ;
- Evaluation de l'activité antioxydante et antibactérienne d'extrait phénolique de la partie aérienne de *Raphanus sativus* L.

### **III.1. Matériel**

#### **III.1.1. Appareillage et réactifs :**

Le matériel utilisé dans notre travail expérimental: solvants, les réactifs chimiques et milieux de cultures, les appareillages sont présentés en annex1.

#### **III.1.2. Matériel végétal**

Le matériels végétal est constitué de partie aérienne (feuilles et tiges) de *Raphanus sativus* L, la récolte a été entreprise manuellement pendant le mois de mars 2018 dans la région lazib wilaya de Tizi-Ouzou.

#### **III.1.3. Matériel biologique**

Le test de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique de la plante étudiée a été effectué sur quatre bactéries, une bactérie Gram positif *Staphylococcus aureus* et trois bactéries à Gram négatifs *Escherichia coli* et *pseudomonas aeruginos*, *klebsciell pneumonea*. Toutes les souches testées proviennent du laboratoire de microbiologie de l'université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, tableau II (Annexe 2).

Tableau II : Les Souches bactériens testées :

Souches	Type	Référence
<i>Escherichia coli</i>	Bacille Gram négatif	ATCC 25922
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocci Gram positif	ATCC 25923
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacille Gram négatif	ATCC 27853
<i>Klebsiell pneumoniae</i>	Bacilles Gram négatif	ATCC 25955

### III.2. Méthode d'analyses

#### III.2.1. préparation matériel végétal

Après avoir nettoyé les feuilles et les tiges de la plante, le séchage a été réalisé à température ambiante à l'abri de la lumière. Après séchage pendant 15 jours, le matériel végétal a été broyé à l'aide d'un mixeur, puis la poudre obtenu est conservée à température ambiante et à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation. La figure suivante résume les étapes suivies pour l'obtention de poudre non tamisée.



A



B



C

**Figure 11:** Les étapes d'obtention de poudre : (A) ; nettoyage ; (B) ; broyage ; (C) ; la conservation (originale)

**III.3. Détermination des propriétés physico-chimiques de la plante sèche****III.3.1. Teneur en eau (NFV05-113,1972)****Mode opératoire**

5g d'échantillon en poudre est mis dans l'étuve pendant 15 minutes à  $105 \pm 2C$ , puis le retirer et le placer dans le dessiccateur pour éviter toute réhydratation, après refroidissement et à l'aide d'une balance de précision, recommencer l'opération jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La teneur en eau a été déterminée selon la formule suivante :

$$H\% = \frac{M1-M2}{P} \times 100$$

Soit :

H % : Humidité ;

M1 : Masse de la capsule (tare) + la matière fraîche avant séchage (g) ;

M2 : Masse de l'ensemble après séchage (g) ;

P : Masse de la prise d'essai (g).

$$\text{Matière sèche}\% = 100 - H\%$$

**III. 3.2. Teneur en cendres (NFV 05-113, 1972)****Principe**

L'échantillon est calciné à  $550^{\circ}C$  dans un four à moufle jusqu'à l'obtention de cendres blanchâtres de poids constant.

**Mode opératoire**

Dans des capsules en porcelaines, peser 5g d'échantillon (poudre), placer dans un four à moufle réglé à  $550^{\circ}C$  pendant cinq heures jusqu'à obtention d'une couleur grise clair ou blanchâtre, ensuite retirer les capsules de four et les mettre à refroidir dans le dessiccateur, puis les peser.

**Expression de résultats**

La matière organique a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{MO}\% = \frac{\text{M1} - \text{M2}}{\text{P}} \times 100$$

Soit :

MO%: Matière organique (g) ;

M1 : Matière de capsule+prise d'essai (g) ;

M2 : Masse de la capsule après incinération (g) ;

P : Masse de la prise d'essai (g).

La teneur en cendre (Cd) a été déterminée comme suit :

$$\text{Cd} = 100 - \text{MO}\%$$

$$\text{TC}\% = 100 - \text{MO}\%$$

Soit : TC=Taux de cendres.

**III.3.3. Mesure du pH (NFV 05-108, 1997)**

Il définit l'acidité du produit considéré, mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

**Mode opératoire**

10 ml d'eau distillée chaude sont ajoutés à 2g d'échantillon (poudre), laisser refroidir le mélange, étalonner le pH-mètre, en utilisant des solutions tampons, prélever comme prise d'essai un volume V de l'échantillon suffisamment important pour permettre l'immersion de l'électrode, noter ensuite la valeur du pH-mètre. Il faut rincer l'électrode avec de l'eau distillée avant et après chaque mesure.

### III.5- Analyse phytochimique de *Raphanus sativus* L.

La mise en évidence des différentes classes des métabolites secondaires constituant les poudres de feuilles et tiges de *Raphanus sativus* L a été faite selon les méthodes standards de screening photochimique (DAHOU *et al.*, 2003 ; KUMAR *et al.*, 2010).

La quantité de la substance recherchée est proportionnelle à l'intensité du précipité formé ou à la coloration.

#### III.5.1- Préparation de l'infusé

5 g de poudre, on ajoute 100ml d'eau distillée. Porter le mélange à l'ébullition pendant 15 minutes, après filtration, le filtrat est ajusté à 100ml d'eau distillée. L'infusé ainsi obtenu est utilisé pour la recherche des différents composés chimiques.

Les tests phytochimiques consistent à identifier les différentes familles des métabolites secondaires existants dans la partie aérienne et ceci par une caractérisation qualitative.

Selon (DAIRA *et al.*, 2016), les résultats sont exprimés selon le type de réaction :très positive (+++), moyennement positive ( ++), positive ( +), négative (-).

#### ✓ Les Tanins

Quelques gouttes de la solution  $\text{FeCl}_3$  à 1% sont ajoutées à 1 ml de l'infusé. Un test est révélé positif par l'apparition d'une coloration bleu-noirâtre ou bleu-verte (TREASE et EVANS, 1987).

#### ✓ Tanins galliques et catéchique

La différenciation entre les tanins catéchique et galliques est obtenue grâce au réactif de Stiasny (10ml de formol (35%) + 5ml d'acide chlorhydrique R) :

Sur 30ml de l'infusé on ajoute 15ml à 30 minutes. L'apparition d'un précipité de couleur rose montre la présence des tanins catéchique. après filtration, le filtrat est saturé avec 10ml d'une solution d'acétate de solution (1%) et quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  (1%), le développement d'une teinte bleu-noirâtre indique la présence des tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny (MIBINDZOU, 2004).

**✓ Les Flavonoïdes****a) Les anthocyanes**

A 5ml de l'infusé on ajoute 5 ml d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) et 5ml d'hydroxyde d'ammonium( $NH_4OH$ ), une coloration rouge en milieu acide et bleu violacée en milieu basique révèle la présence d'anthocyane (MIBINDZOU, 2004).

**b) Réaction à la cyanidine**

A 5ml de l'infusé, on ajoute 5 ml d'éthanol chlorhydrique (éthanol à 95°, eau distillée et acide chlorhydrique R en volume égale de 5ml) ensuite quelque copeaux de magnésium sont ajoutés ainsi 1ml d'alcool isoamylique.

L'apparition d'une coloration sur la couche surnageant d'alcool isoamylique indique la présence des flavonoïdes libres (génines) :

- Une coloration rose-orangée indique la présence des flavones.
- Une coloration rose-violacée indique la présence des flavanones.
- Une coloration rouge indique la présence des flavonols et flavanonols.

On effectue la réaction de la cyanidine sans ajouter des copeaux de magnésium et on chauffe pendant 10 minutes au bain- mari. En présence de leucoanthocyanes, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ; les catéchols donnent une teinte brune-rouge (MIBINDZOU, 2004).

**✓ Les coumarines**

2 ml de l'infusé placé dans un tube dans lequel sont ajoutés 3ml de NaOH (10%), puis agitation de la solution et l'apparition d'une couleur jaune indique la présence de coumarines (DIALLO, 2000).

**✓ Les dérivés anthracéniques**

1g de poudre dans 10ml de chloroforme chauffée prudemment au bain-marie pendant 3 minutes et filtré à chaud. Le volume est ajusté à 10ml.

L'hydrolysate : une partie du résidu de la poudre épuisée par le chloroforme, on ajoute 10ml d'eau distillée et 1 ml d'acide chlorhydrique concentrée. On maintien le tube à essai

dans le bain-marie bouillante pendant 15 minutes. La solution est refroidie sous un courant d'eau et filtrée. Le volume est ajusté à 10ml avec de l'eau distillée.

✓ **Les dérivés anthracéniques libre**

Ils sont observés en introduisant dans un tube à essai 1ml d'extrait chloroformique et 1 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dilué. La coloration plus ou moins rouge après agitation de la solution indique la présence d'anthraquinones libres.

✓ **Les dérivés anthracéniques combinés**

**Les O-Hétérosides**

Prélever 5ml d'hydrolysats qui sont agités avec 5 ml de chloroforme, la phase organique est introduite dans un tube à essai et 1 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dilué et ajouté. Après agitation, la présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins intense. Si la réaction est négative ou faiblement positive, on recherche les O-Hétérosides.

5ml d'hydrolysats auquel 3 à 4 gouttes de  $\text{FeCl}_3$  (10%) sont ajoutés, la solution est chauffée pendant 5 minutes au bain-marie. Après refroidissement, une extraction liquide-liquide avec 5ml de chloroforme est réalisée. La phase chloroformique est récupérée et introduite dans un tube à essai, 1ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  est ajouté et la solution est agitée. Le test est positif si la coloration rouge est plus intense apparue (DIALLO, 2000).

✓ **Les C-Hétérosides**

La phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-Hétérosides est reprise par 10 ml d'eau distillée et 1ml de  $\text{FeCl}_3$  (10%) est ajouté. Le tube à essai contenant la solution est maintenu dans un bain-marie bouillant pendant 30 minutes, après refroidissement, 5 ml de chloroforme sont ajoutés pour réaliser une extraction liquide-liquide, la phase chloroformique est récupérée dans un tube à essai. 1ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  dilué est ajouté à la solution qui est agitée.

Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de C-Hétéroside (DIALLO, 2000).

✓ **Les quinones libres**

1g de poudre est placée dans un tube avec 15 à 30 ml d'éther de pétrole. Après agitation et un repos de 24 heures, l'extrait est filtré et concentré au rotavapeur, puis quelques

gouttes de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10%) sont ajoutés, lorsque la phase aqueuse vire au jaune, rouge ou violet la présence des quinones libre est confirmée.

✓ **Les stérols et triterpènes**

1g de poudre dans 20ml de d'éther pendant 24 heures, ensuite 1ml de  $\text{CHCl}_3$  est ajouté au résidu de macérât évaporé. la formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact révèle leur présence (MAMMADOU, 2012).

✓ **Les stéroïdes**

5ml de l'infusé plus 5 ml d'anhydride acétique sont repris dans un tube à essai dans lequel 0.5 de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré sont ajoutés. L'apparition d'une coloration violette qui vire au bleu puis au vert indique une réaction positive (HARBORNE, 1998).

✓ **Les saponosides**

2ml de l'infusé avec un peu de l'eau (2ml), puis la solution est fortement agitée. La présence des saponosides est évaluée comme suit :

- Pas de mousse = test négatif ;
- Mousse moins de 1cm = test faiblement positif ;
- Mousse de 1-2 cm= test positif ;
- Mousse plus de 2 cm= test très positif (TREASE et EVANS, 1987).

✓ **Les stupéfiants**

0.5 de poudre sont introduits dans un tube à essai aux quels 5ml d'éther de pétrole sont ajoutés et agitée pendant 15 minutes. Après décantation, l'éther de pétrole est récupéré et évaporé à sec. L'ajout de 3 à 4 gouttes de  $\text{KOH}$  (5%) dans l'alcool colore la solution en violet en cas de réaction positive (HARBORNE, 1998).

✓ **Les alcaloïdes**

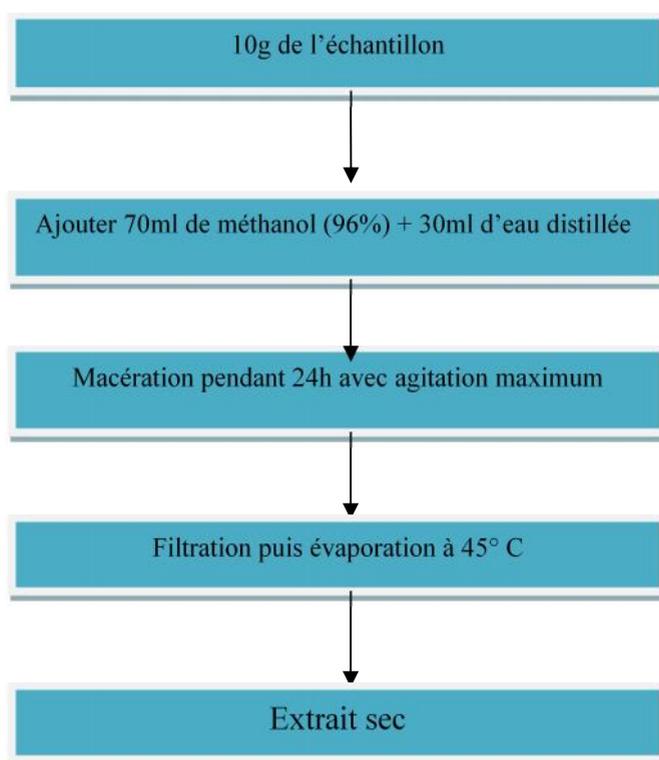
5g de poudre avec 25ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (10%), agitation et macération puis filtré et lavé avec de l'eau distillée et complété 25ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , on obtient la solution (S1). On prend 1ml de S1 et 5ml de Dragendroff sont ajoutées, apparition d'un précipité confirme la présence des alcaloïdes.

### III.6. Détermination de la teneur en polyphénols totaux(PPT)

#### III.6.1.Extraction des polyphénols

Le matériel végétal broyé (10g) est soumis à une extraction par macération dans 100ml de méthanol-eau dans une proportion (70 :30) en volume pendant 24 heures puis l'extrait obtenue est filtré et évaporé à sec à l'aide d'un rotavapeur à 45°C (BOUCHOUKA, 2016). Le résidu sec est pesé puis repris dans le méthanol pour le test antioxydante ou DMSO (diméthyle sulfoxyde) à 1% pour le test d'activité antibactérienne (BOUCHOUKA, 2016).

Le procédé d'extraction adopté est illustré dans la figure 12 ci-dessous :



**Figure12** : Schéma illustrant l'extraction des composés phénoliques

#### III.6.2. Calcule de rendement en polyphénols

Le rendement en pourcentage(%), est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait et celle de la plante sèche en poudre. Il est calculé par la formule suivante :

$$\text{Rdt \%} = (\text{PB/PA}) \times 100$$

Soit :

PB : poids d'extrait brut.

PA : poids de la plante sèche en poudre (BOUCHOUKA, 2016).

### III.6.3. Le dosage de polyphénols totaux (PPT)

#### Principe

La teneur en polyphénols a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999). Ce réactif de couleur jaune est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{10}$ ) et l'acide phosphomolybdique ( $H_3PMoO_{10}$ ).

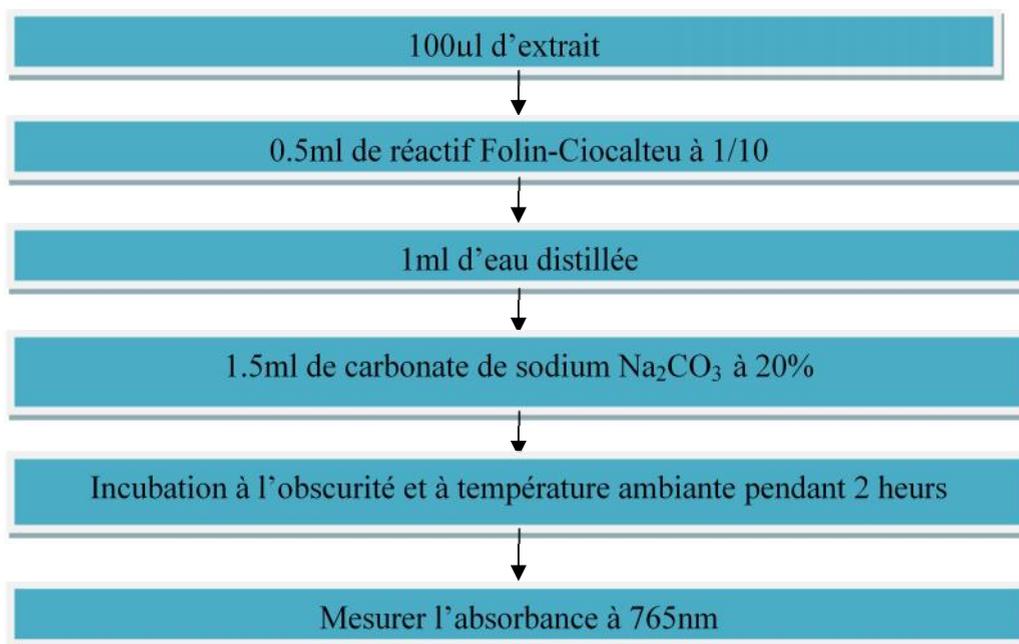
Lorsque les polyphénols sont oxydés, ils réduisent le réactif Folin-Ciocalteu en un complexe d'oxyde de tungstène ( $W_8O_{23}$ ), l'intensité de la couleur est proportionnelle aux des composés phénoliques oxydés (BIOZOT et CHARPENTER, 2006).

Cette méthode soit généralement utilisée et préférée, il est facile d'obtenir des résultats comparatifs avec d'autres matières végétales figurant dans la littérature.

#### Mode opératoire

La méthode adoptée pour le dosage des composés phénoliques totaux est celle décrite par Kim et ces collaborateurs (KIM *et al.*, 2003). Une quantité de 100  $\mu$ l de l'extrait convenablement dilué dans le méthanol 80% est mélangé avec 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu (10 fois dilué), après 5 minutes, 1ml du  $Na_2CO_3$  (7%) est ajouté tout en agitant. La solution est immédiatement diluée par 400 $\mu$ l avec de l'eau distillée et le mélange est agité vigoureusement. Après incubation de 90 min à l'obscurité et à la température ambiante, l'absorbance est mesurée à 750nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les étapes de dosage des polyphénols totaux sont représentées dans la figure 14 :



**Figure 13:** Diagramme du dosage des polyphénols totaux (KIM *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus sont exprimés en milligramme équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG/ g de MS) en utilisant l'équation de la régression linéaire de courbe d'étalonnage tracée avec l'acide gallique (Annexe 3).

La teneur en composés phénoliques (TCP) d'échantillon analysé est calculée par la formule suivante :

$$\text{TCP} = \text{C.V} / \text{M}$$

Soit :

C : concentration de l'extrait ;

V : volume de solvant utilisé pour l'extraction ;

M : masse en gramme de la prise d'essai.

### III.7. Détermination de l'activité antioxydante

Trois tests ont été utilisés pour évaluer la capacité antioxydante *in vitro* de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne, à savoir la réduction de phosphomolybdate d'ammonium, pouvoir piègeur du radical DPPH<sup>+</sup>, et pouvoir réducteur du fer FRAP. Les

résultats sont exprimés en milligramme équivalent d'acide ascorbique par gramme de matière sèche.

L'acide ascorbique est utilisé comme référence dans les mêmes conditions opératoires ainsi que dans la même gamme de concentration.

### **III.7.1. Test de l'activité antioxydante totale (TAC)**

#### **Principe**

L'activité antioxydante totale d'extrait, est évaluée par la méthode de réduction de phosphomolybdate ( $\text{Mo}^{+6}$ ) au ( $\text{Mo}^{+5}$ ) par les antioxydants selon la méthode de PRIETO *et al.* (1999). Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate /Mo) à un pH acide.

#### **Mode opératoire**

400  $\mu\text{l}$  d'extrait sont mises dans un tube à essai et mélangées avec 4 ml du réactif composé d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (0,6M), de phosphate de sodium ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes sont ensuite agités et placés au bain marie pendant 60 minutes à 95°C figure 14. L'absorbance de la solution préparée est mesurée à 695 nm contre un blanc préparé de la même manière (PIERTO *et al.*, 1999).

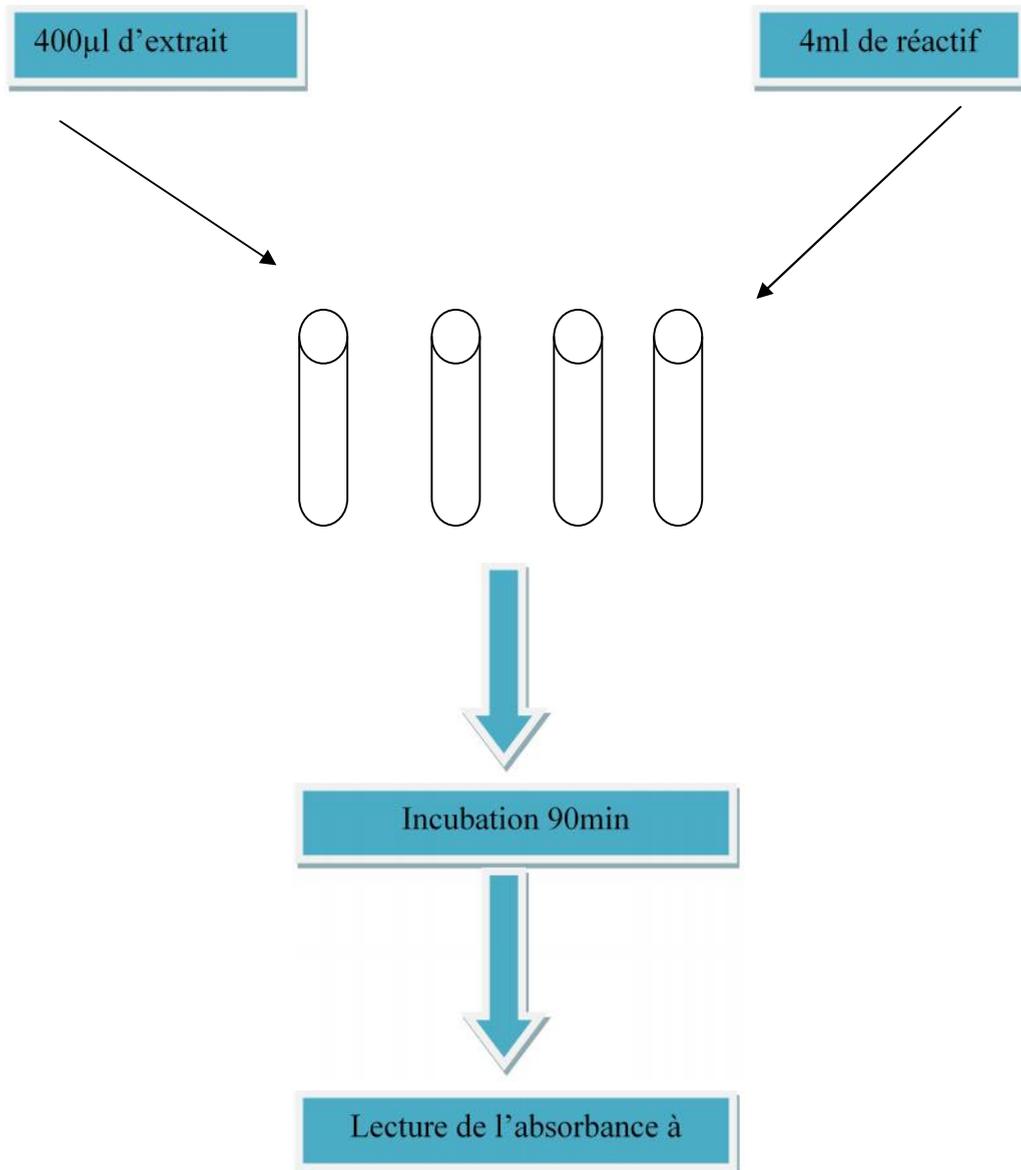
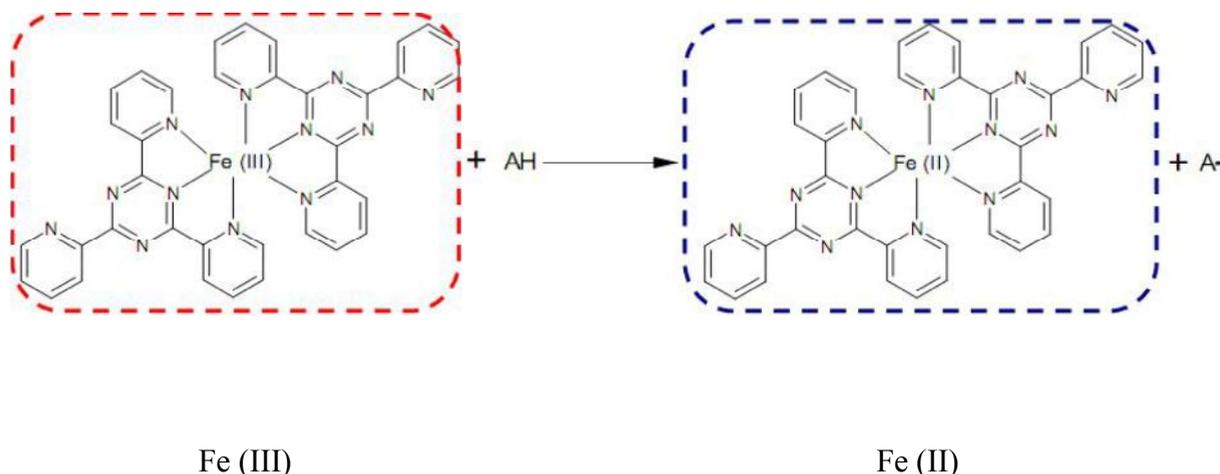


Figure 14: Protocole du test TAC

### III.7.2. Test du pouvoir antioxydant par réduction du fer (FRAP)

#### Principe

Les substances ayant un potentiel de réduction réagissent avec le ferricyanure de potassium pour former le ferrocyanure de potassium, qui réagit à son tour avec le chlorure ferrique pour donner lieu à un complexe qui a une absorption maximale à 700nm (figure 15) (JAYANTHI et LALITHA, 2011).

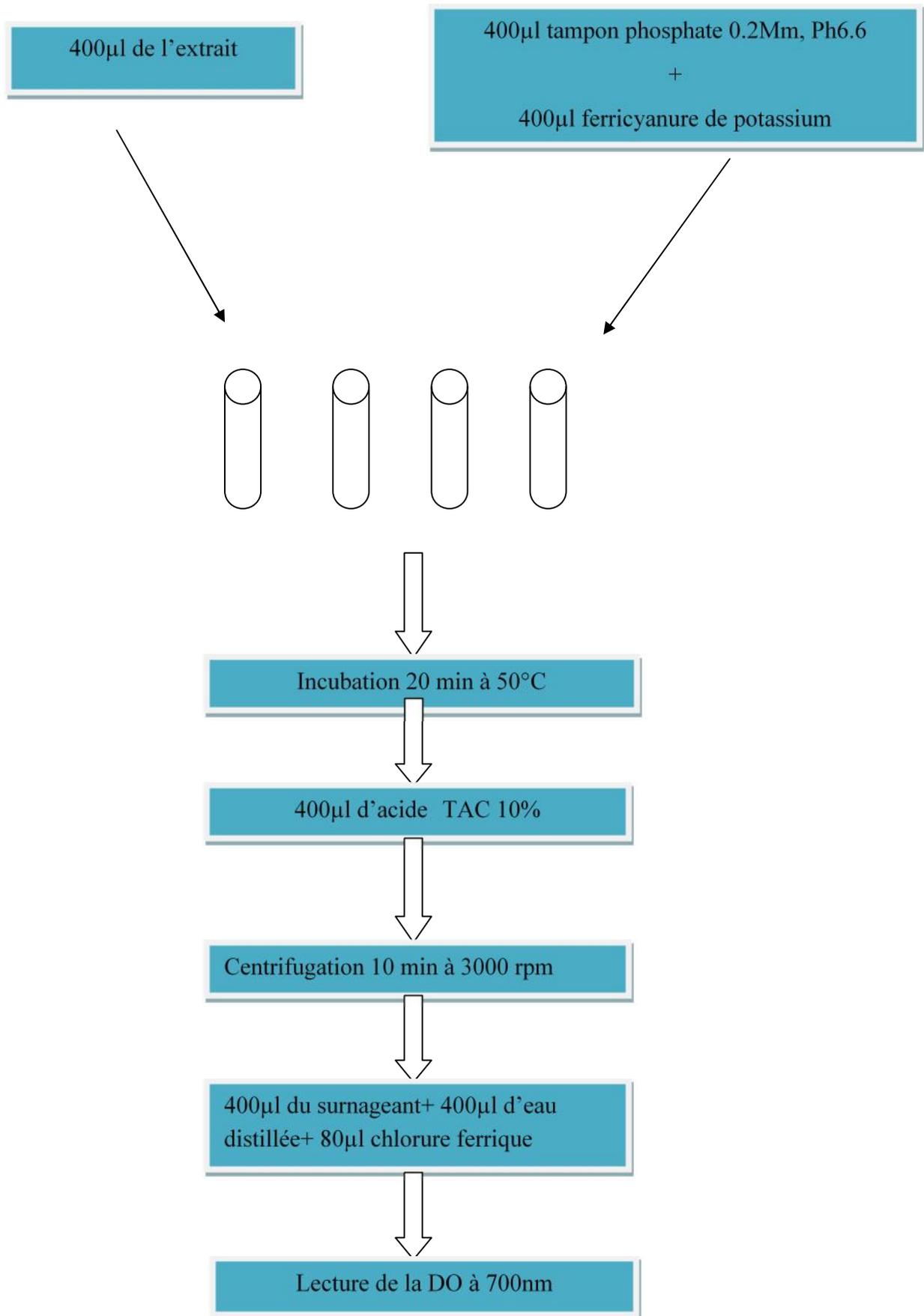


**Figure 15:** Mécanisme réactionnel intervenant lors du test FRAP entre le complexe

Fe (III) et un antioxydant (AH) (BENSIE et STRAIN, 1996).

#### Mode opératoire

Le protocole expérimental utilisé est celui de YILDIRIM, MAVI, et KARA (2001), où 0.5 ml de l'échantillon à différentes concentrations (20 à 200mg/l), est mélangé avec 1.25 ml d'une solution tampon phosphate à 0.2 M (pH= 6.6) et 1.25 ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. Le tout est incubé à 50°C pendant 20 min, puis refroidir à la température ambiante. 2.5 ml d'acide trichloracétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction, puis les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 min. 1.25 ml du surnageant sont ajoutés à 1.25 ml d'eau distillée et 250  $\mu$ l d'une solution de chlorure de fer ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) à 0.1% (figure16). La lecture des absorbances se fait contre un blanc à 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

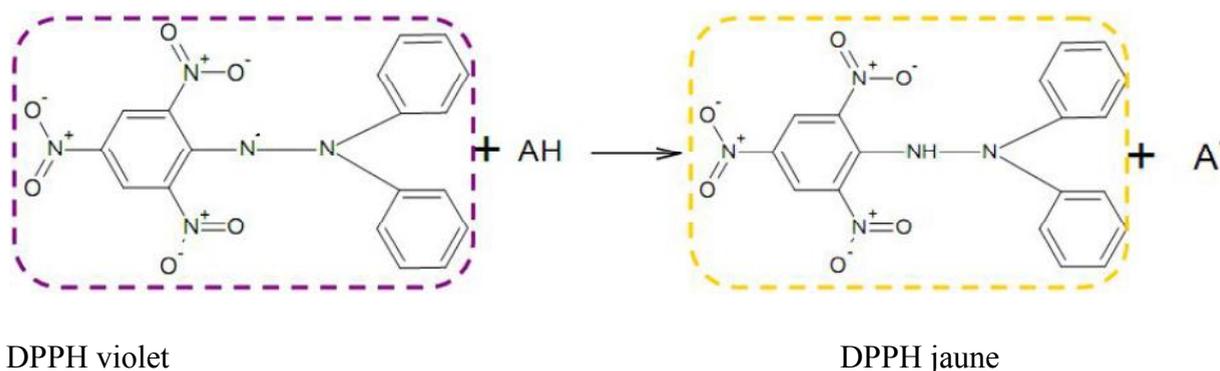


**Figure 16:** Protocole du test de réduction du fer (FRAP) (YILDRIM *et al.*, 2001).

## III.7.3. Test du DPPH, activité radicalaire

## Principe

La molécule de 1,1-diphényle-2-picryldrazyl (DPPH) est un radical libre stable, dont la solution possède une coloration violette et une absorption caractéristique à 517 nm. Quand une solution de DPPH est mélangée avec une substance donneuse d'atomes d'hydrogène, antioxydante, il y'a formation de la forme réduite figure 17. Ceci provoque la perte de la coloration violette en coloration jaune caractérisée par une bande d'absorption dans le visible à 517nm (BRAND-WILLIAMS, 1995).



**Figure 17:** Structure chimique du radical DPPH et de sa forme réduite.

## Mode opératoire

L'effet piègeur antiradicalaire de l'extrait étudié vis-à-vis du radical DPPH est évalué selon la méthode décrite par HANSRAJ et ses collaborateurs (2006). Un volume de 2 ml de DPPH (0.2mM) préparée dans le méthanol 80% est mélangé avec 2ml de l'extrait de la plante ou de l'antioxydant de référence (vitamine C) à différentes concentration. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante. L'absorbance est lue à 517 nm. Le résultat est exprimé en mg de vitamine C équivalent par g de matière sèche.

Le pourcentage d'inhibition (PI%) est calculé par la relation suivante :

$$PI\% = \frac{(\text{Abs contrôle} - \text{Abs test})}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

La concentration efficace (EC50) qui est la concentration d'extrait ou de l'antioxydant de référence responsable de 50% d'inhibition des radicaux DPPH<sup>\*</sup> présents dans le milieu réactionnel, est déterminée sur le graphique représentant le pourcentage d'inhibition du DPPH<sup>\*</sup> en fonction des concentrations des extraits ou des antioxydants de référence.

### III.8- Activité antibactérienne

La détermination de l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique de *Raphanus sativus* L. A été évalué vis-à-vis des souches bactériennes pathogènes (identifiés dans le laboratoire de microbiologie), département Biochimie-Microbiologie, par la méthode de disques appelée aussi méthode de diffusion en milieu gélosé c'est une technique qualitatif basée sur la mesure de diamètre, découpés le papier wattman N°1 en disques, stérilisés et imprégnés dans l'extrait à testé puis les disques ont été déposés à la surface d'un milieu préalablement ensemencé. Chaque essai a été répété trois fois dans les mêmes conditions d'expérimentation.

#### ➤ Préparation des milieux de culture

Le milieu utilisé pour la culture des souches bactérienne est celui de Mueller Hinton (MH).

#### ➤ Préparation des disques

Des disques de papier Wattman de 6mm de diamètre ont été préparés et stérilisés sont mis dans un tube à essai, stérilisés dans l'autoclave et conservés jusqu'au moment de leurs utilisation.

#### ➤ Préparation de pré-culture

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boites Pétri contenant le milieu MH et incubées pendant 18 à 24 heures à 37°C.

#### ➤ Standardisation des suspensions bactériennes

A l'aide d'une pipette Pasteur, nous avons prélevé quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques et ont été mises dans 10ml d'eau physiologique stérile à 0.9% de sel (NaCl). La suspension bactérienne est bien homogénéisée.

L'absorbance des suspensions bactériennes mesurée à une longueur d'onde de 620nm et doit être comprise entre 0.08 et 0.1 (BENHAMMOU *et al.*, 2008).

➤ **Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode des disques**

Selon BENJILALI *et al.*, (1986), les disques sont imbibés par 20 µl de l'extrait, par ailleurs, le milieu de culture MH est coulé dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre à une épaisseur de 4 mm puis laisser refroidir.

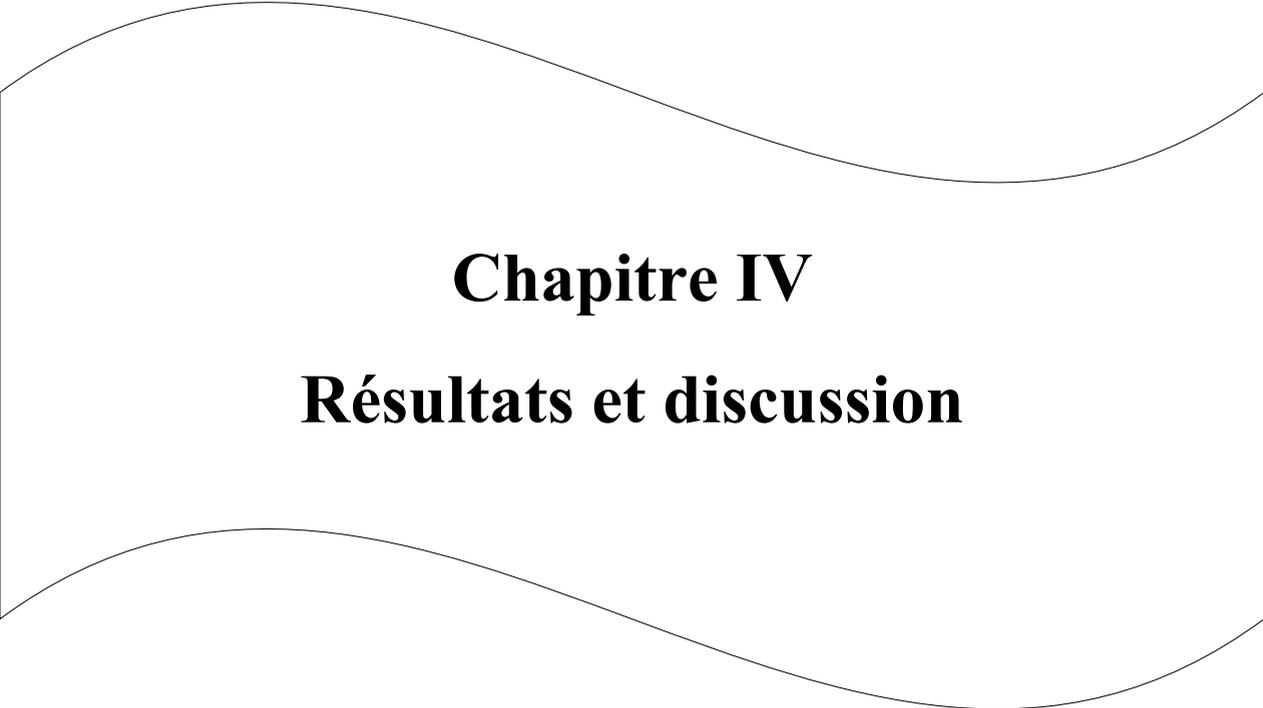
Les boîtes de Pétri stériles préalablement coulées, sontensemencées par écouvillonnage à l'aide d'un écouvillon stérile, les disques contenant l'extrait sont déposés à la surface de la gélose. Chaque essai a été répété trois dans les même conditions expérimentales.

➤ **Lecture des résultats**

Après incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures, toute activité antimicrobienne se manifesterait par la formation d'un halo d'inhibition autour du disque où la culture est absente ; le diamètre sera mesuré en millimètres et comparé avec des diamètres de référence relatifs aux antibiotiques utilisés.

Les résultats obtenus sont symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches vis-à-vis d'extrait (PONE *et al.*, 2003).

- Souche non sensible (-) ou restante : diamètre < 0.8 ;
- Souche sensible (+) : diamètre compris entre 0,9 et 1,4 cm ;
- Souche extrêmement sensible (+++) : diamètre > à 2cm.



**Chapitre IV**  
**Résultats et discussion**

### IV.1. Résultats d'analyses physicochimiques

L'analyse physicochimique portée sur la détermination de la teneur en eau, (pH) et la teneur en cendre a permis de dire que cette plante est riche en eau (49.60%), et une teneur en cendre de (64%). Ainsi la mesure du Ph montre que la plante est peu acide (Ph de 6.06), ce qui signifie que la plante contient une quantité importante de minéraux par rapport à la matière organique de (34%).

### IV.2- Résultats d'analyse phytochimique

Pour identifier la composition en métabolites secondaires présents dans *Raphanus sativus* L., un screening chimique est fait selon la méthode standard de screening chimique.

Les résultats de cette analyse sont présentés dans le tableau IV, (Annexe 3).

Métabolites secondaires		Quantité
Tanins	Tanin catéchique	++
	Tanin gallique	+++
Alcaloïde		++
Coumarine		+++
Composées flavonoïques	Anthocyane	+++
	Flavone	+++
	Flavanone	-
	Flavanole	-
	Flavanonol	-
	Leucoanthocyane	+++
Terpénoides	Stérol	++
	Triterpène	+
	Saponoside	++
Dérivés anthracéniques	Anthracénique libre	-
	Anthracéniques combinés :	+++
	C-hétéroside	+++
	O-hétéroside	+++

(+++): Abondance ; (++) moyen ; (+) faible ; (-) absence

Les résultats de ce tableau révèlent que, les feuilles et les tiges de *Raphanus sativus* L sont riche en métabolites secondaires tel que (tanins galliques, anthocyanes, flavones, coumarines, Anthracénique combinés, Leucoanthocyanes (+ + +)), de plus elles renferment aussi (les tanins catéchique, les stérols, les saponosides, alcaloïdes) en quantité moyenne (+ +), par contre les triterpènes) sont présents avec une faible quantité (+) .

En effet, en comparant la teneur en métabolites secondaires de cette espèce à d'autres espèces herbacées nous constatons que *Raphanus sativus* L. est très riche en (tanins galliques, anthocyanes, flavones, coumarines, Anthracénique combinés, Leucoanthocyanes).

Les tests de recherche des anthraquinones libre et leucoanthracyanes réalisé par DAOUDI en (2016) ont été négative chez l'espèce *Ruta chalapensis*, par contre dans notre test nous avons révélé la présence des leucoanthocyanes en abondance.

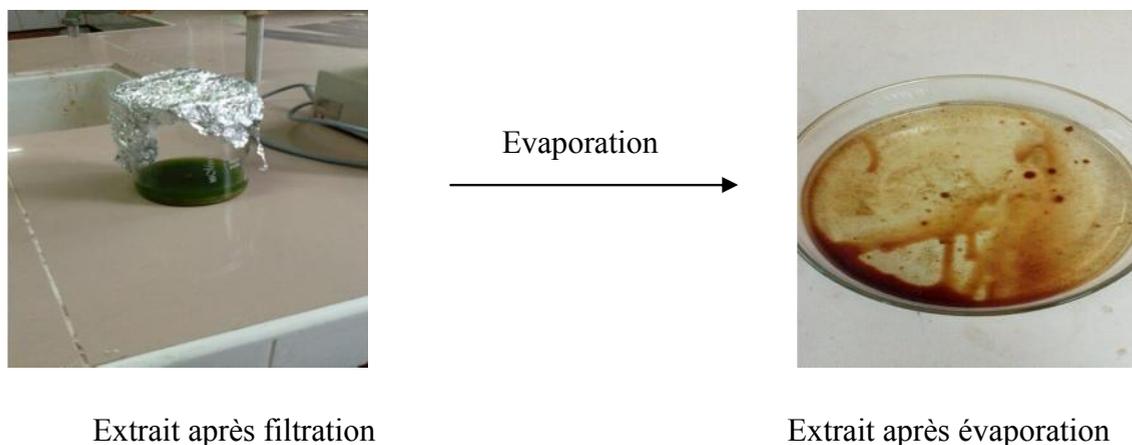
D'après les travaux de DAOUDI et *al.*,(2016), *Raphanus sativus* L. et *Ruta chalapensis* sont riche en alcaloïdes qu'on les trouve aussi chez *Raphanus sativus* L. Ces derniers possèdent des propriétés biologiques intéressantes, notamment l'antiprolifération et antalgique.

Concernant les composés terpéniques nous avons mis en évidence la présence de saponosides, de stérols et les triterpènes, ces composés sont aussi présents chez l'espèce *Ruta chalapensis* selon (DAOUDI et *al.* (2016).

Par ailleurs *Ruta chalapensis* est riche en flavones, flavanonols, et des flavanones selon l'étude faite par HNATYSZYN et *al.* (1974), alors que *Raphanus sativus* L. ne contient que les flavones et les anthocyanes.

Les résultats montrent aussi la présence des C-hétérosides et les oses chez *Raphanus sativus* L. ces composés ont été révélés par DAOUDI et *al.* (2016), chez *Ruta chalapensis*. Par ailleurs, les dérivés anthracéniques sont absents.

## IV.3. Le rendement en polyphénols



**Figure 19:** Aspect, couleur, d'extrait après filtration et après évaporation.

**Tableau V:** Aspects, rendement et couleurs d'extrait phénolique.

Aspect d'extrait après filtration	Couleur d'extrait après filtration	Aspect d'extrait après évaporation	Couleur de l'extrait après évaporation	Rendement %
Liquide	Vert clair	Pâteux	Marron foncé	14.37%

Le rendement en extrait de la partie aérienne est de *Raphanus sativus* L. de 14.37%, ce rendement est nettement supérieur à celui obtenu par MANSOUR et *al.*, en 1990 sur la partie aérienne de l'espèce *Ruta chalapensis*, qui est de 3.75%.

Les travaux de JOKIC et *al.* (2000); ARIMBOOR et ARUMUGHAN (2011), confirment que l'eau et le méthanol sont les meilleurs solvants d'extraction, la présence d'eau augmente la perméabilité des tissus végétaux et favorise le phénomène de diffusion de masse dans l'étape d'extraction.

Selon l'étude réalisée par BEEVI et *al.* (2010) sur la même espèce permet d'avoir une teneur en PPT de (135.61mg/g), ce résultat est similaire à celui obtenu dans notre étude.

#### IV.4- Résultats du dosage des polyphénols totaux de l'extrait hydrométhanolique

La détermination de la teneur en polyphénols totaux de notre extrait a été effectuée suivant la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu (SINGLITON et ROSSI, 1965).

La courbe d'étalonnage est établie en utilisant l'acide gallique, à différentes concentrations comme référence (annexe 4).

Le dosage de polyphénols révèle que l'extrait hydrométhanolique contient 136.6mg/g.

Ce résultat est supérieur à celui signalé par GHAZGHAZI *et al.* (2013), qui a démontré que les meilleurs solvants d'extraction de polyphénols de cette espèce sont le méthanol et l'acétone.

Cependant la teneur en polyphénols de notre extrait est légèrement inférieure à celui obtenu par BEEVI *et al.* (2010), qui est de 142.85 mg/g dans l'extrait méthanolique.

En effet plusieurs facteurs interviennent dans le processus d'évaluation des PPT des plantes. Ces teneurs varient qualitativement et quantitativement d'une plante à une autre. Parmi ces facteurs :

- La méthode d'extraction (LEE *et al.*, 2003).
- Le patrimoine génétique, la période de récolte, et le stade de développement de la plante (MILIAUSKAS *et al.*, 2004).
- Les facteurs climatiques (température élevée...etc.), environnementaux Zone géographique, sol, salinités.) et les maladies..... etc. (FALLAH *et al.*, 2008 ; EBRAHIMI *et al.*, 2008).
- La période de récolte et les conditions de stockage (PODSEDEK, 2007).

D'après KHOKHAR *et al.* (2002), la teneur en polyphénol du thé noir (135 mg/g) est presque similaire à celle obtenue sur notre plante, sachant que le thé noir est connu par sa forte teneur en polyphénols.

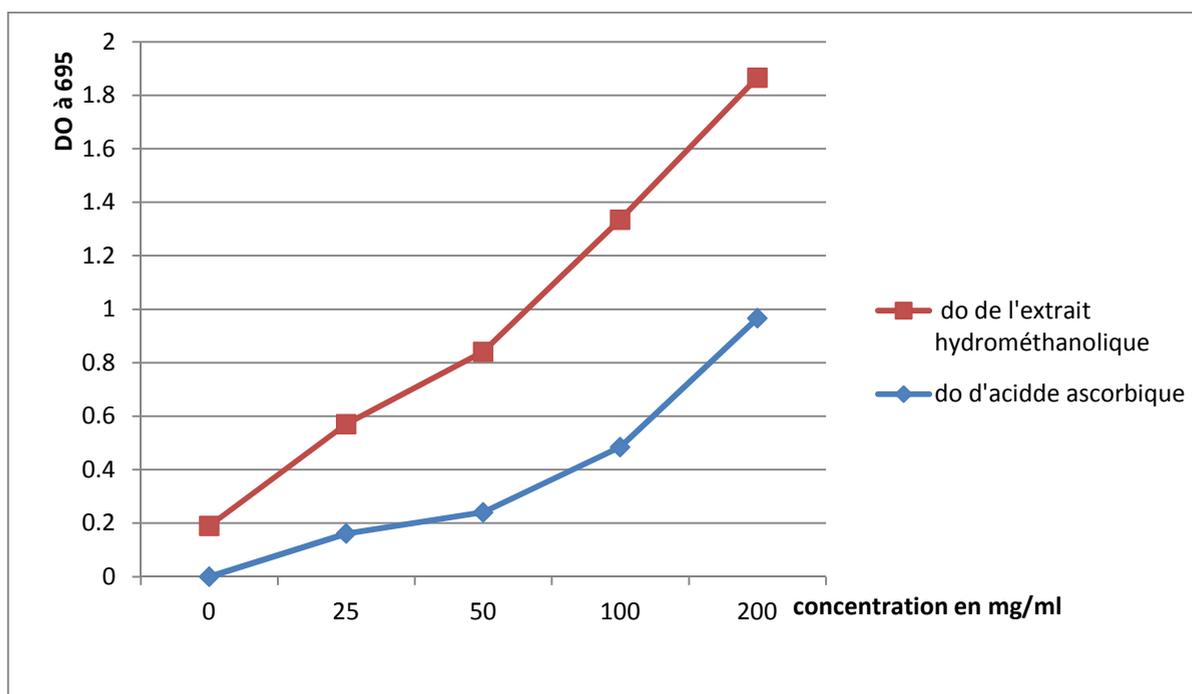
#### IV.5- Résultats de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante d'extrait de *Raphanus sativus* L. a été déterminée en utilisant trois tests différents à savoir ; FRAP, la capacité antioxydante totale, DPPH. L'activité antioxydante est un système dépendant, plusieurs mécanismes ont été proposés pour étudier à l'activité antioxydante telle que le don d'hydrogène, la terminaison de la réaction en chaîne

par les radicaux libres, chélation des ions catalytiques et élimination des peroxydes. La caractéristique d'un système particulier peut influencer le résultat d'analyse, et aussi cela pourrait fournir une approche plus fiable pour évaluer le potentiel antioxydant et antiradicalaire (BEEVI *et al.*, 2010).

#### IV.5.1- Capacité antioxydante totale

Les résultats obtenus illustrés en figure 19, révèlent une activité antioxydante appréciable de notre extrait avec une valeur de 61.46%, et une augmentation proportionnelle à la concentration utilisée. Ainsi notre extrait présente une activité antioxydante avec un  $IC_{50} = 0.173 \pm 0.003$  qui est proche de celle de l'acide ascorbique (antioxydant de référence) qui est de  $IC_{50} = 0.2 \pm 0.008$  mg/ml.



**Figure 19:** Courbe de test de TAC de l'extrait hydrométhanolique et de l'acide ascorbique

Le pouvoir réducteur de l'extrait est dû à la présence du groupement hydroxyle dans les composés phénoliques qui peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considéré comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants (SIDDHUR-AJU et BECKER, 2007), quelque étude antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut servir comme indicateur significatif de son activité antioxydante potentielle (JEON *et al.*, 2004).

L'extrait de *Raphanus sativus* L. présente une activité antioxydante légèrement supérieure à celle obtenue par KHELIFI *et al.* (2016), sur *Ruta chalapensis* qui est de  $0.1 \pm 0.002$  mg/ml.

La variabilité de l'activité antioxydante entre les deux espèces peut être expliquée par la teneur en métabolites secondaires (RODREGUEZ *et al.*, 2016). Néanmoins certains auteurs rapportent l'augmentation de l'activité antioxydante à la formation de nouveaux composés antioxydants (TOMAIN *et al.*, 2005).

#### IV.5.2- Test de piégeage du radical libre (DPPH)

L'activité antioxydante vis-à-vis le radical DPPH a été évaluée par le spectrophotomètre suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur jaune au violet à 517 nm. (figure 20). La valeur du pouvoir réducteur est de 65.67%.

L'analyse montre que l'IC<sub>50</sub> de l'extrait est similaire à celle trouvée par BEEVI *et al.* (2010), ( $0.07 \pm 0.01$  mg/ml) sur la même espèce, aussi ils ont trouvé que l'IC<sub>50</sub> sur feuilles de *Raphanus sativus* L. est de  $0.031 \pm 0.00$ , alors que l'IC<sub>50</sub> des tiges est de  $0.042 \pm 0.01$  mg/ml).

La variabilité de l'activité antioxydante des extraits de différentes plantes peut être expliquée par la différence dans les métabolites secondaires, car les polyphénols semblent être de bons candidats du fait de la présence de nombreux hydroxyles pouvant réagir avec les radicaux libres (GHAZGHAZI *et al.*, 2013).

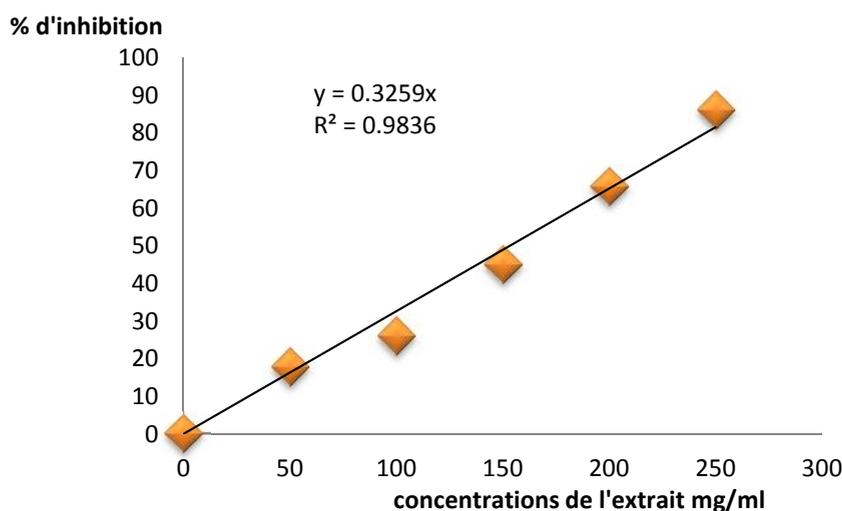
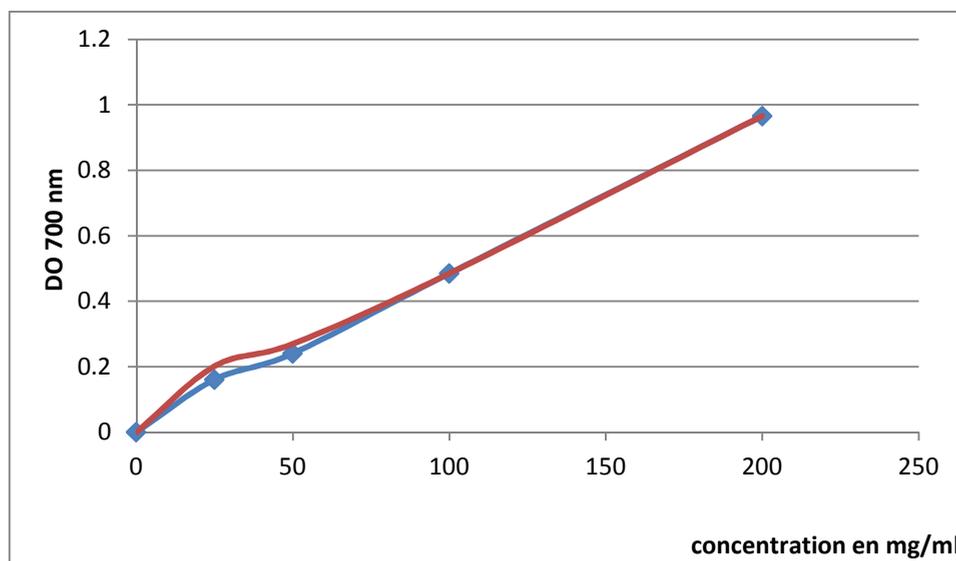


Figure 20: La courbe de pourcentage d'inhibition de l'extrait hydrométhanolique

## IV.5.3. Test réducteur de fer

L'activité antioxydante vis-à-vis le fer ( $Fe^{3+}$ ) a été évalué par le spectrophotomètre suivant la réduction qui s'accompagne par son passage de la couleur jaune au bleu vert dans le milieu réactionnel à 700nm.

La figure ci-dessous illustre les résultats obtenus pour le test FRAP de l'extrait et de l'acide ascorbique.



**Figure 21:** Réduction de fer de l'extrait hydrométhanolique de *Raphanus sativus* L.

Les résultats obtenus, révèlent une activité antioxydante appréciable de notre extrait, qui est de 64.14%.

Le Pouvoir réducteur de l'extrait est dû à la présence du groupement hydroxyle dans les composés phénolique qui peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les antioxydants peuvent être considérés comme des réducteurs et inactivateur des oxydant (SIDDHYR-AJU et BECKER, 2007).

En comparant les tests réalisés pour la mise en évidence de l'activité antioxydante FRAP, DPPH, TAC, on trouve que les résultats sont similaires.

#### IV.6. Résultats de l'activité antibactérienne

##### IV.6.1. Caractères macroscopiques et microscopiques de microorganismes testés

Les caractères macroscopiques et microscopiques des différentes souches testées dans (Annexe 5).

##### IV.6.2. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique de *Raphanus sativus* L.

L'action bactériostatique se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné de l'extrait étudié. Ainsi le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre (Annexe 6).

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique de *Raphanus sativus* L. regroupés dans le tableau VI.

**Tableau VI :** Les diamètres des zones d'inhibitions (moyenne  $\pm$  ET) exprimés par l'extrait hydrométhanolique.

Microorganismes	Diamètres de zone d'inhibition (mm)
	Extrait
<i>S. aureus</i>	12.00 $\pm$ 0.00
<i>E. coli</i>	10.00 $\pm$ 0.5
<i>P. aeruginosa</i>	10 $\pm$ 0.00
<i>K. pneumonia</i>	9.00 $\pm$ 0.00

Les résultats des antibiotiques de référence sont indiqués dans le tableau VII :

**Tableau VII:** Diamètres des zones d'inhibitions des antibiotiques vis-à-vis les souches bactériennes testées :

ATB Souches	Diamètre des zones d'inhibitions en (mm)						
	CN	P	FOX 30	PN	AX	K	N 30
<i>S. aureus</i>	26	20	-	-	16	/	/
<i>E. coli</i>	26		-	-	14	18	/
<i>P. aeruginosa</i>	22		-	-	-	/	18
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	/	/

- Le diamètre des disques (6mm) est inclus dans la mesure des zones d'inhibitions
- (-) : absence de zones d'inhibitions.

Il ressort du tableau VII que l'extrait utilisé exerce un large spectre d'activité car il agit sur les bactéries gram positifs et négatifs mais le degré de sensibilité diffère d'une souche testée à une autre.

D'après les résultats obtenue, il apparait que les quatre souches bactérienne sont sensible car les diamètres d'inhibitions sont compris entre 9 et 14mm chez : *E. coli* 10 mm, *S. aureus* (12 mm), *P. aeruginosa* (10 mm), par contre chez l'extrait a montré une légère activité antibactérienne sur *K. pneumonea* avec un diamètre de zone d'inhibition de (9 mm).

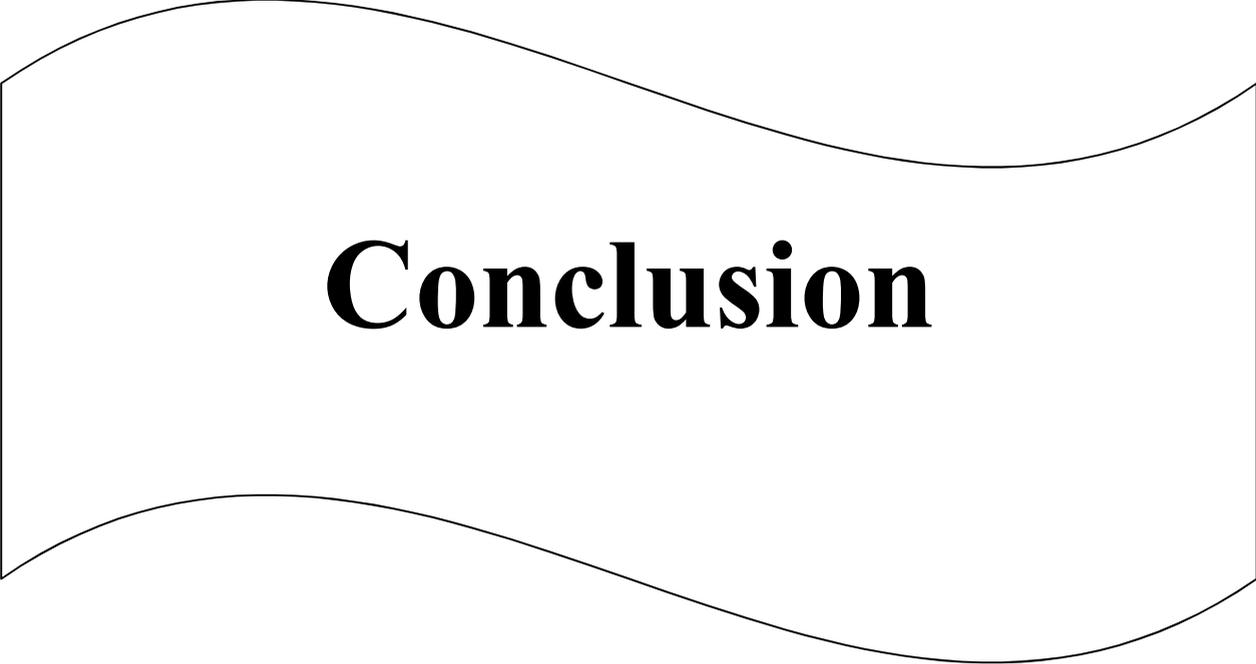
De plus nos résultats viennent consolider ceux rapportés dans la littérature que les terpénoïdes et les composés phénoliques montrent la plus grande activité antibactérienne et que la souche *S. aureus* est plus particulièrement sensible aux composés phénoliques (COWMAN, 1999).

Pour cette méthode de diffusion, un extrait est considéré comme actif lorsqu'il induit une zone d'inhibition. Ainsi, la zone d'inhibition de l'extrait chez les quatre souches est moins importante que celui obtenu par les antibiotiques de références (Tableau VIII).

D'après la recherche bibliographique il n'y a aucun travail portant sur l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique de la partie aérienne de *Raphanus sativus* L.

Cependant les travaux de BEEVI en (2008), sur l'extrait méthanolique. Les feuilles, les tiges, séparément de la même espèce, montrent une activité antibactérienne plus importante sur les mêmes souches testés *S. aureus* (19mm) ; *K. pneumoniae* (18mm de Ø) ; *E. coli* (13mm de Ø) ; *P. aeruginosa* (15mm de Ø).

D'après les résultats de cet auteur, l'extrait méthanolique est plus actif par rapport à l'extrait hydro méthanolique. Cependant l'extrait hydro méthanolique exerce une activité antibactérienne dans la mesure où il n'est pas un produit pur mais un extrait brute (SANOGO et al., 2006 ; WERNER et al., 1998).



# **Conclusion**

## Conclusion

---

### Conclusion

Au terme de cette étude qui a pour but d'évaluer in vitro l'activité antioxydante et antimicrobienne de l'extrait de *Raphanus Sativus* L. Toutefois, il nous a semblé opportun de vérifier la présence de molécules pouvant conférer cette activité à la plante. Ainsi le screening phytochimique a révélé la présence chez la plante des principales familles de composés chimique: Les tanins, les alcaloïdes, flavonoïdes, Anthocyane, flavones, tri terpènes, saponosides, Anthracénique combiné, ainsi cette plante possède des propriétés physicochimiques tel que la teneur en eau en cendre et un pH légèrement acide intéressante (cendre, l'eau, pH).

Le dosage de polyphénols effectué sur l'extrait hydrométhanolique de la plante sèche montre une teneur en considérable qui est de l'ordre de 136,6mg EAG/ g MS.

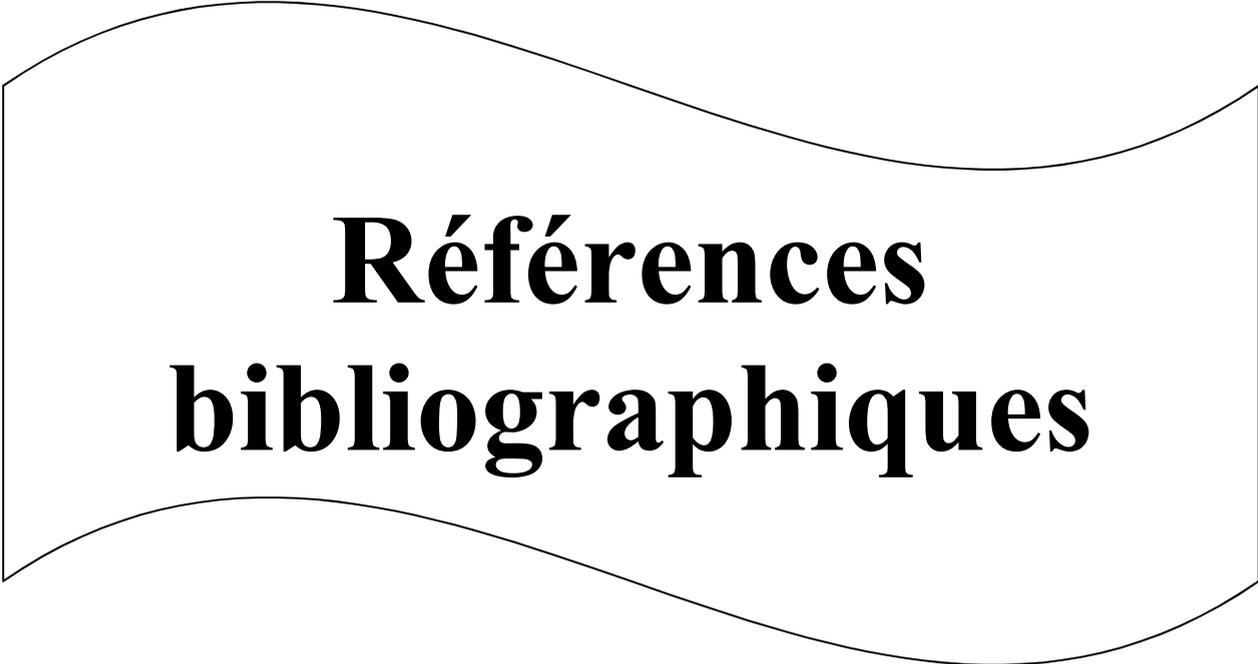
L'activitéantioxydantede l'extrait hydrométhanolique est évaluée par le test DPPH, FRAP et TAC a montré qu'ils exhibent un pouvoir antioxydant intéressant, Ces trois tests ont révélé une activité antioxydantrelativement proche, DPPH (65.65%), FRAP (64.14%), TAC (61.53%)

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne se sont avérés positifs vis-à-vis des bactéries grams positifs et négatifs. L'extrait utilisé a révélé des diamètres d'inhibitions assez proches qui varient de 9 mm à 12 mm les souches sont considérées dans ce cas comme étant sensibles.

Les tests phytochimiques réalisés sur *Raphanus sativus* L. montrent sa richesse en métabolites secondaires. Alors, il serait utile de faire extraire ces substances et les appliquer dans les différents domaines d'utilisations. Ainsi sont activité antioxydante importante suggéré son utilisation dans la conservation testée une étape préliminaire pour cette plante peu étudiée pour cela i est utile d'approfondir et accomplir l'étude de cette plante et cela par la détermination de la dose la plus efficace contre les germes pathogènes pour l'homme.

-De déterminer sa composition en élément minéraux.

-Un fractionnement des extraits et identification des molécules responsable du pouvoir antioxydant en utilisant des techniques plus performante.



**Références  
bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques

#### A

**ADEJAR O.Y., ODUWEBO O.O, OLADEL R.O., NWAOKORIE F.O., OGUNSOLA FT (2013).** In-vitro antifungal effect of Garcinia Lola and Garlic (*Alliums sativu*) on vaginal isolates of *Candida*. African journal of clinical and experimental microbiology, 14 (3):140-145.

**AHAMET S. (2003).** Etudes phytochimiques et des activités biologiques de *Balanites aegyptica* (Balanitaceae). Thèse de pharmacie, Bamako, 117 p.

**ARIMBOOR, R. et ARUMUGHAN, C. (2011).** Sea buckthorn (*Hippophaer hamnoides*) proanthocyanidins inhibit *in vitro* enzymatic hydrolysis of protein. J. Food Sci. 76(6):130-7.

#### B

**BAGRE I, BAHI C., MEIT S., DJAMAN A .J, GUED G. F (2006)** .Evaluation et amélioration de l'activité antifongique de *Morinda Morindoides* (Baker) Milne-Redh (Rubiaceae sur *Cryptococcus Neoformans*, un champignon responsable de mycose humaine. J scipharmbiol 7 (1).

**BEEVI S.S., MANGAMMOORI L.N., BANDI B.G. (2008).** Polyphénols profile, Antioxydant and radical scavenging activity of leaves and stem of *Raphanus Sativus* L. Plant Food Nutr, 65: 8-17.

**BEEVI S.S., MANGAMOORI L.N., ANABROLU N.(2010).** Comparative activity againts pathogenic bacteria of the root, stem, and leaf of *Raphanus sativus* L grown in india. Word J Microbiol Biotechnol, 25:465-473.

**BELAICHE P. (1979).** Traité de Phytothérapie et d'Aromathérapie. Tome l'aromathérapie. Ed. Maloine S.A. Paris.

**BELKHEIRI, N (2010).** Dérivés phénoliques à activités antiathérogènes. Thèse de Doctorat: Université de TOULOUSE.

**BENHAMOU N., ATIK BEKKARA F., Kadifkova P. (2008).** Antiradical capacity oh the phenol compounds of *Pistacia lentiscus* L. and atlantica Desf, Advances in Food Sciences. 29 (3), 155-161.

## Références bibliographiques

---

**BENJILALI B; TOUTAOUI E.A., ESMAILI-ALAOUI M. (1986).** Méthode d'étude des propriétés antiseptiques des huiles essentielles par contact direct en milieu gélosé. *Planta medicinales et phytothérapie*, 20, 155-167.

**BIDET D., GAIGNAULT J. C., GIRARD P et TROTIN F. (1987).** Inflammation, allergie, douleur et acide arachidonique: du jardin des Hespérides à la cascade de l'acide arachidonique: Les flavonoïdes. *L'actualité chimique*. 89 - 97.

**BIYITI L.F, MEKOO D.L, TAMSE V., AMYAM ZOLLO PH. (2004).** Recherche de l'Activité Antibactérienne de Quatre Plantes Médicinales Camerounaises. *Pharm Méd Trad Afr* 13:11-20.

**BOUCHOUKA, EL., DJILANI, A. et BEKKOUCHE, A. (2012).** Antibacterial and antioxidant activities of three endem.

**BRUNETON J. (1993).** Pharmacognosie et phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France :

**BRUNETON, J. (1999).** Pharmacognosie et phytochimie des plantes médicinales. 3<sup>ème</sup> édition. Tec&Doc. Paris. *ic plants from Algerian Sahara. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment* 11(1): 61-65 Lavoisier. 278-279.

*e*

**CAVIN A. (1999).** Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa* (Menispermaceae) *Merremia marginata* (Convolvulaceae) et *Orophea enneandra* (Annonaceae).

**COWMAN, MM. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 561- 582

**CRONQUIST A. (1981).** The evolution and classification of flowering plants. Second edition.

**CSEKE, LELAND J. (2006).** Edition. 2<sup>nd</sup> ed. Published. Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis, 2006. Physical Description. 611p: ill. ; 26cm.

## Références bibliographiques

---

Ⓓ

**DAHOUN., YAMNIK K., TAHROUCH S., IDRISSE L.M., BADOUC A and GMIRA N (2003).** Screening phytochimique d'une endémique Ibéro-Marocaine Thyme laealythroïdes. Bulletin de la société de pharmacie de Bordeaux, 142, 61-78.

**DAIRA N.H., SGHAIER R.M., AMONIS., LAOURNI D., HAMDY M., BOUJILAL J.(2013).** Composition and anti-inflammatory activities of *Artimisiaherba*, *Rutachalpensis L* and *PeganumharmalaL*. Food and chemical toxicology.55:202-208.

**DAS H.C., WANG J. H et LIEN E. J. (1994).** Carcinogenicity and cancer preventing activities of flavonoids: A structure-system-activity relationship (SSAR) analysis. p. 133 – 136. In: Jucker E ed. Progress in Drug Research. Basel: BirkhauserVerlag. Das H. C. et Weaver G. M. 1972. Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. J. Chromatogr. 67, 105 – 111.

**DIALLO D. (2000).** Ethno pharmacological survey of medicinal plants in Mali and phytochemical study of four of them: *Glinusoppositifolius* (Azoceae), *Diospyrosabyssinica* (Ebenaceae), *Entadaafricana* (Mimosaceae), *Trichilia emetic* (Meliaceae). Thèse de doctorat de recherche, Faculté des sciences de l'université de Lausanne Suisse.

**DIDRY N., PINKAS M. et TORCK M. (1982).** Sur la composition chimique et l'activité antibactérienne des feuilles de diverses espèces de *grindelia*. Pl. Med. Phytother. XVI, 7 -15.

**DOHOU N. (2004).** Approche floristique, ethnobotanique, phytochimique et étude de l'activité biologique de *thymelaalythroïdes*, thèse de doctorat, Maroc, 59 p.

Ⓔ

**EKOUMOU C.(2003).** Etudes phytochimiques et pharmacologiques de 5 recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite. Thèse pharmacie, Bamako, 145p.

Ⓕ

**FALLAH, H., KSOURI, R., CHAIEB, K., KARRAY-BOURAOUI, N., TRABELSI, N., BOULAABA, M. et ABDELLEY, C. (2008).** Phenolic composition of *Cynaracardunculus L.* organs, and their biological activities. Comptes Rendus Biologies 331 : 372-379.

## Références bibliographiques

---

**FLEURIET A., Jay-ALLEMAND C., MACHEIX J.J.(2005).** Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes* pp 121-216.

¶

**GERT, F. et STEPHANE, M. (2001).** Metabolit engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 155-160.

**GONZALEZ –GALLEGO J., SANCHEZ-CAMPOS. S. et TUNON M.J., 2007.** -Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutricionhospitalaria* 22(3):287-293.

**GUIGNARD J.L. (1996).** Abrégé de biochimie végétale, Ed. *Masson*, Paris, 160 p.

¶

**HAMIDI A. (2012).** Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Mémoire de magistère en chimie organique, Université Kasdi Merbah de Ouargla, 86 p.

**HARBORN J B. (1967).** Comparative biochemistry of the flavonoides. Academic press. New York, 1-130 p.

**HAYASE F. et KATO M. (1984).** Antioxidant compounds of sweet potatoes. *J. Nutri. Sci.*

**HNATYSZYN O., ARENAS P., MORENO A.R., RONDINA, R. et COUSSIO J.D. (1974);** Plantas reguladoras de la fecundidad segun la medicina folklórica; *Revista de la Sociedad Científica* 14; p: 37.

**HOFFMAN, D. (2003).** Medical Herbalism : The Science and Practice of Herbal Medicine. *Edition Inner Traditions / Bear & Co.*, p 90. *Vitaminol.* 30, 37 - 46.

¶

**JEAN-DENIS, J. B. (2005).** Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa défense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara viticola* (Berk. and Curt.). Thèse de Doctorat : Université de NEUCHÂTEL. et Phytothérapie : Developpements Recents. *Edition Garant*, page 12, 46.

## Références bibliographiques

---

**JEONG S.M., KIM S.Y., KIM D.R., JO S.C., NAM K.C., AHN D.U., Lee S.C. (2004).** Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3389–3393

**JUTIVIBOONSUK A., ZHANG H., TAN T.G., Ma C., VAN HUNG N., CUONG N.M., Bunyapraphatsara N., Soejarto D D., Fong H H S., 2005.** Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry* 66: 2745 – 2751

ℵ

**KHOKHR S, MAGNUSDOTTIR SGM. (2002).** Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J Agric Food Chem* 50:565–570

**KIM, D.-O., CHUN, O.K., KIM, Y.J., MOON, H.-Y. et LEE, C.Y. (2003).** Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6509-6515.

**KUMAR U., KUMAR B., BRANDARI A., & KUMARY. (2010).** Phytochemical investigation and comparison of antimicrobial screening of clove and cardamom. *International journal of pharmaceutical sciences and Research.* 1, 138-147.

ℒ

**LEE Y. et al. (1995).** Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars; *Journal of Food Science* 60 (3); p: 473-476.

**LI H-B. , WONG C-C., CCHENG K-W., FENG C. (2008).** Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 41(3), 385–390.

ℓ

**MABRY T.J et ULUBELEN A. (1980).** Chemistry and utilization of polyphenols including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.* 28, 188 - 196.

**MACHEIX J J., FLEURIET A. et JAY-ALLEMEND C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Ed Presses poly-technologiques et universitaires romandes.* p4-5.

## Références bibliographiques

---

**MAMADOU B., 2012.** Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali ». Thèse de doctorat, Mali, 92p.

**MANSFELD'S. (2011).** Database of agriculture and Horticultural crops. *Raphanus sativus*. Mansfeld. IPK-gatersleben. De (consulté le 31 janvier 2011). <http://mansfeld.IPK-gatersleben.de>).

**MANSOUR EL SAID S. (1990).** Studies on *Rutachalepensis*, an ancient medicinal herb still used in traditional medicine; Journal of Ethnopharmacology 28; Ed: ELSEVIER SCIENTIFIC; p: 305-3012.

**MAZOLLIER C. (2009).** Juillet 2009 Refbio maraichage PACA-variétés radis.

**MC GREGOR S.E. (1976).** Insect pollination of crops plants. US department of agriculture, Agriculture Handbook Wo 496, Washington, 411p.

**MIBENDZOU., MOUELLET A. (2004).** Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L. (papilionaceae) et *Halleaciliata* Aubrev & Pellegr. (rubiaceae) récoltées au Gabon, thèse de doctorat, Mali, 58 p.

**MUANDA, F. N. (2010).** Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse de Doctorat : Université PAUL VERLAINE-METZ

~

**NARAYANA K. R., REDDY M. S., CHALUVADI M. R. et KRICHNA D. R. (2001).** Bioflavonoids Classification, Pharmacological, Biochemical Effects and Therapeutic Potential. Indian Journal of Pharmacology. 33, 2-16.

o

**OKAMURA H., MIMURA A., YAKORA Y., NIWANO M. et TAKAHARA Y. (1993).** Antioxidant activity of tannins and flavonoids in *Eucalyptus rostrata*. Phytochem. 33, 557 – 561.

## Références bibliographiques

---

**OKUDA T., KIMURA Y., YOSHIDA T., HATANO T., OKUDA H. et ARICHI S. (1983).** Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects of lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 1625 - 1631.

### P

**PENICAUD, C. (2009).** Etude et modélisation du couplage entre le transfert d'oxygène et les réactions d'oxydation dans les aliments au cours de leur conservation. Thèse de Doctorat : Université de MONTPELLIER II.

**PETERSON, J., DWYER, J., ADLERCREUTZ, H., SCALBERT, A., JACQUES, P. & MC CULLOUGH, M. L. (2010).** Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.* 68(10), 571–603.

**PINCEMAIL, J., DEGRUNE, F., VOUSURE, S., MALHERB, C., PAQUOT, N. & DEFRAIGN, J.-O. (2007).** Effet d'une alimentation riche en fruits et légumes sur les taux plasmatiques en antioxydants et des marqueurs des dommages oxydatifs. *Nutrition clinique et métabolisme* 21,66–75.

### R

**RAVN H., ANDARY C., KOVACS G. et Molgaard P. (1984).** Caffeic acid esters as in vitro inhibitors of plant pathogenic bacteria and fungi. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 175 – 1

**RIBEREAU G P.(1968).** Les composés phénoliques des végétaux. Dunod, Paris, 254 p.

**ROSENFELD M. (2008).** Les plantes médicinales, Edition de Vecchi S.A, Paris, 262p.

**ROUX, D. & CATIER, O. (2007).** Botanique, Pharmacognosie et Phytothérapie. *Wolters Kluwer France Edition*, p 74. 84

### S

**SAINTIVU, P., NOTT K., RICHARD, G., BLECKER, C., JEROME, C., WATHELT et, J.-P., PACOT, M. & DELEU, M. (2012).** Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: a review. *Biotechno. Agron. Soc. Environ.* 16(1), 115-124.

## Références bibliographiques

---

**SIDDHURAJU P., BECKER K. (2007).** The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chemistry*, 101(1), 10-19.

**SINGLETON V. L., ROSSI J. A. (1965).** Indice de Folin. polyphenols totaux. *J. Eol. Vitic.*, - 16: 144-158.

**STAVRIC B. et MATULA T. I. (1992).** Flavonoids in food. Their significance for nutrition and health. p. 274 - 294. In: ONG ASH et Packer L eds. *Lipid soluble and antioxidants: Biochemistry and clinical applications*. Basel: Birkhauser Verlag.

**SVOBODA K.P. et HAMPSON J.B. (1999).** Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.

7

**TREASE et EVANS W.C. (1987).** *Pharmacognosie*, Billiaire Tindall. London 13<sup>th</sup> ed.

u

**URQUIAGA I. et LEITHON F. (2000).** Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological Research*. 33 (2): 55-64.

u

**YILDRIMA., MAVI A. et KARA A.A. (2001).** Determination of antioxidants and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:411-420.

## Références bibliographiques

---

- **Autres references:**

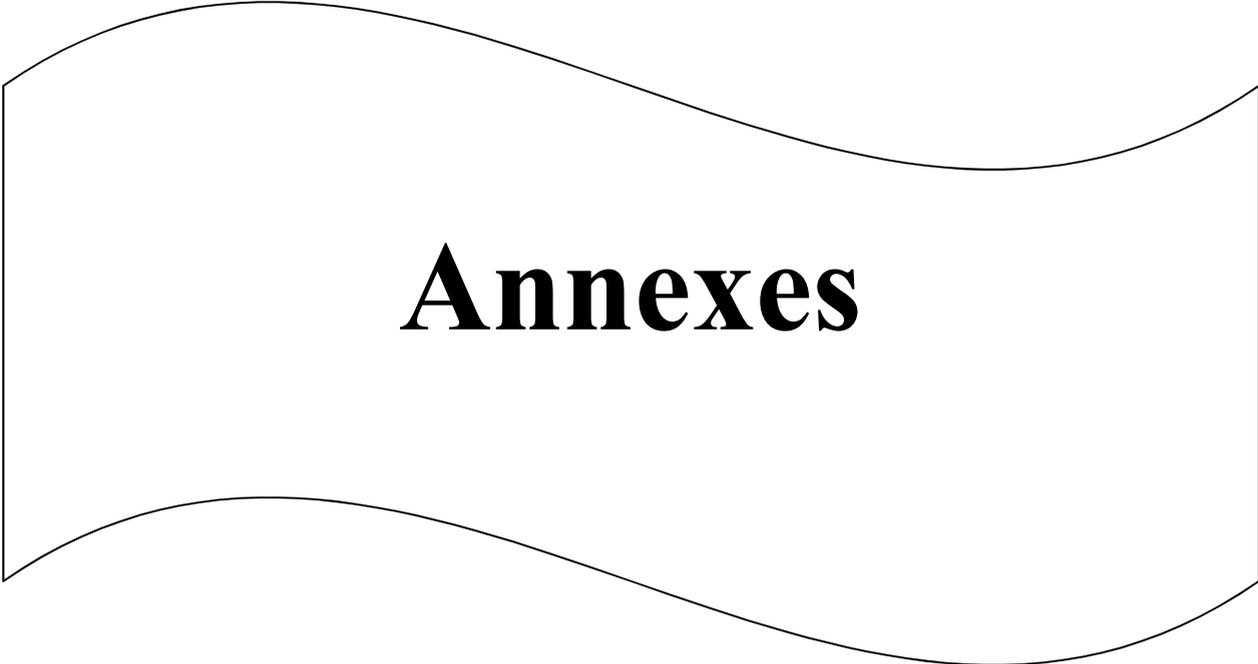
**Anonyme 1 :** [https://wikivisually.com/lang-FR/wiki/fichier: Tubercule.de-radis. jpg](https://wikivisually.com/lang-FR/wiki/fichier:Tubercule.de-radis.jpg).

**Anonyme 2:** (<https://indiabiodiversity.org/species/show/230913#SpeciesField5-1>).

**Anonyme3:** [Www.agrobioperigod.fr/upload/biodiv/web](http://www.agrobioperigod.fr/upload/biodiv/web) (Fiches) BRASSICACEES. pdf. 2013

**Anonyme 4 :** Fiche descriptive et classification des variétés de radis inscrites au catalogue officiel français plante potagères 1995. Ed=GE UES.

**SHIPPER RR (2004).** *Raphanus sativus* L.(Internet) Fiche de protabase. Grubben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editeurs). Prota (Plant Resources of tropical Africa/ Ressources végétales de l'Afrique tropical), wageningen, pays bas.



# **Annexes**

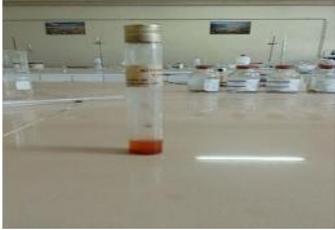
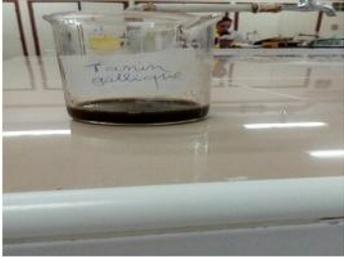
## Annexes

### Annexe 1: Matériel utilisé

Outillage	Appareillage	Produits et réactifs chimiques	Milieu de culture
Flacon Tubes à essai Fioles Béchers Passoire Entonnoirs Pinces Micropipettes Anses Filtres Pipettes pasteur Ecouillons Erlenmeyer Papier wattman Papier aluminium Boîtes de pétri Bec bensen	Etuve Broyeur électrique Réfrigérateur Bain marie Spectrophotomètre Autoclave Agitateur à plaque chauffante Vortex Balance de précision centrifugeuse	Eau-distillée Acide ascorbique $C_6H_8O_6$ (vitamine C) Dragendorff Stiasny Hydroxyde de sodium Coupeau de magnésium Ether de pétrole méthanol Chlorure ferrique $FeCl_3$ Acide sulfurique $NH_4OH$ Ethanol chlorhydrique alcool isoamylique Chloroforme $CHCl_3$ Acide acétique $NaOH$ Phosphate dibasique de sodium $NaHPO_4$ Phosphate monobasique de sodium $NaH_2PO_4$ Tampon phosphate Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ Acide trichloroacétique $C_2HCl_3O_2$ 10% Réactif Folin-Ciocalteu Bicarbonate de sodium $NaCO_3$ Acide gallique Eau physiologique $NaCl$ 9g/l Disques d'antibiotiques	Milieu MH (Mueller Hinton)

## Annexes

### Annexe 4: Resultants de l'analyse phytochimiques

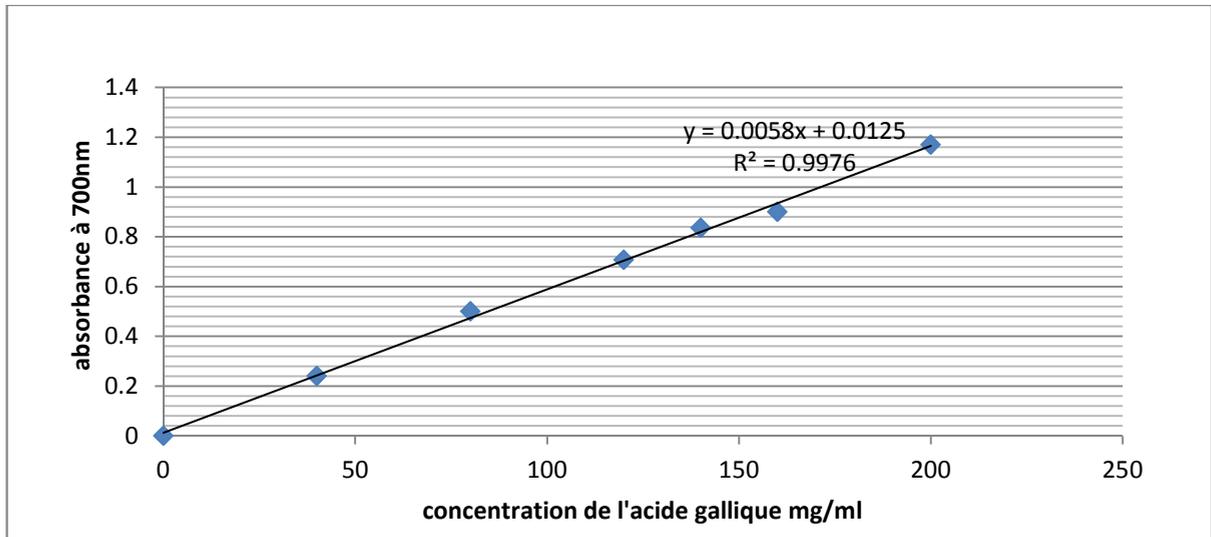
Métabolites secondaires	Aspect
Tanin cathélique	
Tanin gallique	
Alcaloïde	
Coumarine	
Anthocyanes	<p style="text-align: center;">↓</p>
Flavone	

## Annexes

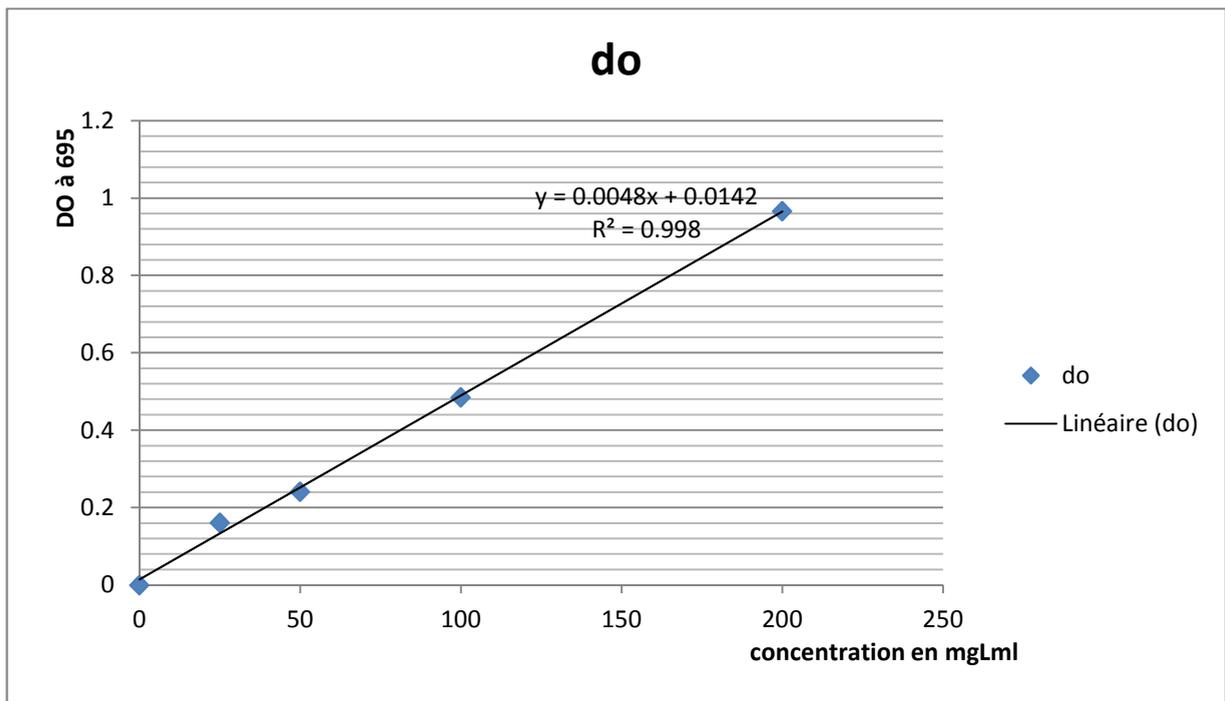
Stérol	
Triterpène	
Saponoside	
Anthracéniques combinés	
	

## Annexes

Annexe 3: Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



Annexe 4 : la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique



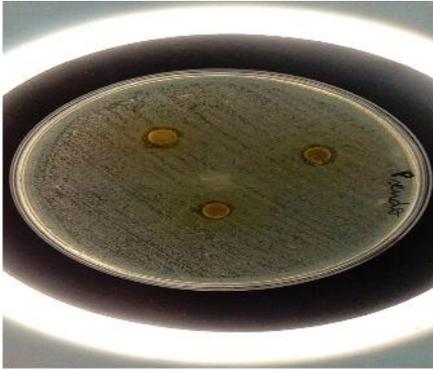
## Annexes

**Annexe 2 :** Caractères macroscopiques et microscopiques des différentes souches.

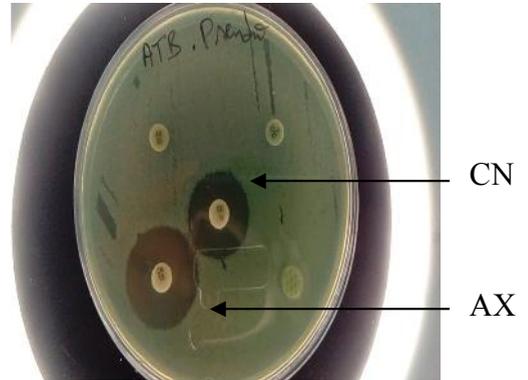
<b>Souches</b>	<b>Milieu de culture</b>	<b>Gram</b>	<b>Aspect macroscopique</b>	<b>Aspect microscopique</b>
<i>S. aureus</i>	Gélose nutritive	Positif	Colonies jaune dorées de 1 mm de diamètre, rondes, lisses, bombées	Cocci groupé an amas ou en grappes de raisin
<i>P. aeruginosa</i>	Gélose nutritive	Négatif	Colonies jaune vertes, large de 2 à 3 mm de diamètre à bords réguliers, surface lisse, plates sur les bords et un peu bombé au centre	Bacilles fin, droit, isolé ou groupé en diplobacilles
<i>E. coli</i>	Gélose nutritive	Négatif	Colonies de 2 mm de diamètre, ronde bombée à contours réguliers, surface lisse	Bacilles de forme cylindrique, se présente seul ou groupé en diplobacilles et rarement en amas
<i>K. pneumoniae</i>	Gélose nutritive	Négatif	Colonie jaune dorées	Bacilles bien que souvent sous forme de filaments

## Annexes

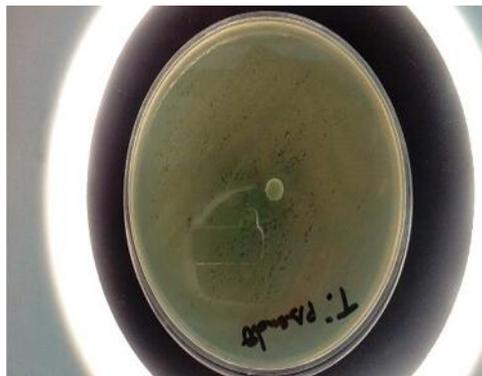
**Annexe 5:** Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait hydrométhanolique de *Raphanus sativus* L.



Zones d'inhibitions d'extrait hydrométhanolique vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa*



Zones d'inhibitions des antibiotiques de références 1(CN), 2(AX) contre *P. aeruginosa*



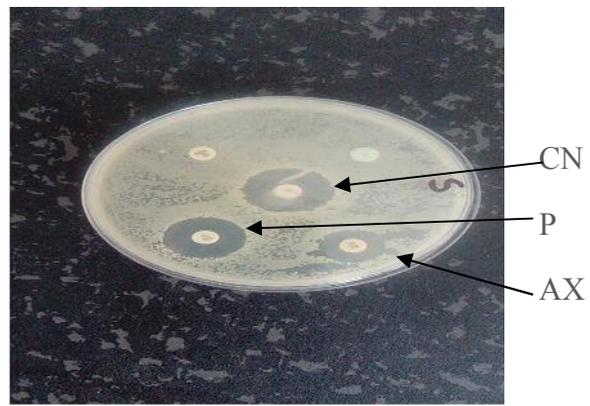
Témoin négatif (DMSO)

## Annexes

---



Zones d'inhibitions d'extrait hydrométhanoliques vis-à-vis *Staphylococcus aureus*

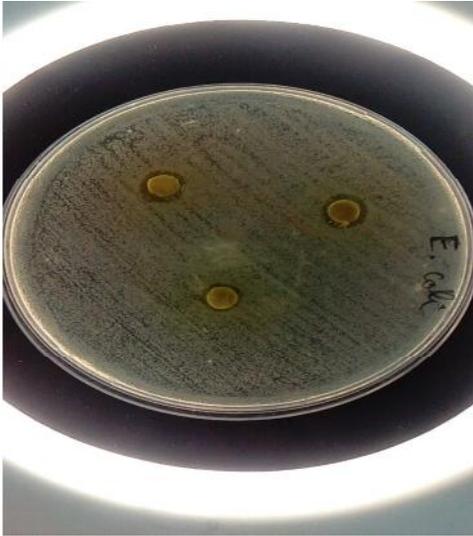


Zones d'inhibitions des antibiotiques de références 1(CN), 2(P), 3(AX) contre *S. aureus*

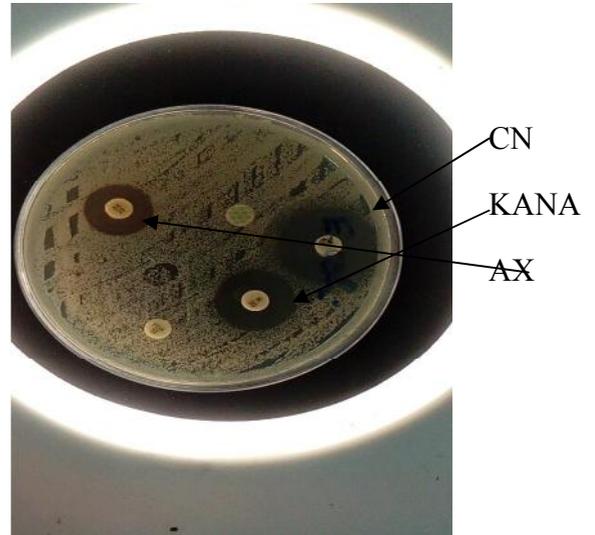


Témoin négatif (DMSO)

## Annexes



Zones d'inhibitions d'extrait  
hydrométhanoliques vis-à-vis  
*E. coli*



Zones d'inhibitions des  
antibiotiques de références 1(CN),  
2(KANA), 3(AX) conte *E. coli*



Témoin négatif (DMSO)

## Annexes

---



Zones d'inhibitions d'extrait  
hydrométhanoliques vis-à-vis de  
*K. pneumoniae*



Zones d'inhibitions des antibiotiques de  
références, CN, P, FOX, PN, AX contre  
*K. pneumoniae*



Témoin négatif (DMSO)