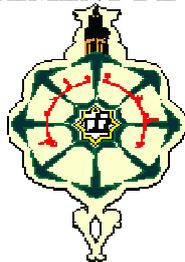


UNIVERSITÉ ABOU BEKR BELKAID
FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE CHIMIE



THÈSE

en vue de l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT D'ETAT

Discipline : Chimie Organique Appliquée

THÈME

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE
DE DEUX PLANTES MÉDICINALES SAHARIENNES

Oudneya africana R.Br. et *Aristida pungens* L.

Présentée par

Melle **BOUHADJERA Keltoum**

JURY

Président	: Mr. TALEB BENDIAB S.A.	Professeur à UABB
Examineur	: Mr. DADA MOUSSA B.	MC à l'Université d'Ouargla
Examineur	: Mr. CHERITI A.	MC au Centre Universitaire de Béchar
Examineur	: Dr. YACOUTA-NOUR A.	MC à UABB
Encadreur	: Mr. TABTI B.	Professeur à UABB

Année Universitaire : 2004-2005

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Synthèse Organique, Substances Naturelles et Analyses sous la direction de Monsieur le Professeur TABTI B. de l'Université de Tlemcen. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour son accueil, son soutien et ses nombreux conseils qu'il a su me prodiguer tout au long de ce doctorat.

Je tiens aussi à remercier Monsieur GUENARD D., directeur de recherche au CNRS, Institut de Chimie et de Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, Paris, pour m'avoir accueillie chaleureusement dans son équipe. Je lui suis extrêmement reconnaissante de l'intérêt qu'il a porté à mon travail, de sa grande disponibilité et de sa sympathie.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur TALEB BENDIAB S.A. de l'Université de Tlemcen pour avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie également Monsieur DADA MOUSSA B. Maître de Conférences à l'Université d'Ouargla, tout d'abord pour avoir accepté de participer à ce jury et également pour m'avoir apporté soutien, confiance et aide dans le cadre de mes enquêtes et de mes récoltes de plantes à Ouargla.

Ma gratitude va également à Monsieur CHERITI A., Maître de Conférences au Centre Universitaire de Béchar pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury.

Je souhaite exprimer mes remerciements à Docteur YACOUTA-NOUR A., Maître de Conférences à l'Université de Tlemcen, pour avoir accepté de participer à ce jury. Un grand merci à elle pour m'avoir autorisée à effectuer les expériences de la partie minérale de mon travail dans le laboratoire de Chimie Inorganique, Environnement et Santé.

Mes sincères remerciements vont également, à Monsieur CHOUKCHOU-BRAHAM A. Professeur à l'Université de Tlemcen et Monsieur ABDERRAHIM O. Chargé de Cours à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir effectué les analyses de la spectrométrie d'absorption atomique.

Je tiens à remercier vivement le Professeur HAKEM I.F. à l'Université de Tlemcen, pour son aide, ses conseils et sa sympathie qui furent pour moi une source constante de motivation. Son foisonnement d'idées fut aussi pour moi une source inépuisable d'inspirations et de discussions. Je lui exprime ici toute ma gratitude et ma sympathie.

Je tiens à remercier Monsieur BENDAHOU M., Chargé de Cours à l'Université de Tlemcen pour m'avoir effectué les tests anti-microbiens.

Je tiens également à remercier Monsieur CHAHMA A., chargé de Cours à l'Université d'Ouargla, pour m'avoir aidée dans mes sorties pour les récoltes de plantes et pour m'avoir aidée à l'identifier.

Je remercie également toutes les personnes avec lesquelles j'ai travaillé ou simplement discuté. Elles ont toutes leur place ici.

Je remercie également tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenue contre vents et marées.



Introduction

INTRODUCTION

Les substances naturelles dont les plantes constituent la source principale, représentent près de 60% des médicaments dont nous disposons. Les 40% restants ou médicaments de synthèse sont souvent nés de la modification chimique de molécules ou de parties de molécules naturelles prises comme 'têtes de séries'. Depuis toujours, les plantes ont constitué la source majeure de médicaments grâce à la richesse des métabolismes secondaires.

Cependant, l'efficacité des médicaments a décru, de grande variété d'espèces bactériennes et fongiques responsables des infections nosocomiales sont apparues. Devant cette recrudescence, la mise au point d'un nouveau médicament est capitale.

A l'heure actuelle, la recherche de nouveaux médicaments d'origine naturelle passe par l'inventaire des plantes et l'examen systématique de leur activité biologique. Un des guides du chimiste dans la problématique d'une recherche phytochimique est la recherche à l'empirisme et plus particulièrement aux usages traditionnels liés aux activités humaines. Au Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde possédant dans sa partie Nord le Sahara septentrional, existe une végétation diffuse et clairsemée. La flore spontanée dans cette zone est encore mal étudiée et mérite une attention particulière. Par ailleurs, au Sahara, la lutte contre la sécheresse, bien que dominant toute la physiologie des végétaux ne constitue pas le seul aspect de leur adaptation au milieu. Ces plantes ont à lutter contre d'autres facteurs défavorables : la température, le vent, le sel et les animaux. Il s'est ainsi développé une stratégie de subsistance en développant leur système racinaire qui leur permet éventuellement d'extraire du sol les métaux lourds. L'hyperaccumulation des métaux lourds semble en fait, avoir une grande importance écologique. Elle influencerait notamment sur la résistance à la sécheresse, les interactions avec les plantes adjacentes et la défense contre les herbivores et les bactéries pathogènes.

En outre, les sols sahariens composés d'un substrat minéral développent une activité microbienne. Ainsi conçues, les plantes médicinales sahariennes pourraient posséder des molécules antibactériennes et antifongiques à spectre d'action intéressant.

C'est dans cette optique que se place ce présent travail. En se basant sur les résultats d'une enquête ethnopharmacologique effectuée auprès de la population autochtone de la région d'Ouargla, nous avons choisi deux plantes pour notre étude.

La méthode globale de travail que nous avons adoptée, est basée sur une action pluridisciplinaire, visant une valorisation des plantes sahariennes et permettant de relier conformément les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes, au travail des chimistes et des biologistes. Les deux plantes que nous avons retenues sont une dicotylédone-angiospermes *Oudneya africana* R.Br. appelée localement 'Hanet el l'ibel' de la famille des brassicaceae (crucifères) et une monocotylédone-angiospermes *Aristida pungens* L. appelée localement 'Drinn' de la famille des graminées (poaceae).

Le choix de ces deux plantes a été guidé d'une part par les indications d'usage traditionnel, et d'autre part par le fait que *Oudneya africana* R.Br. n'a pas fait l'objet d'investigations chimique et biologique, quant à *Aristida pungens* L. seulement deux travaux ont été réalisés : un dosage biochimique des polysaccharides et des lignines pariétaux des tissus foliaires et une étude morphologique des fibres foliaires.

Nous présentons notre travail en quatre parties :

- une contribution phytochimique des familles de composés chimiques présentes dans les différentes parties d'*Oudneya africana* R.Br. (rameaux primaires (R1), rameaux secondaires (R2), rameaux tertiaires (R3), racines (R), feuilles (L) et fruits (F)) et dans les différentes parties d'*Aristida pungens* L. (tiges (T) et feuilles (F)).

- une extraction sélective de ces familles dans les feuilles et les fruits dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. et dans les tiges et les feuilles dans le cas d'*Aristida pungens* L., suivie de la purification des extraits obtenus par chromatographie sur colonne de gel de silice.

- une évaluation du caractère d'accumulation par la détermination de la teneur des métaux lourds dans les parties aériennes de nos deux plantes.

- une étude biologique des extraits des feuilles et des fruits dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. et les extraits des tiges et des feuilles dans le cas d'*Aristida pungens* L. vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, levures et moisissures.



Partie Théorique

I- PRESENTATION DES PLANTES ETUDIEES

I.1- PRESENTATION DES CRUCIFERES

Les brassicaceae appelées autrefois ‘crucifères’ constituent une importante famille de plantes dicotylédones représentées dans le monde entier, mais principalement dans les régions tempérées de l’hémisphère Nord. ^[1] Leur proportion dans la flore phanérogame diminue lorsqu’on s’éloigne des régions polaires ; il y a 19 % de crucifères dans la flore du Spitzberg, mais 1 % seulement au Sénégal. ^[2, 3]

Les brassicaceae peuplent la presque totalité des habitats et des milieux de vie possibles : sables et rochers maritimes, bords de ruisseaux, talus calcaires, pelouses humides ou sèches, cultures et jardins, bords de chemins, cailloutis et prairies de montagne, Les moutardes, choux, radis et quelques plantes ornementales (aubriéties, ibéris, giroflées) comptent parmi les crucifères.

Cette famille évoluée présente une grande homogénéité dans le type de fleur et le modèle de fruit. ^[4] En effet, c’est la disposition en croix des pièces du périanthe qui permet de reconnaître immédiatement une crucifère (d’où le nom donné à cette famille). Le fruit comporte deux loges séparées par une cloison médiane qui porte les graines : c’est une silique.

Il existe 4 000 espèces avec plus de 350 genres dont 78 en France. ^[5] Ce sont des plantes herbacées à racine pivotante, dont les tiges portent des feuilles sans stipules, alternes ou toutes à la base. Elles élaborent des sénevolts de types variés, qui leur donnent des propriétés médicinales et alimentaires.

Les grappes florales, souvent odorantes et généralement de couleur vive, attirent les insectes. L’existence d’un appareil nectarifère renforce ce caractère d’entomophilie.

Exceptionnellement, en l’absence d’insectes, il peut y avoir autofécondation ; celle-ci devient la règle pour de petites plantes bordant les lacs, les *Subularia*, où la fécondation peut s’effectuer même si la fleur reste submergée. Les grappes, de type indéfini, n’ont pas de bractée. Le périanthe comporte des pièces non soudées : quatre sépales et, en alternance, quatre pétales (corolle dialypétale).

Le nombre et la disposition des sépales et les pétales sont tellement constants et remarquables que l'on a donné le nom de crucifères – ou porte-croix – à la famille, au lieu de l'appeler du nom d'un genre important. ^[5, 6]

De nombreuses crucifères sont cultivées dans les jardins et les champs comme plantes ornementales (monnaie-du-pape) ou alimentaires ; antiscorbutiques, stimulantes et dépuratives, on les utilise en salade (cresson, radis...), condiment (moutarde...) ou légume (chou, navet...). On extrait de l'huile des graines de colza et de caméline.

Certaines espèces servent de fourrage. D'autres enfin ont des propriétés tinctoriales, autrefois réputées, comme le pastel ou *Isatis* (teinture bleue). ^[5, 7]

I.1.1- Quelques applications médicales des crucifères

Les végétaux crucifères qui rassemblent des légumes comme les brocolis, les choux, les choux de Bruxelles ou les choux-fleurs semblent avoir le pouvoir de diminuer les risques de cancer œstrogène dépendants.

Ils contiennent en effet deux substances chimiques : l'Indole-3-Carbinol et la Diindolylméthane, qui ont la capacité de réduire les taux de l'hormone 16 α -hydroxyoestrogène.

Des études ont montré que les femmes atteintes d'un cancer du sein ont généralement des taux particulièrement élevés de cette hormone.

Les crucifères forment une molécule appelée isothiocyanate (molécule soufrée). Cette dernière diminue la toxicité, accélère l'élimination des pathogènes et des substances cancérigènes et apparaît comme inhibiteur pour les nitrosamines et les hydrocarbures polycycliques. ^[8]

I.1.2- Caractérisation d'*Oudneya africana* R.Br.

Les buissons d'*Oudneya africana* R.Br. mettent ça et là, au bord des oueds et les rocailles la note vive de leurs fleurs d'un beau rose violacé. Les fleurs épanouies parmi les gousses des fruits sont dressées en grappes distinctives.

- Floraison : hiver-printemps

- Habitat : rocailles, terrains gypseux, Sahara septentrional

- Aire géographique : endémique, Algérie-Tunisie

- Etymologie de la plante : endémique de Sahara.

Cette plante est qualifiée d' 'africaine'.

I.1.3- Description botanique

Oudneya africana R.Br. est un arbrisseau rameau atteignant plus de 1.50 m de hauteur, à feuilles longues de 2 à 3 cm, charnues, légèrement spatulées et d'un vert foncé ; à fleurs grandes à quatre sépales dressés et quatre pétales onguiculées d'un rose violacé vif, à veines plus foncées ; à six étamines (dont deux plus courtes) à anthères jaunes autour du pistil et à fruits siliques dressées, longues, à bec court et plutôt charnu, à graines largement ailées (**Figure 1**).^[6, 7]

I.1.4- Classification

Notre espèce est classée comme suit :

Genre : *Oudneya*

Espèce : *africana*

Famille : brassicaceae (crucifère)

Règne : encaryotes végétaux ; Sous –règne : carmophyte

Sous embranchement : angiospermes ;

Classe : dicotylédone ; Sous classe : dialypétale

Série : thalamiflore, litiflore

Ordre : pariétales ; Sous ordre : rhoédale

1.1.5- Usage thérapeutique et travaux scientifiques réalisés sur *Oudneya africana* R.Br.

Selon notre recherche bibliographique, cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude auparavant. Les habitants d' Ouargla utilisent cette plante comme pâte (pâte = plante réduite en poudre et humectée à l'eau) contre les maladies de la peau (effet dermatologique) et aussi contre les piqûres des insectes.

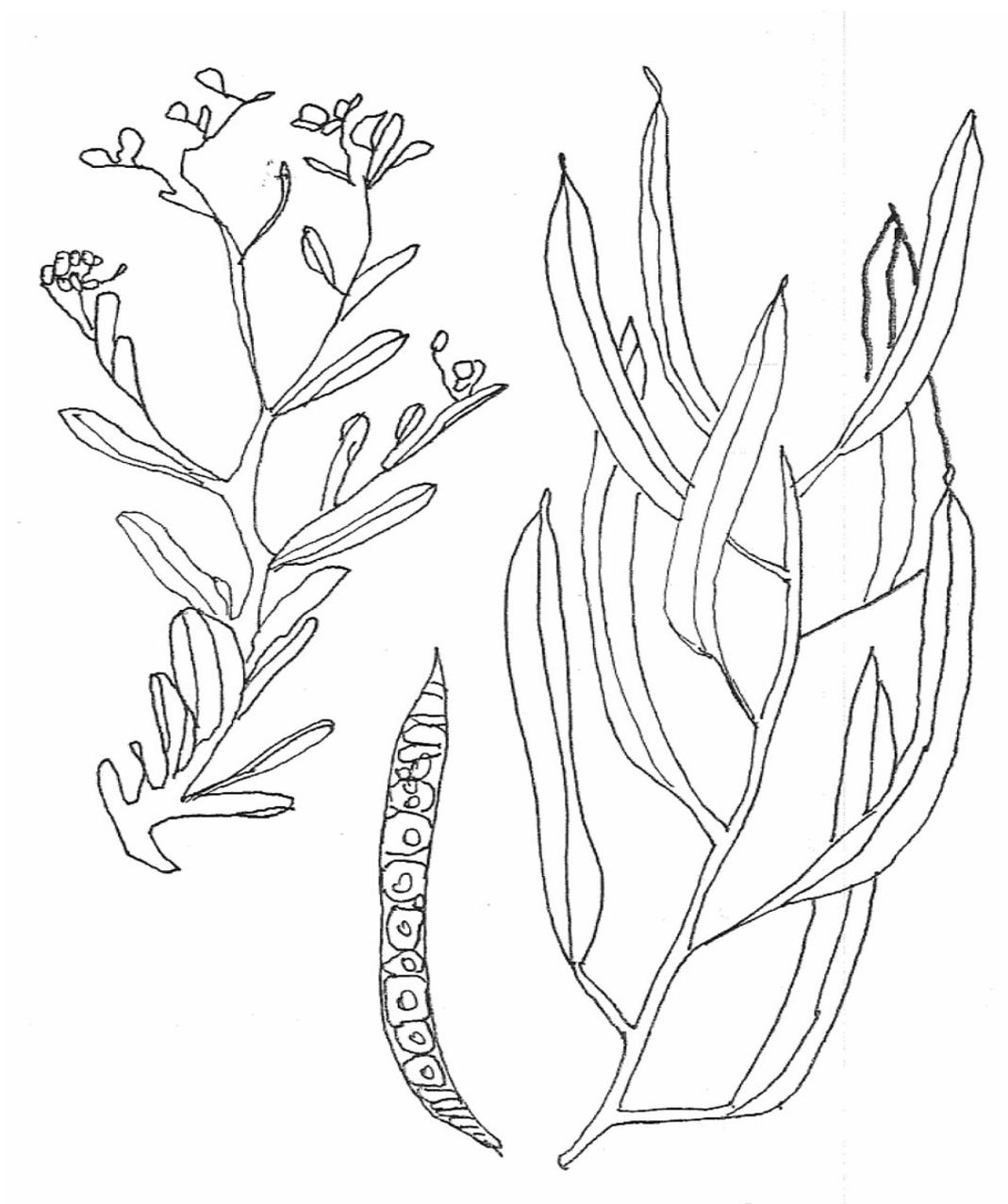


Figure 1 : *Oudneya africana* R.Br.

I.2- PRESENTATION DES GRAMINEES

Les graminées constituent sur d'immenses étendues des peuplements homogènes tels que prairies des régions tempérées et froides, steppes des régions sèches, savanes, jungles à bambous des régions tropicales, marais à roseaux,

Les graminées comprennent plus de 9000 espèces décrites, groupées en 635 genres et 6 sous familles ; festucoïdées, panicidées, chloridoïdées bambusoïdées, oryzoidées et phragmite formes. ^[9]

Ce sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces dépassant parfois 1 m de hauteur, ^[10, 11] pourvues très souvent de souches très résistantes, attachées à un système racinaire fort développé et capable de régénérer des pousses (imovations) à la base des parties broutées. ^[12]

Les graminées présentent une structure végétative de base assez uniforme. Les racines principales sont généralement fibreuses. Des racines secondaires, appelées racines adventives, peuvent provenir des nœuds des tiges et constituer des racines de soutien (cas du maïs).

Les graminées ont de nombreuses tiges dressées provenant d'une souche souterraine rampante qu'on appelle 'Rhizome'. Ces tiges sont creuses dans les entre nœuds et pleines aux nœuds généralement enflés.

Il existe des tiges piquantes (maïs) et des tiges ligneuses (certains bambous).

Les feuilles sont sessiles et comprennent deux parties : la gaine et le limbe. La gaine, caractéristique distinctive des graminées, entoure la tige et soutient la zone située juste au-dessus de chaque nœud, composée de tissus de croissance appelés méristème. En effet, la tige des graminées croît en longueur, non à partir de l'extrémité, comme la plupart des plantes, mais sur toute la longueur des entrenœuds. ^[13]

Une autre caractéristique remarquable des graminées est la ligule, languette poilue ou membraneuse placée à l'endroit où l'enveloppe de la feuille rejoint le pédoncule. La fonction de la ligule reste toujours inconnue. Son rôle est éventuellement d'empêcher l'humidité de s'accumuler entre tige et enveloppe.

Le pédoncule des feuilles est long et étroit, présentant des veines parallèles, de taille et de forme très variées. Il est pourvu d'une zone méristématique, située à l'endroit où il rejoint l'enveloppe.

La croissance se fait dans cette zone plutôt qu'à l'extrémité de la feuille comme chez la plupart des plantes. Ainsi, même si l'extrémité supérieure de la feuille est coupée, le pédoncule continue à croître. Cette caractéristique, associée à la présence de méristème dans la tige et au fait que les graminées se ramifient à proximité du sol, les rend relativement résistantes aux rigueurs de l'environnement.

L'utilisation des graminées comme pelouses est une application de ces caractéristiques, car elles continuent à pousser même après la tondaison. En outre, les graminées supportent d'être brûlées, broutées et piétinées et deviennent dominantes après de tels accidents. ^[14]

D'autre part, l'intérêt des graminées est mondial. En effet, elles fournissent une part prépondérante de l'alimentation : à la fois directement puisqu'elles comprennent presque toutes les céréales et indirectement, par leur rôle essentiel dans la nourriture des mammifères herbivores producteurs de viande.

Spontanément, les graminées constituent l'élément de prairies, steppes et savanes qui couvrent une superficie importante des continents.

Les indo-européens, dans leur ensemble, se sont attachés au peuplement correspond presque exactement à celle de la production du froment et de quelques 'céréales secondaires' (orge, seigle).

Les asiatiques ont tiré leur principale nourriture de la culture du riz, les amérindiens, de celle du maïs, les africains du Sorgho et du Mil. Les habitants des régions tropicales ont toujours fait usage des bambous et des roseaux pour leurs habitations, leurs outils et leur industrie. Il convient aussi, de rappeler le grand rôle de la canne à sucre et des autres graminées sucrières dans l'alimentation humaine. ^[15]

En Algérie, les graminées occupent une aire très étendue (4 millions d'hectares). Les plus représentées sont l'Alfa (*Stipa tenacissima* L.), le Sparte (*Lyggeum spartum* L.) et l'Aristida (*Aristida pungens* L.). Elles présentent une adaptation à la sécheresse (climat sec et aride) couvrant plusieurs millions d'hectares constituant ainsi une plasticité écologique importante. ^[16, 17] Cette plasticité écologique leur attribue une place de choix dans les projets de reforestation et de lutte contre la désertification.

I.2.1- Caractérisation d'*Aristida pungens* L.

Le genre *Aristida* comporte de nombreuses espèces, plus de 300, particulièrement communes dans les régions sèches de l'Afrique tropicale (Sahara méridional, sahel). [18, 19] En Algérie, ce genre est représenté par 11 espèces. [20]

L'espèce *Aristida pungens* L. est vulgairement appelée 'Drinn' en Algérie, [20, 21] 'Sbott' en Libye [22] et 'Toulloultou aghifouf' au Maroc. [23]

La vie végétale de 'Drinn' dure toute l'année et la plante est toujours verte. *Aristida pungens* L. est caractérisée par des feuilles dures enroulées et piquantes, racines très longues et tiges atteignant un mètre (**Figure 2**).

La germination du 'Drinn' se fait à 25C°, considérée comme température optimale. Elle est caractérisée par deux périodes de vie : une vie ralentie (Août à Mars) et une vie active (Avril à Juillet). [24]

I.2.2- Classification

Notre espèce est classée comme suit :

Genre : *Aristida*

Espèce : *pungens*

Famille : graminées (poacées) ; Sous famille : enpanicoïdées.

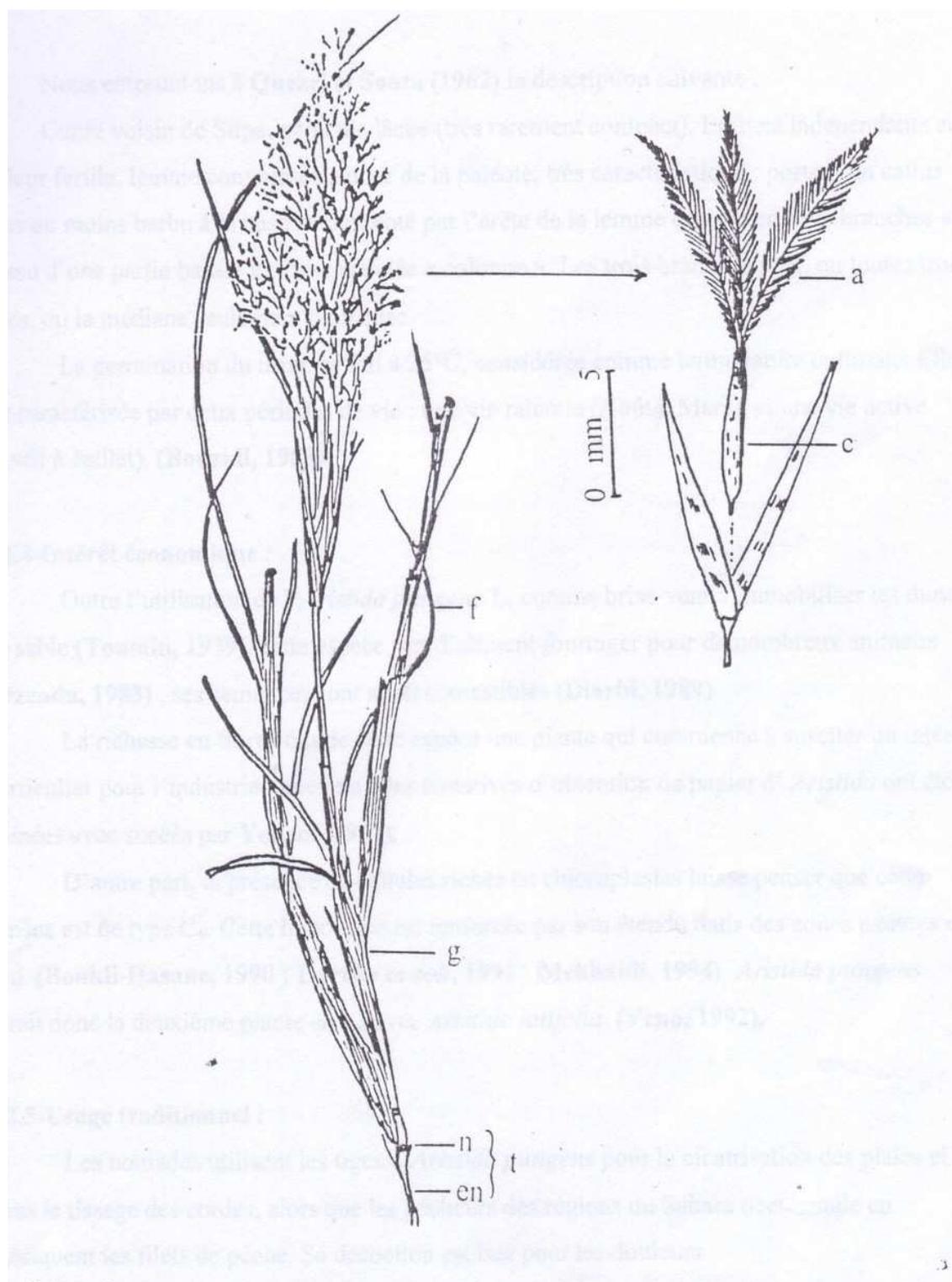
Embranchement : spermaphytes ; Sous-embranchement : angiospermes

Classe : monocotylédones.

Série : monocotylédone hypogynes (fleurs à ovaire supères).

Ordre : glumiflorales

Tribu : aristideae



Légendes : a : arête ; c : caryopse ; en : entre noeuds ; f : feuille ; g : gaine ;
n : noeud ; t : tige.

Fig1 Morphologie générale de la partie aérienne d'*Aristida pungens* L.
(d'après Ozenda, 1983).

Figure 2 : *Aristida pungens* L.

I.2.3- Répartition géographique

Le genre *Aristida* est présent dans l'Atlas saharien et les hauts plateaux. [25] Il a été signalé aussi au moyen orient notamment en Egypte, [26] au Sirai, [27] aux Etats-Unis [28] et en Australie. [29] Au Sahara oriental, les sables mouvants présentent une végétation herbacée avec des *Aristida*. [30]

Aristida pungens L. se rencontre dans les étages arides et sahariens et est signalée dans le Hoggar. [31] Elle se développe sur les glacis et dans les dépressions recouvertes de dépôts de sable. Elle est également répandue au Sahara occidental et en Asie central. On la trouve également, dans la partie orientale du Maroc. [32]

I.2.4- Intérêt économique et travaux scientifiques réalisés sur *Aristida pungens* L.

Aristida pungens L. est utilisée comme brise-vent à immobiliser les dunes de sable, [33] ses semences sont comestibles. [34]

Une étude quantitative et qualitative des parcours à base d'*Aristida pungens* L. à Ouargla portant sur la détermination de la valeur nutritive de ces parcours a été réalisée. [35]

En effet, *Aristida pungens* L. est la plante la plus fréquente des massifs dunaires et souvent la seule sur de grandes étendues dans les ergs. Compte tenu de sa grande fréquence et de sa disponibilité permanente, c'est l'une des plantes les plus intéressantes. Elle constitue un aliment extrêmement précieux du fait de sa longue résistance à la sécheresse et son apétabilité pendant la longue période de l'année.

Elle peut résister à 4-5 ans de sécheresse. Elle constitue ainsi, le pâturage de base pour le dromadaire qui consomme presque toute la plante, à part 20-30 cm de chaumes (la hauteur des touffes varie entre 1 m et 1.70 m). [36]

En Algérie, dans les zones sahariennes, les éleveurs distribuent le 'Drinn' comme aliment grossier à toutes les catégories d'animaux d'élevage (ovins, caprins et même bovins). D'ailleurs, le 'Drinn' est commercialisé clandestinement à des prix équivalents à ceux du foin.

Cette étude a donné des valeurs plus élevées et entièrement significatives que celles trouvées dans des travaux antérieurs : [37, 38]

- une productivité de la biomasse de 291.29 kg de matière fraîche (MF) par hectare et de 221.44 kg de matière sèche (MS) par hectare.

- une valeur énergétique de 0.40 UF lero, 0.54 UF lait et 0.46 UF viande par kilogramme de matière sèche (MS).

- une offre fourragère moyenne de 99.64 UF lero par hectare, 119.58 UF lait par hectare et 103.86 UF viande par hectare.

Ces résultats trouvés laissent estimer une charge d'un (1) dromadaire pour 12 hectares.

De plus, le genre *Aristida* a fait l'objet de travaux de morphologie et de systématique. [31, 39] Une étude morphologique et biométrique récente des fibres foliaires d'*Aristida pungens* L. a montré que cette espèce possède des fibres rappelant par leurs longueurs celles des fibres de feuillus importés (1.70 m).

D'autres résultats de cette étude ont montré qu' *Aristida pungens* L. est riche en polysaccharide de type arabino-xylane et glucane (le xylose représente 74% environ) et pauvre en lignine (13%). Elle est également riche en hemicellulose (60 à 68%) et cellulose (30%).

Ces données sont très intéressantes pour l'industrie papetière Algérienne si elles sont prises en considération, car elles permettront de freiner l'importation en pâte d'éléments similaires. [40] Une tentative d'obtention de papier d'*Aristida pungens* L. a été menée avec succès par Youcef et al. [41]

A notre connaissance, il n'y a pas d'autres travaux sur *Aristida pungens* L. en littérature, sur les autres métabolites et leur activité biologique.

I.2.5- Usage thérapeutique

La partie aérienne d'*Aristida pungens* L. est utilisée par macération et tisane contre la constipation, les maux d'estomac et les indigestions. Sa décoction est bu contre les douleurs rhumatismales. [32] Les nomades utilisent les tiges d'*Aristida pungens* L. pour la cicatrisation des plaies et dans le tissage des cordes, alors que les pêcheurs des régions du Sahara occidental en fabriquent les filets de pêche.

Les graines d'*Aristida pungens L.* sont mûres au mois de Mai, elles sont utilisées pour faire une farine (appelée **Lûl** au Sahara Algérien) à galettes. Au Maroc les tiges broyées d'*Aristida pungens* sont utilisées pour la cicatrisation des blessures, cataplasme, arthrite rhumatoïde et mélangées avec l'huile, les tiges broyées sont utilisées pour les douleurs musculaires et également pour l'arthrite rhumatoïde. ^[23]

II- PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE

II.1- SITUATION GEOGRAPHIQUE

La wilaya d'Ouargla est située au Sud-Est du pays couvrant une superficie de 163 233 km². Elle est située au méridien du golf de Bougie (5°-24° de longitude Est) avec latitude de 31°-55° Nord et altitude de 150 m, et une pluviométrie de 150 mm.

La géomorphologie de la région montre que celle ci présente différentes formes géomorphologiques tels que hamadas, regs, lits d'oued, les dépressions, et le grand erg oriental.

II.2- COUVERT VEGETAL ET CARACTERES EDAPHIQUES

Les conditions écologiques sont très dures pour les végétaux, cependant ces derniers présentent des formes d'adaptation au milieu saharien. En fonction des espèces, on peut classer les végétaux en deux groupes :

- Les espèces annuelles : Ce sont des espèces qui apparaissent après une période de pluie où les conditions sont favorables, et finissent leur cycle de vie avant le dessèchement du sol.
- Les espèces vivaces : Ce sont des espèces préparées génétiquement à supporter la sévérité du milieu.

D'autre part, les variations bioclimatiques influent sur la distribution de ces espèces végétales permettant de définir les caractéristiques de la phytocénose telles que l'abondance-dominance, et la fréquence des espèces.

L'influence du sol sur la végétation se marque principalement par le bilan hydrique, la texture et la profondeur du sol.

La nature du sol d' Ouargla diffère suivant les régions :

- sol sableux : structure particulière à l'Est et au centre où poussent des espèces tels que, *Aristida pungens* L., *Aristida plumosa* et *Fagonia glutinosa*.

- terrains calcaires et gresseux situés à l'Ouest de la région, où on observe des espèces comme *Asphodelus refractus* et *Urginia noctiflora*.

- sols chotteux peuplés par des espèces adaptées à la salinité tels que *Limoniasstrum gyonianum*, *Tamarix gallica*, et *Zygophyllum album*.

Les sols d' Ouargla sont alors pauvres en matières minérales (faible teneur en matière organique, structure particulière et pH alcalin).

La plupart de ces sols sont alcalins à cause de la remontée capillaire des eaux de la nappe phréatique où s'ajoutent le manque de drainage et leur mauvais fonctionnement. [1, 42]

II.3- REPARTITION DE LA VEGETATION

L'erg et les sols sableux sont des milieux biologiques caractérisés essentiellement par la dominance du 'Drinn' *Aristida pungens* L. Lorsque le groupement d'erg est bien développé 'steppe à Drinn', on note près du 'Drinn' une végétation arbustive formée essentiellement, d'*Oudneya africana* R.Br., *Retama retam*, *Genista saharae* et *Colligonum azel*. Les caractères du milieu étant homogènes et assez constants le long de l'année, ce groupement ne présente pas de variations saisonnières notables, il constitue en été le seul pâturage important.

Sur une profondeur de plusieurs kilomètres on trouve alors des dunes presque nues où subsiste seulement le 'Drinn' (pseudosteppe à *Aristida pungens* L.).

III- QUE TROUVE-T-ON GENERALEMENT DANS LES PLANTES ?

Tous les êtres vivants ont un métabolisme primaire qui fournit les molécules de base : acides nucléiques (ARN, ADN), lipides, protéines, acides amines et carbohydrates.

Ces métabolites primaires sont produits en quantité élevée par les plantes et sont à faible prix de revient.

Il existe aussi un métabolisme secondaire, chez les plantes : c'est une exclusivité du monde végétal. Ces substances ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante. Elles sont produites en très faible quantité et sont à des prix élevés. On les appelle, les métabolites secondaires. ^[43] Ce sont des produits, à structure chimique souvent complexe. Selon les espèces, ces métabolites sont très dispersés et très différents. Ce n'est seulement qu'à partir de la deuxième moitié du 20^e siècle, qu'il y a eu explosion des recherches en ce domaine grâce à l'évolution du matériel d'analyse chimique. Il existe plus de 200 000 métabolites secondaires classés selon leur appartenance chimique.

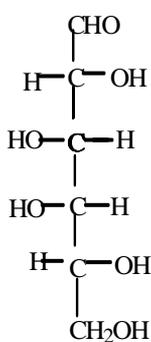
III.1- COMPOSES DU METABOLISME PRIMAIRE

III.1.1- Glucides

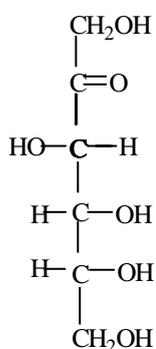
a) Définition

Les glucides sont appelés hydrates de carbones ou saccharides. Ce sont également des composés organiques carbonylés (aldéhydiques, cétoniques), constituant le groupe le plus important des éléments plastiques et énergétiques des végétaux. Ce sont aussi des composés qui apparaissent les premiers lors de la photosynthèse. On distingue deux classes :

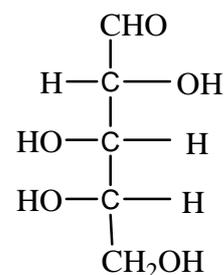
- les oses : sont des petites molécules de 3 à 9 atomes, de formule générale $C_n(H_2O)_n$. Ils sont caractérisés par la présence d'une fonction aldéhydique (aldose), ou cétonique (cétose) et de plusieurs carbones asymétriques ; exemple :



D-galactose

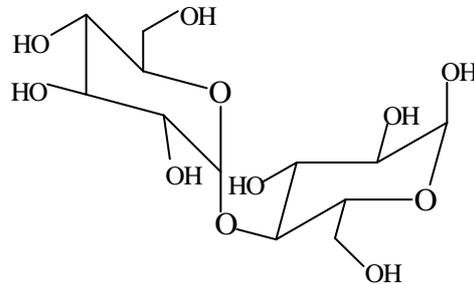


D-fructose



L-arabinose

- les osides : sont des composés résultant de l'association de plusieurs molécules uniquement sucrées (holosides), ou plusieurs oses avec une partie non glucidique (hétérosides) ;^[44] exemple :



α - maltose

b) Caractérisation

Des réactions plus spécifiques sont également utilisées par la réaction de Keller Kiliani pour les desoxy-2 ose : à la solution acétique sont additionnées quelques gouttes de chlorure ferrique et l'acide sulfurique, on obtient une coloration bleu-vert de la couche acétique.

Le caractère réducteur des aldoses ou des cétooses vis-à-vis de la liqueur de Fehling donne une coloration bleue.^[45]

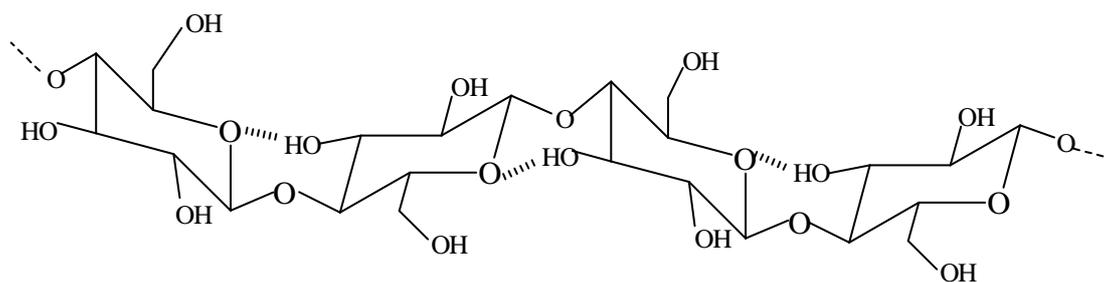
III.1.2- Amidon

a) Définition

L'amidon est la principale forme de réserve glucidique des végétaux. Il est présent dans toutes les parties de la plante et existe sous la forme d'une structure organisée correspondant à un homopolymère presque pur de D-glucose.^[45] Il sert comme adjuvant dans la préparation de tablettes et de comprimés, et conduit aussi à la synthèse de la vitamine C.

L'amidon résulte de l'association de deux polysides homogènes par exemple ; l'amylose est une molécule linéaire constituée de 250 à 300 unités de α -D-glucopyranose

Associées par des liaisons 1 \longrightarrow 4



Amylose

b) Caractérisation

Il est mis en évidence, *in situ*, au moyen du réactif à l'eau iodée par apparition de couleur bleue qui disparaît à chaud. [46]

III.1.3- Lipides

Définition

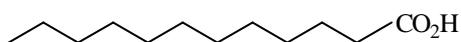
Les lipides sont des esters d'alcools et d'acides gras ; ce sont des corps insolubles dans l'eau (hydrophobes), solubles dans les solvants organiques apolaires et ils ne sont pas volatils (huiles fixes). Selon la nature de l'alcool, on distingue :

- le glycérol, constitutif des triglycérides.
- les cérides, où l'alcool est aliphatique et à poids moléculaire élevé.
- les stérides, où l'alcool est un stérol.

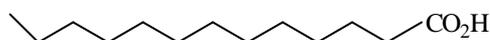
Les plus intéressants sont les triglycérides qui sont des esters de glycérol et d'acides carboxyliques. Ces derniers se répartissent en deux groupes : [47]

- acides gras saturés :

Acide laurique : C12 : O

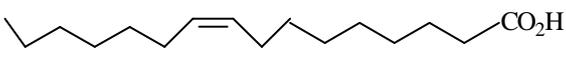


Acide myristique : C14 : O

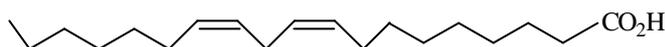


Aussi, acide caprique (C10 : O), acide palmique (C16 : O) et acide stéarique (C18 : O)

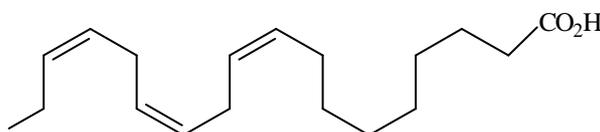
- acides gras insaturés :

Acide 9-héxadécénoïque C16 : 1 

Acide oléique : C18 : 2 (liaison éthylénique cis)



Acide linoléique : C18 : 3



Certains des lipides ont une activité anti-inflammatoire, et anti-oedémateuse et d'autres actions pharmacologiques diverses, dont on cite, la diététique, la cosmologie, l'industrie (détergents, peinture, ...) et l'alimentation (margarine). Les lipides constituent aussi la principale réserve d'énergie, leur métabolisme aboutissant à la combustion complète libère une grande quantité d'énergie. ^[47]

III.2- COMPOSES DU METABOLISME SECONDAIRE

III.2.1- Composés phénoliques

a) Définition

Les composés phénoliques sont des substances qui constituent une vaste famille, difficile à définir, et sont caractérisées par la présence d'au moins un noyau benzénique lié directement par un groupe hydroxyde libre ou engagé dans une fonction : éther, ester, hétéroside. ^[48] Ils peuvent se combiner avec des protéines en formant des complexes. ^[49]

b) Activité

Les poly-phénols jouent des rôles multiples sur les plans physiologique, technologique et nutritionnel, Ils interviennent dans la défense des plantes. ^[50, 51] Leur interaction avec

les protéines, [52, 53] les polysaccharides, [54] la flore fermentaire [55, 56] et leurs propriétés anti-oxydantes affectent plusieurs caractères organoleptiques tels que la couleur, l'amertume, l'astringence, les troubles et l'arôme des fruits, des légumes et de leurs produits dérivés. Ces multiples rôles sont en relation avec leurs structures chimiques, d'où l'intérêt particulier accordé aux recherches sur les poly-phénols. [57, 58]

III.2.1.1- Tanins

a) Définition

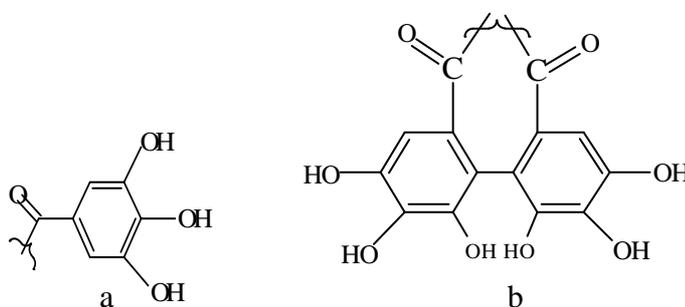
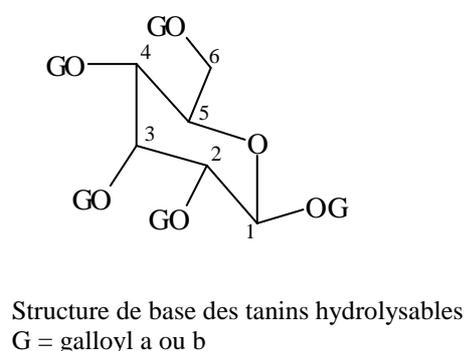
Les Tanins sont des composés phénoliques de structures variées, ayant une moléculaire de poids moléculaire compris entre 500 et 5000 g/mol. Les tanins sont divisés en deux groupes : [59, 60]

- *Tanins hydrolysables*

Les tanins hydrolysables anciennement appelés tanins pyrogalliques, sont des polyesters de glucides et d'acide-phenols. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes (Tannases) en ose et en un acide-phenol. Selon la nature de ces tanins, on distingue les tanins galliques dans le cas d'acide gallique et les tanins ellagiques dans le cas d'acide ellagique.

L'acide ellagique résulte de la condensation de deux acides galliques.

Structure

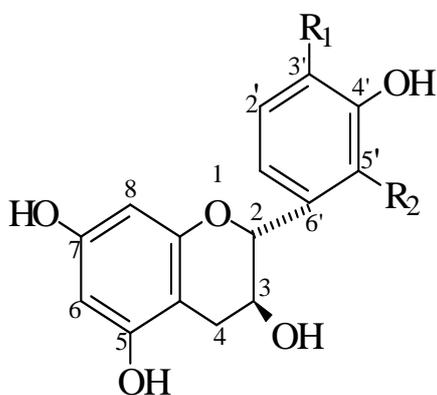


- *Tanins condensés*

Les tanins condensés ou proanthocyanidols diffèrent fondamentalement, des tanins galliques et ellagiques. Leur structure est voisine de celle des flavonoïdes, ils ne possèdent pas

de sucre dans la molécule. Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ols, leur union se fait par des liaisons carbone-carbone, le plus souvent en position 4-8 ou 4-6, ce qui rend ces molécules difficilement hydrolysables.

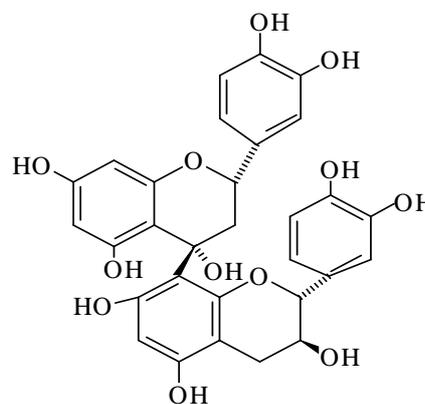
Structure



Serie 2R, 3S

$R_1=R_2=H$ Afzelichol

$R_1=OH, R_2=H$ Catéchol



Série 2R, 3S (+catéchol)

Série 2-R, 3-S (OH 3- α) épiafzeléchol,

épicatechol, épigallocatechol

b) Propriétés physico-chimiques

Les tanins sont des corps généralement amorphes, solubles dans l'eau et l'alcool, et insolubles dans les solvants organiques apolaires. On les extrait généralement, par des mélanges hydro-alcooliques. Les tanins sont précipités par de nombreux réactifs, ils précipitent avec les sels de métaux lourds tels que le fer, le plomb, le zinc et le cuivre.

c) Caractérisation

Avec les sels ferriques, on obtient des précipités colorés différemment selon la nature des tanins :

- bleu-noir avec les tanins hydrolysables.
- brun-verdâtre avec les tanins condensés.

Les tanins galliques donnent une coloration rose avec l'iodate de potassium (acide gallique libre est coloré en orange par ce réactif).

Les tanins éllagiques sont colorés en rose par HNO_2 en milieu acétique (rose, la couleur vive au pourpre puis au bleu).

Les tanins condensés sont colorés en rouge par la vanilline chlorhydrique. [44, 61]

d) Propriétés biologiques

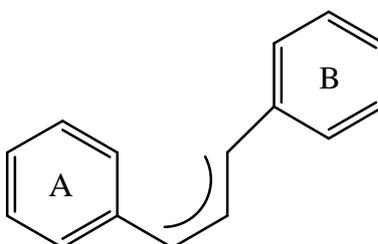
Les tanins possèdent surtout des propriétés astringentes en usage externe et interne. Ce sont des inhibiteurs enzymatiques. En outre, de nombreux tanins, particulièrement les tanins hydrolysables, inhibent la peroxydation des lipides induits par l'adénosine diphosphate (ADP) et l'acide ascorbique sur les mitochondries hépatiques du rat. Ils sont de bons contre-poisons des alcaloïdes et des métaux lourds. [62, 63]

Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles et de brûlures. [64] Ils sont utilisés comme anti-diarrhéiques et hémostatiques, mais surtout comme protecteur veineux dans le traitement des varices. En cosmologie, les tanins sont des astringents très utilisés, sous forme de lotions. Ils sont largement employés dans l'industrie, notamment dans l'industrie du cuir, des vernis et de la peinture.

III.2.1.2- Flavonoïdes

a) Définition

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques, presque toujours hydrosolubles et très répandus dans le règne végétal. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits, et parfois des feuilles. [65] Le plus souvent, ils sont sous forme d'hétérosides ou de flavonosides.

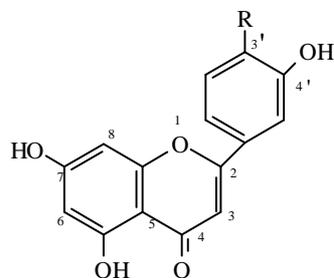


Squelette de base des flavonoïdes

Dans les flavonoïdes (environ 3000) au sens large, on inclut tous les composés en $\text{C}_6 - \text{C}_3 - \text{C}_6$ comprenant deux noyaux A et B et un hétérocycle oxygéné, de faible poids

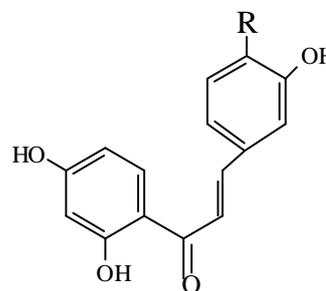
moléculaire, synthétisés par deux voies: la voie de l'acide shikimique ou la voie de l'acétate-malonate. [66, 67]

Structure



R = H Apigénol

R = OH Lutéolol

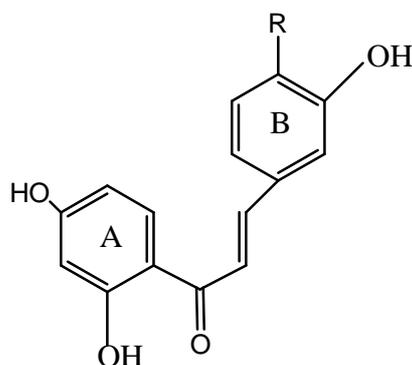


R = OH Butéine

R = H Isoquintigénine

b) Répartition des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs: racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, graines, bois, Certains flavonoïdes sont spécifiques de certains tissus, leur fonction principale est la pigmentation des plantes. Les anthocyanes localisées dans les parties externes des fruits, des fleurs et des feuilles, sont les seules molécules du règne végétal, capables de produire une vaste gamme de couleurs susceptibles de donner des teintes allant du jaune-orangé au bleu, en passant par le pourpre et le rouge. Quant aux chalcones, elles se trouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs. Ce sont des pigments naturels au même titre que les chlorophylles (couleur verte) et les caroténoïdes (nuances jaunes et orangées). Les flavones, les auronnes et les chalcones donnent plutôt des couleurs jaune, beige voire blanche et participent aux nuances produites par les anthocyanes et les caroténoïdes. [66]



Chalcones

c) Propriétés physico-chimiques

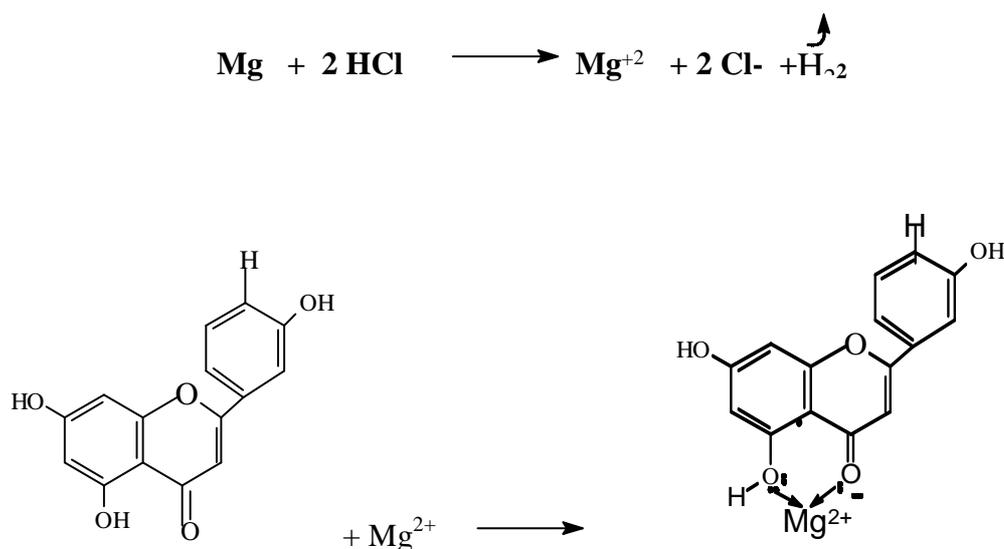
Les flavonoïdes sont des solides cristallisés dont la teinte, varie du blanc ivoire au jaune vif. Les hétérosides sont solubles dans l'eau (surtout à chaud), l'alcool et les solvants organiques. Ils sont insolubles dans les solvants organiques apolaires. Les génines sont peu solubles dans l'eau et l'éther.

Les flavonoïdes sont aussi solubles dans la solution alcaline (ammoniaque et potasse) en donnant une coloration jaune qui disparaît par addition d'acide. Ils possèdent un spectre d'absorption dans l'ultra violet avec généralement deux maximums caractéristiques variant avec chaque type flavonique. [67, 68]

d) Caractérisation

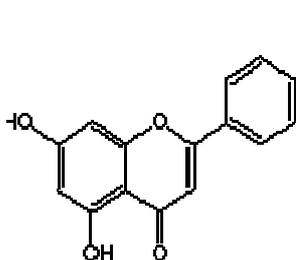
De nombreuses réactions colorées existent pour caractériser les flavonoïdes. En dehors de la coloration jaune donnée par les alcalis, il existe une coloration plus spécifique dite réaction de la cyanidine : les hétérosides flavoniques en solution alcoolique, mis en présence d'hydrogène, donnent des dérivés diversement colorés selon la structure chimique des flavonoïdes mis en jeu (orangée (flavones), rouge cerise (flavonols) et rouge violacé (flavonones)). Les flavonoïdes donnent généralement avec le Mg en présence de HCl une coloration rose ou rouge après trois minutes. [69]

Mécanisme

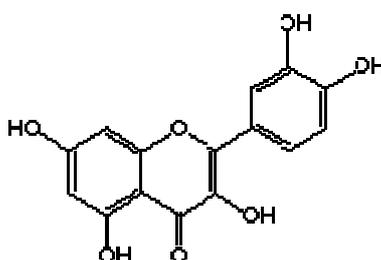


e) Propriétés biologiques

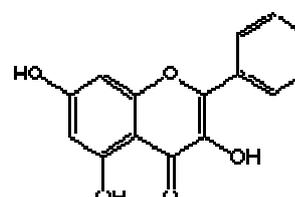
De nos jours, les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-cancéreuses, Par exemple, les proanthocyanidols présents dans le vin rouge, peu dans le vin blanc, ont une activité protectrice contre l'infarctus du myocarde et s'opposeraient aux processus de formation des plaques athéromateuses dans les artères. On peut citer à titre d'exemple, la chrysrine et la quercétine. ^[70]



chrysrine



quercétine



galantine

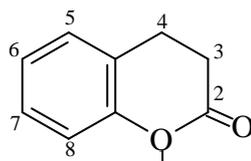
Les flavonoïdes possèdent des propriétés antifongiques et antibactériennes des polyphénols pour aseptiser leur ruche et colmater les fentes. Les propriétés cicatrisantes et anti-infectieuses de la propolis étaient entre autre utilisées par la civilisation égyptienne, romaine, grecque et inca.

III.2.1.3- Coumarines

a) définition

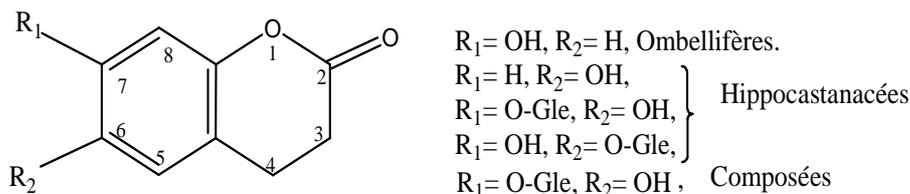
Ce sont des dérivés de la benzo α -pyrone. ^[71] La coumarine proprement dite, a été isolée en 1820, pour la première fois de la fève Tinka, *Coumarona adorata* (Legumineuse). C'est la lactone de l'acide o-hydroxy-cinnamique.

Structure



Coumarine

Elles sont les plus répandues dans le règne végétal, et possèdent des substitutions (OH ou OCH₃) en position 6 et 7. [72]

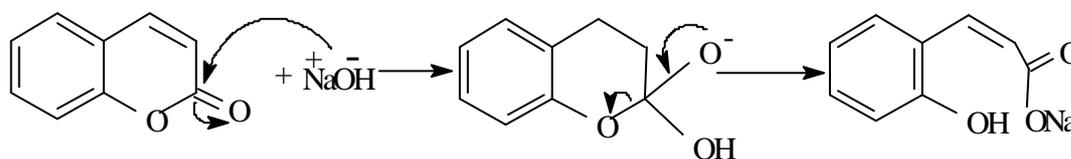


b) Propriétés physico-chimiques

Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres de saveur généralement amère, certaines sont sublimables et entraînaibles à la vapeur d'eau. Les hétérosides et les génines sont assez solubles dans l'eau et l'alcool. Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence bleue en lumière ultraviolette. Leur spectre U.V est également caractéristique et sert à leur identification. [73, 74]

Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone par son ouverture et sa solubilisation en milieu alcalin puis, par fermeture en milieu acide pour la régénérer. [44]

Mécanisme



c) Caractérisation

La plupart des propriétés physico-chimiques mises à profit pour la mise en évidence de l'identification des coumarines sont :

- la fluorescence des solutions extractives.

- l'examen en lumière U.V, la révélation se fait en milieu alcalin (KOH, NaOCH₃).
- la CCM de drogue à coumarine présente des taches dont la coloration exaltée en présence d'ammoniac, varie du bleu au jaune et au pourpre. [44]
- le dosage par spectrophotométrie ou spectrofluorimétrie. [44]

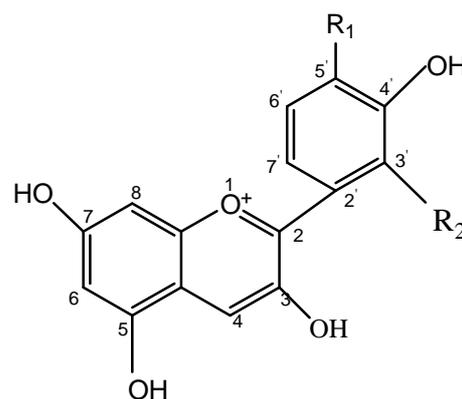
d) Propriétés biologiques

La coumarine est connue pour ses propriétés anti-oedémateuses, pour améliorer les symptômes en rapport avec l'insuffisance veino-lymphatique (confirmée en pharmacologie clinique). La khelline (coumarine) de la khella, une herbe annuelle méditerranéenne spontanée du Maroc est un puissant vasodilatateur coronarien. [44, 75]

III.2.1.4- Anthocyanosides

a) Définition

Les anthocyanosides appelées aussi anthocyanines, sont des anthocyanes présentées sous forme d'hétérosides. Les génines des dérivés du cation 2 - phényl benzopyrylium plus communément appelé, cation flavylum (où l'oxygène est sous forme d'oxonium). En milieu acide les anthocyanidols existent sous la forme cationique. Ils sont toujours hydroxylés en C3 et le plus souvent penta (3.5.7.3'.4') ou hexa substitué (3.5.7.3'.4'.5').

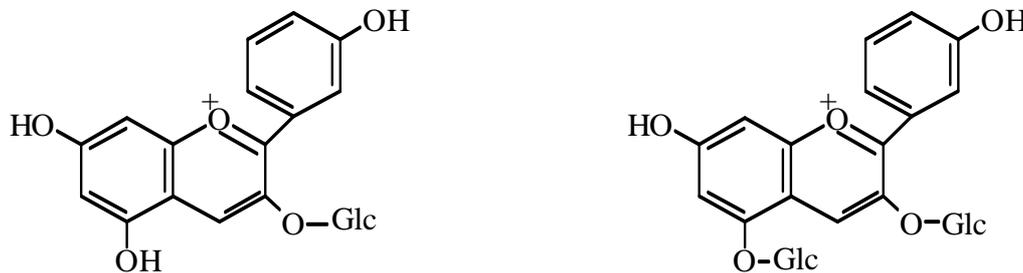


R₁ = OH, R₂ = H : Cyanidol de couleur orange-rouge

R₁ = R₂ = H : Pélargonidol de couleur orange

R₁ = R₂ = OH : Delphinidol de couleur violette.

L'hydroxyle en position 3 est toujours lié à un sucre, le plus souvent, glucose et les plus fréquents sont 3-monosides et 3,5-diosides. [76, 77]



b) Propriétés physico-chimiques

Les hétérosides sont solubles dans l'eau, insolubles dans les solvants organiques apolaires, contrairement aux génines. Les anthocyanosides ont une coloration qui varie en fonction du pH : Rouge stable en $\text{pH} < 3$, elle vire au bleu en milieu alcalin. Les anthocyanosides possèdent deux OH libres en ortho sur le phényle latéral et donnent des complexes avec les métaux comme le fer, l'aluminium et le magnésium.

c) Propriétés biologiques

Les anthocyanosides sont des substances atoxiques avec un large spectre d'activité, on peut citer :

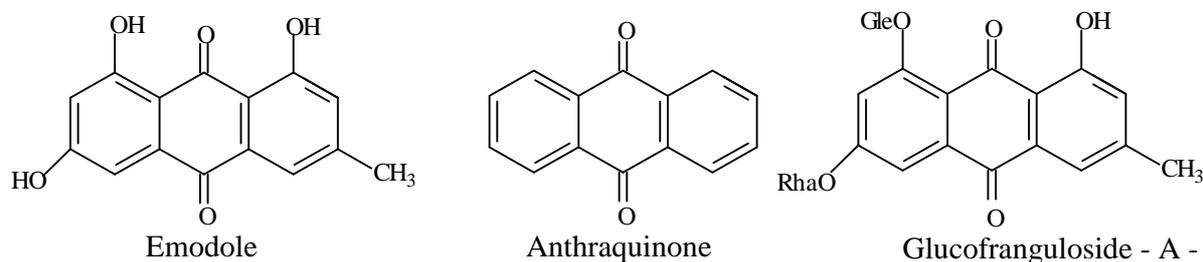
- traitements de certaines maladies vasculaires (diminuent la perméabilité des capillaires, augmentent leur résistance et insuffisance veineuse, ...)
- favorisent la régularisation en cas de troubles circulatoires au niveau du pourpre rétinien.
- certains anthocyanosides sont des colorants végétaux à usage pharmaceutique et alimentaire. [75]

III.2.1.5- Anthraquinones, anthracénosides et émodols

a) Définition

Les anthraquinones sont les principaux constituants des plantes tels que le séné (*Cassia senna*) et la rhubarbe de Mongolie. Elles appartiennent à la famille des

anthracénosides. Cette dernière regroupe tous les composés phénoliques, hétérosidiques et les émodols (dérivés hydroxyanthracéniques). [76]

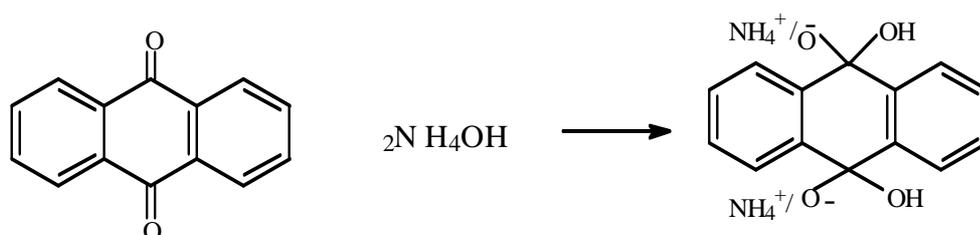


b) Propriétés physico - chimiques

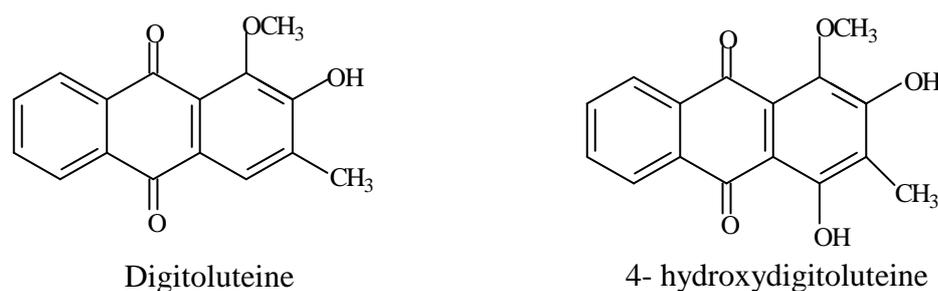
Les anthraquinones sont des composés colorés en orange, rouge, très peu solubles dans l'eau froide, solubles dans les solvants organiques et les alcools. Les génines carboxyliques sont extractibles par une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium. Les hétérosides sont solubles dans l'eau et les solutions hydro-alcooliques. [76]

c) Caractérisation

La caractérisation de ces dérivés hydroxyanthracéniques fait appel à la réaction de Bornträger. Cette réaction n'est positive qu'avec les formes anthraquinoniques libres. Pour mettre en évidence les hétérosides par cette réaction, il faudra donc les soumettre à une hydrolyse préalable pour obtenir l'aglycone et l'ose. [76]



Quelques dérivés anthraquinoniques



d) Propriétés biologiques

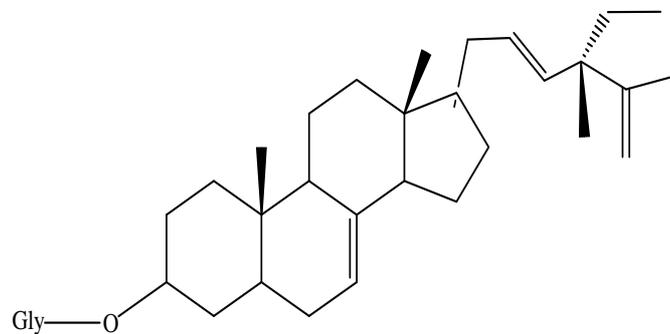
Le séné (*Cassia senna*) et la rhubarbe de la chine (*Rheum palmatum*) agissent sur la constipation. Ils ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin, provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations dix heures après la prise. Ils rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal. [78]

III.2.2- Composés terpéniques

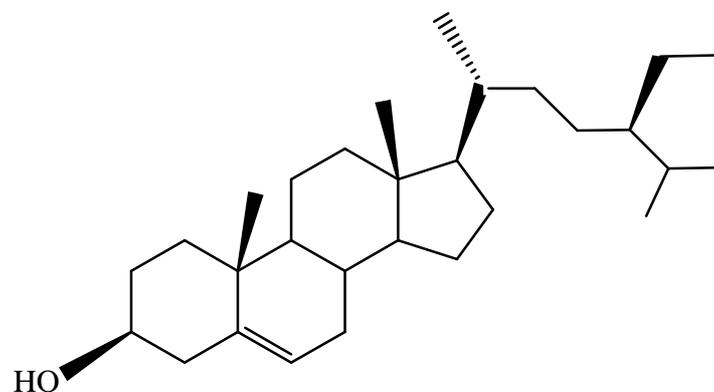
III.2.2.1- Stéroïdes, stérols et terpénoïdes

a) Définition

Les stéroïdes, les stérols et les terpénoïdes constituent sans doute le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux, ils regroupent plusieurs sous familles. Les stérols jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles. [79-82] Ils se présentent sous forme d'alcool libre (sitostérol), ou sous forme des esters associés par le glucose (glucoside stérols). [83-85]



Glucoside de Δ^7 -stérol



β -sitostérol

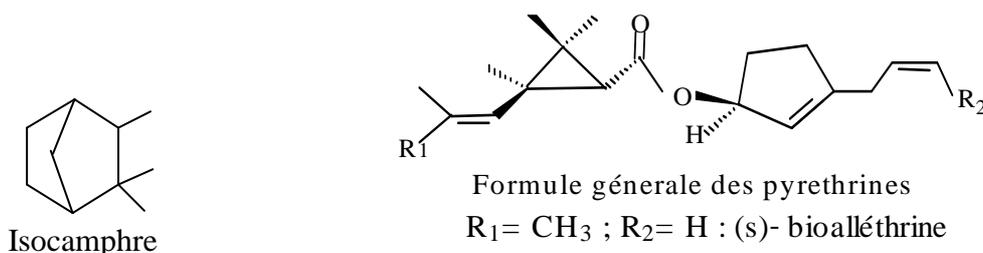
Parmi les stérols ou phytostérols les plus fréquemment rencontrés chez les végétaux on cite : le stigmasterol et le β -sitostérol. Ils représentent 80 % des stérols biosynthésés à la surface du globe terrestre. [85]

Les stéroïdes et les triterpènes peuvent être considérés comme formés par l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène. Chaque groupe de terpènes est issu de la condensation tête à queue d'un nombre variable d'unités isoprènes. [85]

La famille des terpénoïdes regroupe plusieurs sous familles :

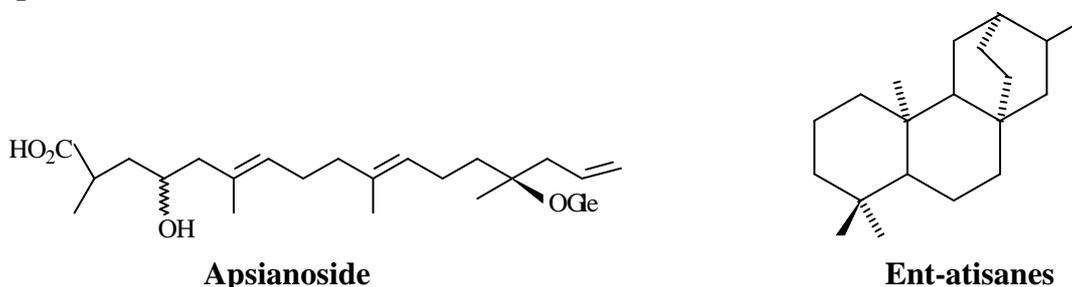
- monoterpènes : constituent la plus simple de la série des terpènes, ils sont issus du couplage de deux unités isopréniques. Ce sont des régulières des huiles essentielles, dont la plupart existent à l'état libre. [44, 86, 87]

Exemple



- diterpènes : sont rencontrés chez les organismes marins. Ce sont des composés en C_{20} issus du métabolisme du 2E, 6E, et 10E- géranylgeranylpyro-phosphate [GGPP], très répandu chez les végétaux.

Exemple



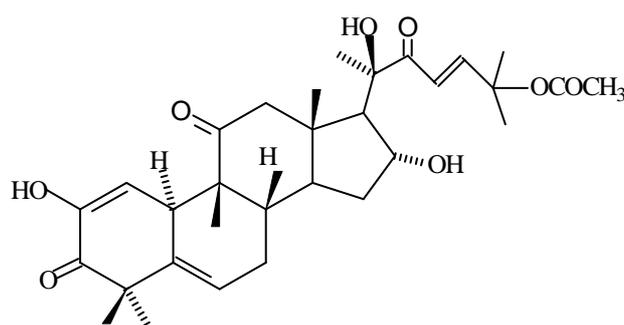
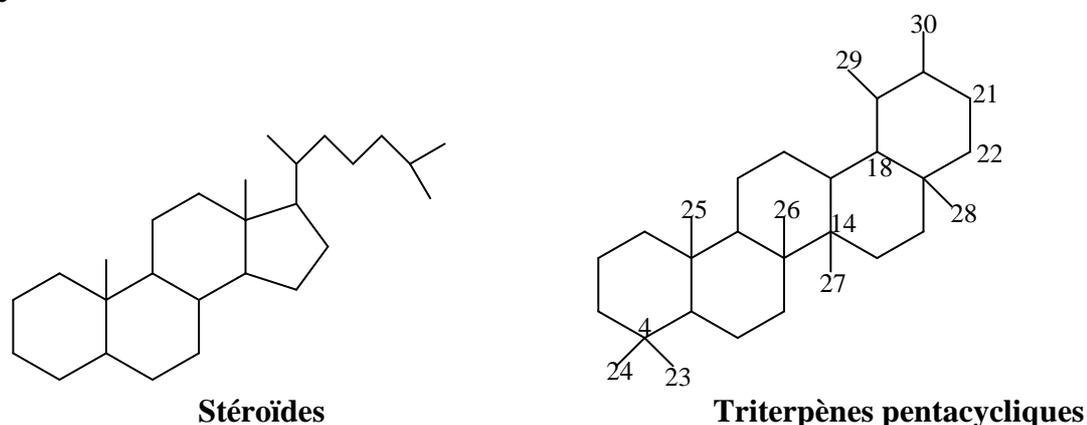
Leur intérêt thérapeutique est limité, ils possèdent :

- des propriétés anti-oxydantes dans le cas des diterpènes phénoliques.
- des propriétés anti-tumorales dans le cas des diterpènes tétracycliques.

- des propriétés antihypertensives de la forskoline du *coleus forskoohlii* Brig.
- des propriétés édulcorantes des stéviolosides d'herbe sucré du Paraguay. ^[88]
- des propriétés anti - inflammatoires et analgésiques. ^[89]

• triterpènes : présentent une très forte unité structurale qui est fortement marquée chez les stéroïdes. En première approximation, on peut estimer qu'il n'y a pas de différences fondamentales entre les triterpènes et les stéroïdes. Ces derniers peuvent être regardés comme des triterpènes tétracycliques qui ont perdu, au minimum, trois méthyles. C'est d'ailleurs la présence des méthyles en C-4 et C-14 qui a initialement servi à distinguer les stéroïdes des terpènes. ^[87, 90]

Exemple



Cucurbitacine

Intérêt des terpènes et des stéroïdes

Leur intérêt thérapeutique est très vaste :

- en économie, ils sont très importants dans la glisse, édulcorants peu calorigènes, très utilisés dans les industries agro-alimentaires.

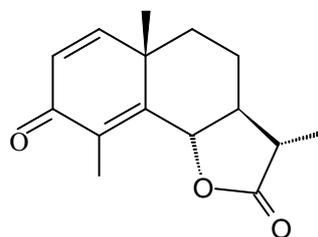
- ils permettent une augmentation du poids du corps, de la masse musculaire et une augmentation de la force.

- un potentiel thérapeutique dans les divers domaines : cytostatiques, antiviraux, insecticides et analgésiques. ^[91-93]

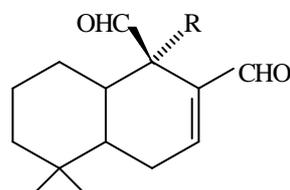
• sesquiterpènes : Un très grand nombre des sesquiterpènes sont des constituants habituels des huiles essentielles des végétaux supérieurs. Ils peuvent intervenir dans les propriétés attribuées aux fractions volatiles. C'est le cas, par exemple du bisabolol et ses dérivés présents dans les huiles essentielles de matricaire.

Les sesquiterpènes sont potentiellement actifs à cause de leurs fonctions lactones qui possèdent une activité antibactérienne (Gssypol). De plus, les astéracées à lactones sesquiterpéniques sont fréquemment responsables de dermatites de contact d'origine allergique. ^[94]

Exemple



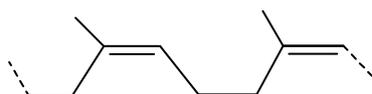
(+) - α - Santonin



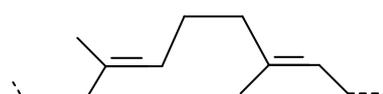
R= OH : Warburganal

• polyterpènes: toutes ces doubles liaisons sont de type Z (chaîne prioritaire). Chaque molécule comporte de 1000 à 5000 motifs isopréniques. L'isomère où toutes les liaisons sont de type E est la gutta-percha qui est une matière dure et cassante. ^[87]

Exemple



Caoutchouc

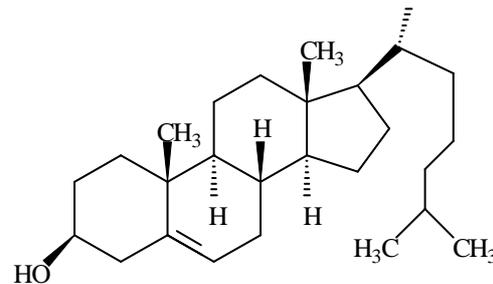


gutta-percha

Quelques exemples de stéroïdes

- Cholestérol :

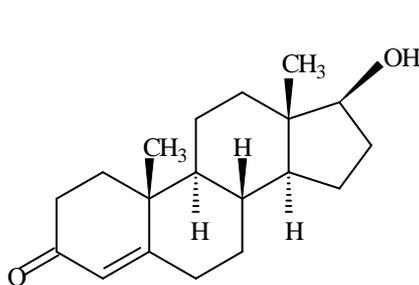
Le cholestérol est le premier stéroïde isolé à la fin de 13^{ème} siècle, à partir des calculs biliaires d'où son étymologie ; khole : bile et stéréos : solide. Il représente 99% des stérols du cerveau humain, et 1,2 à 1,6 % de son poids sec dans les tissus des insectes. [85,95]



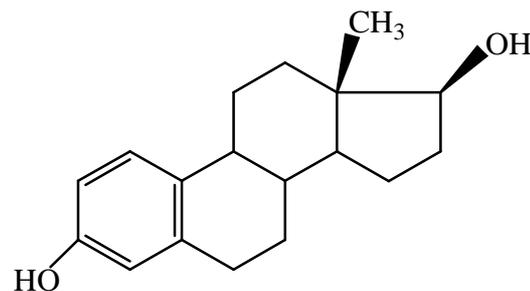
- Hormones stéroïdiques :

Les hormones mâles : la testostérone et l'androstérone, sont produites par les testicules. Le déhydroépiandrostérone (DHEA) et l'androsténone sont produits au niveau du stroma (tissu interstitiel).

Les hormones femelles, oestrone, oestradiol et progestérones règlent le cycle menstruel et l'évolution de la grossesse. [96]

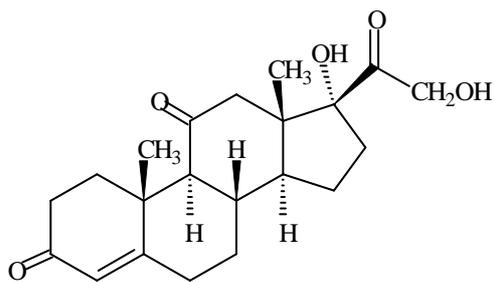


Testostérone



Oestradiol

D'autres hormones sont produites au niveau des glandes corticosurrénales. Les principales sont les corticostéroïdes (cortisol, cortisone, aldostérone) et les stéroïdes androgènes. [97]



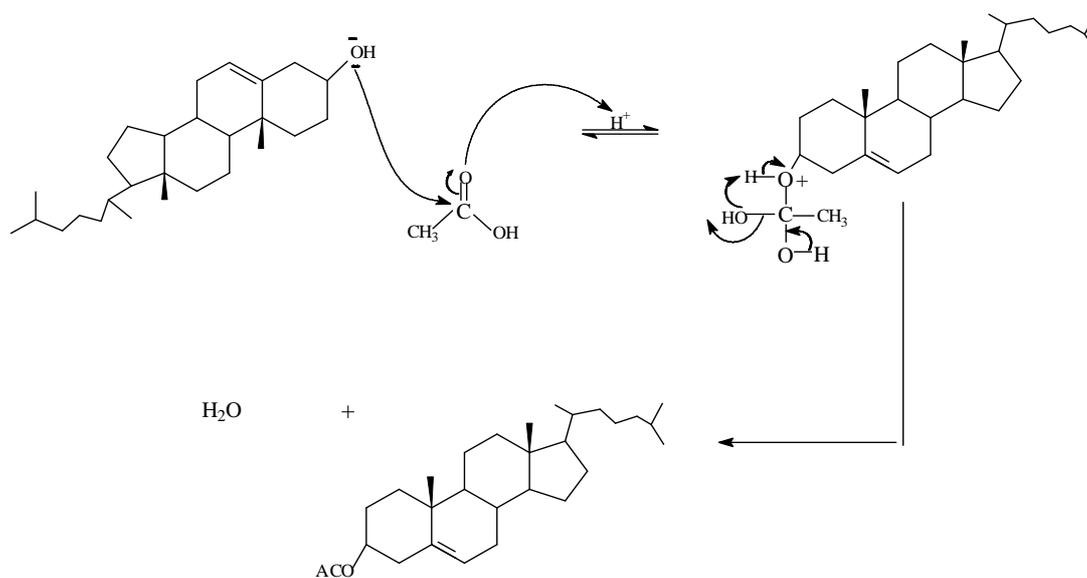
Cortisone

b) Caractérisation des stéroïdes et terpénoïdes

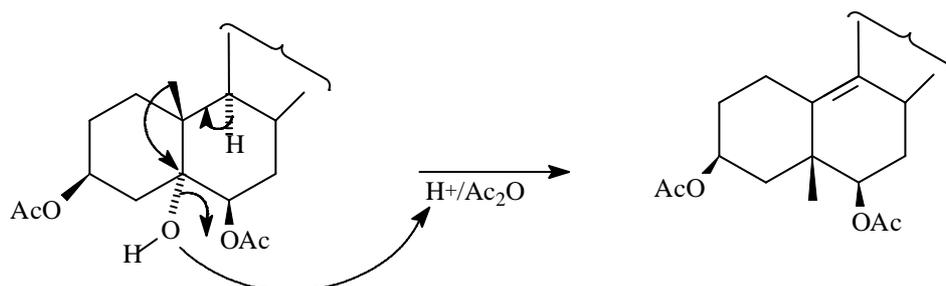
La détection des stéroïdes et des hétérosides triterpéniques, est basée sur la réaction de Liebermann - Burchardt.

Mécanisme

1.



2.



III.2.2.2- Saponosides

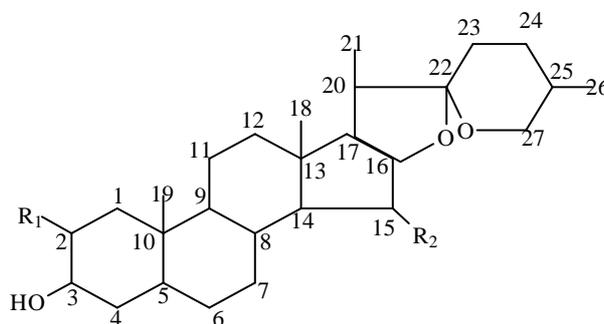
a) Définition

Les saponosides sont des hétérosides de poids moléculaire élevé, appartenant aux stéroïls ou triterpènes. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes, ils sont caractérisés par leur action tensioactive (abaissement de la tension superficielle).

La plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques, certains sont des matières premières pour l'hémi-synthèse de molécules médicamenteuses stéroïdiques. [44, 98]

Selon la nature des génines, et structurellement, les saponosides sont classés en deux groupes :

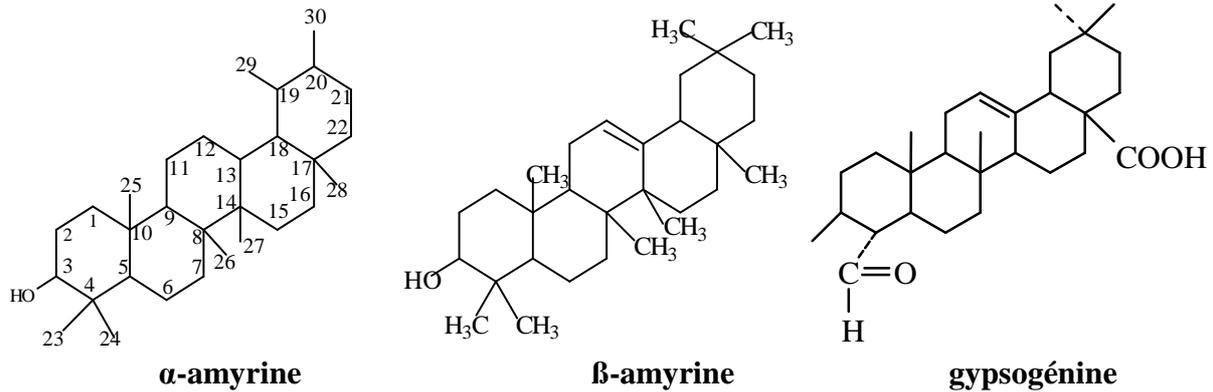
- saponosides à génines stéroïdiques : Ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones et possèdent un squelette de 27 atomes de carbone qui comporte habituellement six cycles. Ce sont des dérivés du noyau spirostane utilisés pour l'hémisynthèse des corticoïdes. Ces sapogénines possèdent toujours une fonction alcool secondaire en 3, susceptible de former une liaison hémiacétalique avec un ose ou un oside.



Spirostane

Structure générale des saponosides

- saponosides à génines triterpènes : ils constituent la majorité des sapogénines des dicotylédones et possèdent un squelette de 30 atomes de carbone qui comporte habituellement cinq cycles. Ce sont des dérivés du noyau α ou le β - amyryne (pentacycle), exemple : gypsogénine des saponaires, ou parfois du noyau dammarane (tétracyclique).



b) Caractérisation

Les saponosides donnent un certain nombre de réactions colorées, non spécifiques, mais fort utilisées pour leur mise en évidence, signalons la réaction de Libermann Burchardt. Les réactions générales de détection des saponosides sont comme suit:

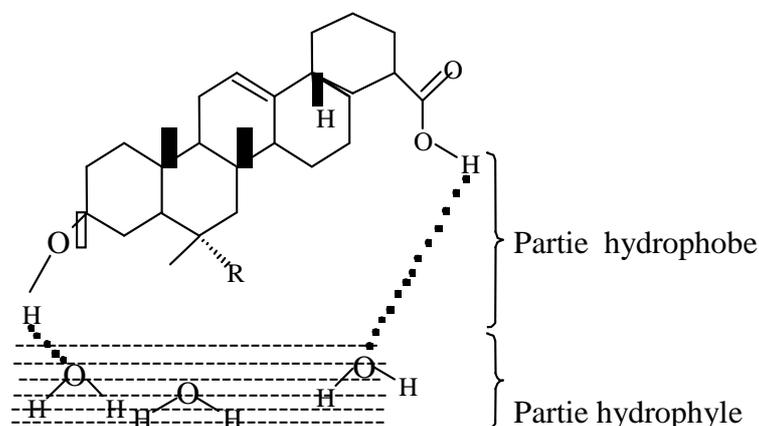
- l'acide sulfurique concentré dissout les saponosides et se colore successivement en jaune, rouge, bleu vert ou bleu violet.

- l'examen en lumière UV, révèle une fluorescence bleue pour les saponosides triterpéniques et jaune pour les stéroïdiques. ^[99]

Dans l'industrie, plusieurs méthodes de dosages sont utilisées, notamment, une gravimétrie réalisée par précipitation des sapogénines après hydrolyse et pesée du résidu.

Mécanisme

Lors de la caractérisation des saponines en milieu aqueux, la formation d'une couche hydrophobe est expliquée par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes entre un ou plusieurs groupes hydroxyles ou carboxyliques de saponine et les molécules d'eau. ^[100]



c) Propriétés physico-chimiques

Les saponosides possèdent un ensemble de propriétés physico-chimiques qui nous facilitent leur caractérisation, éventuellement, le pouvoir aphrogène, l'action hémolytique et la saveur âcre. Ils se trouvent sous forme amorphe et sont solubles dans les solvants organiques polaires et l'eau. Ils sont pratiquement insolubles dans les solvants organiques apolaires. Leur point de fusion est compris entre 200°C et 300°C.

d) Propriétés biologiques

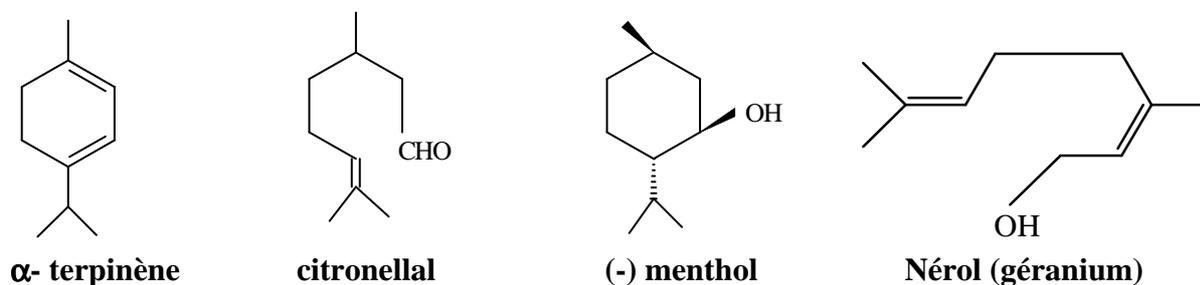
Les saponosides possèdent des propriétés anti-inflammatoires et anti-oedémateuses. Ils sont particulièrement toxiques pour les poissons et autres animaux aquatiques. Actuellement, les recherches montrent que les saponosides isolés à partir des plantes utilisées dans la médecine traditionnelle, possèdent des propriétés anti-bactérienne et antifongique. ^[44]

III.2.2.3- Huiles essentielles

a) Définition

Les huiles essentielles parfois appelées essences, sont des mélanges complexes de substances odorantes et volatiles. Elles sont obtenues par deux procédés, soit par distillation ou entraînement à la vapeur d'eau, ou plus rarement par expression des épicarpes de citron ou de l'orange. Pour améliorer la qualité aromatique des huiles essentielles, l'extraction se fait à basse température et pression. ^[44]

Exemple



La teneur des huiles essentielles est généralement faible, elle est de l'ordre de 1% à 5%. Il existe quelque exception, exemple : Badiane de Chine, où la teneur en essence est supérieure à 5%, clou de girofle qui renferme plus de 15% d'essence. ^[44]

b) Propriétés physiques

Malgré leurs différences de constitution, les huiles essentielles possèdent en commun des propriétés physiques :

- ce sont généralement des liquides à température ordinaire.
- leur volatilité les oppose aux 'huiles fixes'.
- elles sont généralement incolores au jaune pâle, sauf quelque exception (huile d'Azulène, de couleur bleue).
- leur densité, le plus souvent est inférieure à celle de l'eau.
- elles possèdent un indice de réfraction souvent élevé et sont douées de pouvoir rotatoire.
- peu solubles dans l'eau, solubles dans les alcools de titre élevé, dans les huiles fixes (liposolubles) et dans les solvants organiques usuels.

c) Propriétés biologiques

La diversité des constituants présents dans les huiles essentielles entraîne des activités :

- propriété de diurèse : faisant fonctionner les quatre grands émonctoires (peau avec ses trois glandes, reins, poumons et intestins) et facilitant le drainage des déchets et des résidus hormonaux solubles et insolubles vers leurs émonctoires.
- propriétés spasmolytiques et sédatives : de très nombreuses drogues à huiles essentielles (badiane, menthe, verveine,...) sont efficaces pour diminuer ou supprimer les spasmes gastro-intestinaux.
- propriétés irritantes : augmentent les mouvements de l'épithélium cilié au niveau de l'arbre bronchique et l'élimination rénale d'eau par effet local direct.

III.2.3- Composés azotés

III.2.3.1- Alcaloïdes

a) Définition

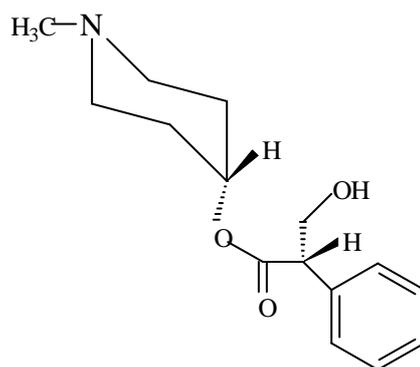
Les alcaloïdes constituent avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales. Leur extrême importance tient d'une part à leur activité et d'autre part à leur toxicité. Le terme d'alcaloïdes a été introduit en 1818 par W. Meissner ; il rappelle le caractère alcalin de ces substances, mettant à profit leur extraction et leur dosage. ^[101]

Les alcaloïdes sont des substances organiques, le plus souvent d'origine végétale. La présence d'azote confère à la molécule un caractère basique plus ou moins prononcé, de distribution restreinte et douée d'activité biologique, à faibles doses. Ils sont de poids moléculaires extrêmement variables et certains peuvent atteindre un poids de 1000 g/mol.

Les alcaloïdes existent sous forme de sels (malates, méconates, isobutyrate, ...) et sous forme d'une combinaison avec les tanins. ^[44, 77, 102] On distingue trois classes d'alcaloïdes :

- alcaloïdes vrais

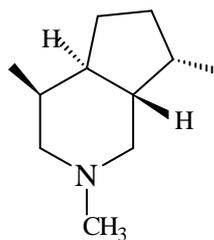
Ils sont issus seulement du règne végétal, ils existent à l'état de sels et sont biosynthétiquement formés à partir des acides aminés.



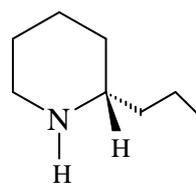
(-) Hyoscyamine

- pseudo-alcaloïdes

Il s'agit dans la majorité des alcaloïdes terpéniques. Ils présentent le plus souvent, toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés.



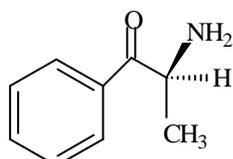
β - Skytantine



(+) - Conine

- proto-alcaloïdes

Ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés. [44, 103]



(+) – Cathionone

b) Propriétés physico-chimiques

Les alcaloïdes sont le plus souvent des solides cristallisables, rarement colorés, la plupart sont doués de pouvoir rotatoire (capables de dévier la lumière polarisée). Certains sont des liquides à température ordinaire (alcaloïdes généralement non oxygénés), ce sont des composés à caractère basique. Ils donnent des sels avec les acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates, ...), ou organiques (tartrates, sulfamates, ...). [103]

Leur solubilité dans les différents solvants varie en fonction du pH, c'est à dire selon leur état :

- à l'état basique : ils sont solubles dans les solvants organiques non polaire et polaire et sont insolubles dans l'eau.

- à l'état sel : ils sont solubles dans les solvants polaires et l'eau et sont insolubles dans les solvants organiques non polaires. [104]

c) Caractérisation

Les extraits secs sont repris dans l'acide chlorhydrique (1N) en additionnant quelques gouttes du réactif de Wagner, afin d'obtenir un précipité brun indiquant la présence des alcaloïdes. ^[105] La caractérisation spécifique est possible pour les différents groupes des alcaloïdes :

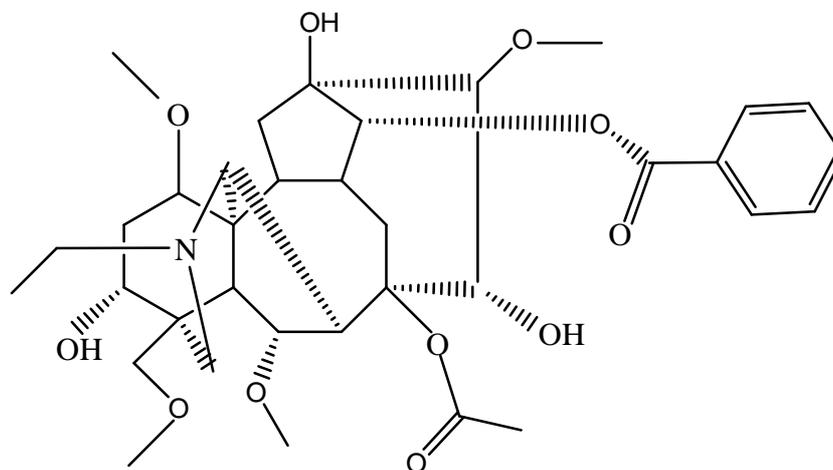
- le réactif de Vitali-Morin pour les alcaloïdes à noyau tropane estérifié.
- le réactif de Van Urk pour les alcaloïdes indoniques. ^[105]

d) Propriétés biologiques

Les drogues à alcaloïdes ont une importance considérable en thérapeutique. Certaines agissent au niveau central, d'autres sur le système nerveux autonome : sympatholytique (ergotamine) et d'autres ont des propriétés anesthésiques, anti-tumorales, Elles agissent à faibles doses, mais peuvent même être très toxiques à très faible dose.

Exemple

Aconitine : dose unitaire 0.2mg ; dose mortelle 1 mg. ^[105]



Aconitine (C₃₄H₃₇NO₁₁)

IV- POURQUOI LES PLANTES FABRIQUENT-ELLES CES METABOLITES SECONDAIRES ?

Les animaux sont mobiles pour chercher leur nourriture, pour échapper aux prédateurs et pour se reproduire. En revanche, les plantes sont immobiles ou presque, elles ont dû alors, développer des stratégies pour survivre et se reproduire. Les métabolites secondaires sont donc probablement impliqués étroitement dans ces stratégies :

a) dissuader les prédateurs :

- les odeurs repoussent les herbivores.
- les plantes toxiques 'éduquent les herbivores à les éviter' pour ne pas être broutées.

b) attirer les pollinisateurs :

Les couleurs et les odeurs attirent les insectes. Par exemple, certaines orchidées synthétisent des phéromones sexuelles qui sont des substances volatiles émises par les insectes femelles pour attirer les mâles.

c) décourager la compétition vis-à-vis d'autres espèces : c'est l'allélopathie.

Certaines plantes émettent des substances pour inhiber la croissance des autres plantes ; c'est le cas du noyer qui produit de la *juglone* qui inhibe la croissance des autres plantes dans un rayon de 8 m autour du tronc.

V- PRINCIPAUX GROUPES DE COMPOSES ANTIMICROBIENS DES VEGETAUX

L'activité antimicrobienne est souvent considérée comme caractéristique des huiles essentielles. ^[106] Plusieurs études ont été réalisées sur les plantes pour déterminer en général, les propriétés médicinales et en particulier les propriétés antimicrobiennes. Récemment, Chen et *al.* ont isolé une quinoline alcaloïdique qui manifeste une activité antimicrobienne considérable. ^[107-109] Des antimicrobiens phytochimiques peuvent être divisés en plusieurs catégories, décrites ci-dessous et récapitulées dans le tableau I.1.

V.1- LES COMPOSES PHENOLIQUES ET POLYPHENOLS

V.1.1- Phénols simples des composés phénoliques

Dans l'ensemble, les phénols sont bactéricides vis-à-vis des bactéries Gram (+) et Gram (-), parfois des mycobactéries, et non vis-à-vis des spores bactériennes.

L'activité augmente avec la longueur des chaînes substituantes en para (sur le C4) jusqu'à 6 atomes de carbone mais diminue par la suite en relation inverse avec la solubilité dans l'eau.

L'acide caféique composé des terpénoïdes et isolé d' 'estragon' et du 'thym', est efficace contre les virus, ^[110] les bactéries, ^[111, 112] et les mycètes. ^[42]

Le catéchol, un phénol simple est actif contre les virus, les bactéries et les mycètes. Le pyrogallol s'est avéré également toxique aux micro-organismes. ^[113]

Par ailleurs, quelques auteurs ont constaté que les phénols plus fortement oxydés sont les plus inhibiteurs. ^[114-116] D'autres composés phénoliques possédant une chaîne C3 latérale à un niveau plus bas d'oxydation et ne contenant aucun oxygène, sont classés en tant qu'huiles essentielles et sont souvent cités comme antimicrobiens. L'eugénol est un représentant bien caractérisé trouvé en huile de clou de girofle et est considéré bactériostatique contre les mycètes ^[42] et les bactéries. ^[112]

V.1.2- Quinones

Les quinones sont reconnues par leurs effets antimicrobiens. ^[117] Kazmi et al. ^[118] ont décrit une anthraquinone d' *Italica de casse* (arbre pakistanais) qui est,

- bactériostatique contre le *Pseudodiphthericum de bacille anthracite*, de *Corynebactérie*, et de *Pseudomonas aeruginosa* et,

- bactéricide contre des *Pseudomalliae de pseudomonas*.

Récemment, l' hypericin, une anthraquinone a suscité beaucoup d'attention dans la pression populaire en tant qu'antidépresseur. En 1985, des études ont montré ses propriétés antimicrobiennes. ^[119]

V.1.3- Flavones, flavonoïdes, et flavonols

Les flavonoïdes sont reconnus comme étant synthétisés par des plantes en réponse à l'infection microbienne. ^[120] Il ne devrait pas être étonnant si elles se sont avérées *in vitro* des substances antimicrobiennes efficaces contre une grande sélection de micro-organismes.

Des flavonoïdes plus lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes. ^[121] La catéchine, la forme la plus réduite de l'unité C3 dans des composés de flavonoïdes, se trouve dans le thé vert d'Oolong et exerce une activité antimicrobienne ^[122] contre *Vibrio choléra* O1, ^[123] *Streptococcus* mutant, ^[124, 125] *Shigella*, ^[126] d'autres bactéries et micro-organismes.

V.1.4- Tanins

Les tanins empêchent la croissance d'insectes ^[127] et perturbent des événements digestifs chez les animaux ruminants. ^[128] Scalbert ^[129] a passé en revue les propriétés antimicrobiennes des tanins en 1991. Il a énuméré 33 études qui avaient documenté les activités inhibitrices des tanins. Selon ces études, les tanins peuvent être toxiques aux mycètes, aux levures, et aux bactéries filamenteuses.

Les tanins condensés ont été déterminés pour lier des murs de cellules des bactéries ruminales, empêchant la croissance et l'activité de protéases. ^[130] Bien que ce soit encore spéculatif, des tanins sont considérés au moins partiellement responsables de l'activité antibiotique des extraits méthanoliques de l'écorce de *Terminalia alata* trouvée au Népal. ^[131] Cette activité a été augmentée par l'activation de lumière UV (320 à 400 nm à 5 W/m² pour 2 heures).

Par ailleurs, deux études ont montré que les tanins sont des inhibiteurs aux transcriptases renversés viraux. ^[132, 133]

V.1.5- Coumarines.

En date de 1996, au moins 1.300 coumarines ont été identifiées. ^[134] Leur renommée provient principalement de leurs activités antithrombiques, anti-inflammatoires et vasodilatatoires. ^[135, 136]

Warfarin une coumarine particulièrement bien connue, est employée comme anticoagulant oral et comme rodenticide. ^[137] Cette dernière peut également avoir des effets antiviraux. D'autres coumarines ayant les propriétés antimicrobiennes, ont été employées pour empêcher la récurrence des blessures froides provoquées par HSV-1 chez l'homme. ^[138] En revanche, elles ont été trouvées inefficaces contre la lèpre. ^[139]

Les acides hydroxycinnamiques liés aux coumarines, semblent être inhibiteurs aux bactéries Gram (+). ^[115] En outre, des phytoalexines, qui sont les dérivés hydroxylés des coumarines, sont produites dans les carottes en réponse à l'infection fongique et peuvent être présumées d'avoir des molécules à activité antifongique. ^[134] Les extraits d'aspergille (*Odoratum de gaillet*) manifestent une activité antimicrobienne. ^[112]

V.2- LES TERPENOÏDES ET LES HUILES ESSENTIELLES

Les terpénènes ou terpénoïdes sont actifs contre les bactéries, ^[140-142] les mycètes, ^[143, 144] les virus ^[145-147] et les protozoaires. ^[148, 149] En 1977, il a été signalé que 60% de dérivés d'huiles essentielles examinés étaient inhibiteurs aux mycètes tandis que 30% empêchaient la croissance des bactéries. ^[150] Récemment, Cichewicz et Thorpe ont constaté que la capsaïcine pourrait augmenter la croissance des *Albicans candida* et empêcher la croissance de diverses bactéries. ^[151] Les terpénoïdes du trèfle pourpre de prairie (la fraction soluble dans l'éthanol) ont montré une forte activité contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et une faible activité contre les bactéries Gram (-) et les *albicans candida*. ^[152] Deux autres diterpènes isolés par Batista et *al.*, se sont avérés actifs contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et les espèces de *candida*. ^[124]

V.3- LES ALCALOÏDES

Le premier exemple médicalement utilisé, d'un alcaloïde était la morphine isolée en 1805 de l'oeillette *Papaver somniferum*. ^[153] Le nom de morphine vient du Morpheus grec, un dieu des rêves. La codéine et l'héroïne sont les deux dérivés de la morphine. Des alcaloïdes de diterpénoïde, généralement isolés de *Ranunculus bulbosus* s'avèrent avoir généralement des propriétés antimicrobiennes. ^[154-156] Solamargine, un glycoalcaloïde des baies du *Khasianum*

de Solanum, et d'autres alcaloïdes peuvent être utiles contre l'infection par le HIV [157, 158] aussi bien que contre les infections intestinales liées au SIDA. [159]

TABLEAU I.1 : Les principales classes des composés antimicrobiens des végétaux

Classe	Sous classe	Exemple	Mécanisme
Phénoliques	Phénols simples	Catéchol Épicatéchine	privation de substrat Rupture de membrane
	Acides Phénoliques	acide cinnamique	/ /
	Quinones	Hypericin	Lié aux adhésions, complexes avec le mur de cellules, inactive les enzymes
	Flavonoïdes Flavones	Chrysin Abyssinone	Grippage aux adhésions complexes avec le mur de cellules Inactiver les enzymes empêcher le transcriptase renversé d'HIV
	Flavonoles	Totarol	//
	Tanins	Ellagitannin	Le grippage aux protéines liées au complexe de privation de substrat d'inhibition d'enzymes d'adhésions avec la complexation d'ion en métal de rupture de membrane de mur de cellules
	Coumarines	Warfarin	Interaction avec l'ADN eucaryotique (activité antivirale)
Térpenoïde, Huiles essentielles	//	Capsaïcine	Rupture de membrane
Alcaloïdes		Berbérine Pipérine	Intercaler dans le mur de cellules et/ou l'ADN

VI- RESISTANCES BACTERIENNES – INFECTIONS NOCOSOMIALES

Les complications d'origine hospitalière dues aux infections sont en augmentation. En effet, une grande variété d'agents bactériens et fongiques impliqués dans les infections nosocomiales (IV) sont fréquemment multirésistants aux antibiotiques (ATB). Les complications d'origine hospitalières dues aux infections bactériennes et fongiques sont de plus en plus en augmentation.

L'infection nosocomiale est devenue pour ainsi un problème important qui prendra de l'ampleur dans le futur compte tenu, de l'évolution démographique de nos sociétés et de l'utilisation des ATB d'une façon irrationnelle. Du fait de l'accumulation des résistances naturelles et acquises, les bactéries sont devenues multirésistantes aux antibiotiques (BMR) et elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutique. Les taux d'infections reportés dans la littérature varient de 1.8 à 9.4 par 1000 patients infectés par jour. ^[160]

VI.1- CARACTERISTIQUES EPIDEMIOLOGIQUES

Parmi les principales espèces bactériennes multirésistantes (BMR) responsables d'infection nosocomiale (IN), nous citons :

a) *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM)

Staphylococcus aureus est une des deux principales espèces responsables d'IN. Les SARM représentent 5 à 10% des bactéries isolées des IN. Ils sont principalement impliqués dans les IN cutanées, du site opératoire (30%), des voies urinaires et respiratoires (20%) et les bactériémies (10%). Les SARM, résistants à toutes les β -lactamines, sont aussi souvent très résistants aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones.

Depuis quelques années, les souches de SARM se sont diversifiées (souches de SARM sensibles à la gentamicine), ce qui ne résout pas pour autant, les problèmes thérapeutiques et ne doit en rien modifier la stratégie de lutte contre leur diffusion. En effet, les souches de SARM sensibles à la gentamicine, mais résistantes au moins aux fluoroquinolones ont rapidement diffusé dans les hôpitaux notamment en France, Japon, USA, ce qui montre bien la nécessité absolue de lutter globalement contre le phénomène de diffusion épidémique des SARM. ^[161-165]

b) Entérobactéries productrices de β -lactamase à spectre étendu (EBLSE)

Les entérobactéries dans leur ensemble représentent 35 à 40% des bactéries responsables d'IN. Les EBLSE représentent environ 1% des bactéries isolées des IN. Les infections à EBLSE s'observent sous la forme de cas apparemment isolés, de cas groupés, ou de véritables épidémies. La tendance à la diffusion clonale des EBLSE est bien démontrée. Les EBLSE sont principalement impliquées dans les infections urinaires (plus de 50%), symptomatiques ou non, les bactériémies (5 à 20%) et les infections de plaies ou de site opératoire (10 à 20%).

Les souches d'EBLSE (principalement *K. Pneumoniae*, mais aussi *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter sp.*) sont résistantes à l'ensemble des β -lactamines (sauf les céphamycines et l'imipénème), aux aminosides et très souvent aux fluoroquinolones. ^[163, 164]

c) Entérocoque résistant à la vancomycine (ERV)

Les entérocoques représentent 5 à 8% des bactéries responsables d'IN. Ils représentent environ 1% des souches d'entérocoques isolées à l'hôpital et il y a environ 1% de porteurs d'ERV dans la population générale. ^[166] En revanche, l'incidence de leur port dans la communauté peut atteindre 12 à 28% dans certains pays européens, l'alimentation étant une source possible de contamination. Aux États-Unis, les ERV représentent plus de 15% des souches d'entérocoques isolées en unités de soins intensifs. La sélection d'ERV en milieu hospitalier a comme facteur de risque les traitements antibiotiques, en particulier par glycopeptides, mais l'acquisition est aussi possible par transmission croisée (diffusion clonale). ^[165]

d) *Acinetobacter baumannii* multirésistant (résistant à la ticarcilline) (ABR)

Les *Acinetobacter baumannii* représentent 2 à 4% des bactéries responsables d'IN. Les (ABR) jouent un rôle croissant dans les IN, dans certains secteurs hospitaliers (unité de soins intensifs) et sont souvent à l'origine de bouffées épidémiques dans lesquelles est impliquée la forte contamination de l'environnement des patients porteurs. Certaines souches épidémiques résistantes à l'imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques. ^[167]

e) *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant (PAR)

Les *Pseudomonas aeruginosa* représentent 10 à 11% des bactéries responsables d'IN. Les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux β -lactamines (ticarcilline, ceftazidime ou imipénème), qui ont tendance à être résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones, devront faire l'objet d'une stratégie spécifique, notamment une politique de prescription raisonnée des antibiotiques pour éviter leur émergence et des mesures de contrôle de l'environnement pour éviter leur diffusion qui se produit par petites épidémies. [168-172]

f) Entérobactéries résistantes aux β -lactamines par hyperproduction de céphalosporinase (EBCASE)

Chez certaines espèces d'entérobactéries, en particulier *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Serratia marcescens* et *Citrobacter freundii*, une proportion importante des souches (10 à 30%) sont résistantes aux β -lactamines par hyperproduction de céphalosporinase. Les traitements antibiotiques favorisent l'émergence de ces souches dont le potentiel de diffusion clonale est beaucoup plus limité que celui des souches productrices de BLSE. [173]

VII- METAUX LOURDS DANS LES PLANTES – HYPERACCUMULATION DES PLANTES

L'analyse chimique des plantes a montré qu'exception faite des molécules d'eau et des ions minéraux, toutes les substances qui les constituent sont des composés de carbone. Ce sont des substances organiques qui sont souvent identifiées par les criblages phytochimiques. Il est à noter que la composition minérale et particulièrement celle des métaux lourds n'ont pas été très étudiées.

VII.1- NOTIONS D'OLIGOELEMENTS

Dans le monde vivant, la notion de macroéléments ou microéléments est utilisée. Cette notion repose sur la concentration moyenne de l'élément dans les organismes vivants. La limite des concentrations moyennes séparant macro de microéléments a été fixée à 100 mg/kg de matière sèche.

Les microéléments peuvent être classés en deux catégories : les microéléments indispensables et les microéléments neutres. Les microéléments indispensables en processus vitaux sont appelés oligoéléments. ^[174] Ces oligoéléments peuvent devenir toxiques si leur concentration dépasse une certaine teneur dans l'organisme. Certains microéléments, dont le caractère indispensable n'a pas été mis en évidence, peuvent s'avérer toxiques au-delà d'un certain seuil : c'est le cas du plomb, du cadmium et du mercure. ^[175]

VII.2- NOTIONS D'OLIGOELEMENTS DANS LES PLANTES

Les végétaux absorbent les éléments minéraux en quantité variable, ce qui permet de distinguer des macroéléments, fournis à des doses de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-3} g/ml et des oligoéléments, nécessaires à des doses beaucoup plus faibles, de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-6} g/ml (parfois 10^{-5} , tel que le fer), avec comme cas extrême le molybdène à 10^{-10} g/ml. ^[176]

VII.3- NOTION DES METAUX LOURDS OU ELEMENTS TRACES METALLIQUES (ETM)

On appelle en général métaux lourds les éléments métalliques naturels ou dans certains cas, métalloïdes caractérisés par une masse volumétrique élevée supérieure à $5\text{g}/\text{cm}^3$. On trouve dans certaines publications anciennes, l'appellation de 'métal pesant'. L'appellation métaux lourds est cependant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni appellation juridique.

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement. Ils sont en général, en quantités très faibles. On dit que les métaux sont présents 'en traces'. Ils sont aussi 'la trace' du passé géologique et de l'activité de l'homme.

La classification en métaux lourds est d'ailleurs souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement 'lourds' (le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas tous des métaux (l'arsenic par exemple). ^[177, 178]

Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation 'éléments en traces métalliques' -ETM- ou par extension 'éléments traces' -ET-.

VII.4- METAUX LOURDS DANS LES PLANTES

Plusieurs métaux lourds tels que Cu, Zn, Ni, Co et Mn sont des ETM essentiels pour les plantes, mais peuvent être toxiques à forte concentration. Pour la plupart des espèces de plantes, le domaine des concentrations bénéfiques de ces métaux est souvent très étroit. [179] D'autres métaux tel que le Cd ne sont pas essentiels et leur présence est toxique pour la plante. Les Tableaux I.2 et I.3 montrent en général le rôle, les seuils de carence et de toxicité de certains métaux dans les plantes. [180, 181]

Tableau I.2 : Rôle des métaux dans les fonctions des organismes végétaux

Eléments traces (ET)	Essentiel ou bénéfique		Potentiellement toxique	
	Végétaux	Animaux	Végétaux	Animaux
Zn	Oui	Oui	Du	Dnd
Cu	Oui	Oui	Oui	Oui ^a
Co	Oui	Oui	Oui	Oui
Cd	Non	Non	Oui	Oui
Ni	Non	Oui	Oui	Oui
Pb	Non	Non	Oui	Oui

a : toxique pour les ruminants (ovins, bétail)

Tableau I.3: Rôle au mg/kg de la matière sèche dans les plantes (ppm*¹)

Eléments traces (TE)	Seuil de carence	Seuil de toxicité
Fe	50	100-1000
Zn	15	100-400
Cu	3-5	20-200
Co	0-2	15-50
Cd	-	1
Pb	-	8
Ni	1-5	10-100

¹ * ppm : partie par million (mg par kg de matière sèche)

Le tableau I.4 donne les teneurs normales et la phytotoxicité en métaux lourds ^[181] dans les plantes fourragères.

Tableau I.4 : La phytotoxicité des plantes fourragères en métaux lourds (ppm)

Eléments traces (ET)	Normale	Phytotoxicité
Cd	0,1-1	5-700
Co	0,01-0,3	25-100
Fe	30-300	-
Ni	0,1-5	50-100
Pb	2-5	8
Zn	15	500-1500
Cu	3-20	25-40

VI.5- HYPERACCUMULATION

L'hyperaccumulation des métaux lourds (Ni, Zn, Cd, ...) chez les plantes, est la capacité d'accumuler certains métaux jusqu'à des concentrations anormalement élevées dans les feuilles. ^[182, 183] Ce caractère reste encore incompris d'un point de vue écologique et évolutif. Toutefois, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer l'avantage adaptatif de l'hyperaccumulation. L'hyperaccumulation influencerait notamment sur la résistance à la sécheresse, les interactions avec les plantes adjacentes et la défense contre les herbivores et les bactéries pathogènes. ^[184-189] D'autre part, ces plantes hyperaccumulatrices peuvent permettre à des bactéries métallorésistantes de se développer dans le sol alentour.

L'accumulation a lieu après le passage de la barrière endodermique des racines. Dans la grande majorité des cas, les métaux extraits du sol restent concentrés dans les racines de la plante. Ce n'est pas le cas, cependant, des plantes métalphytes où l'essentiel de l'accumulation des végétaux a lieu dans les tiges. L'un des mécanismes permettant aux plantes d'accumuler des métaux toxiques sans développer de pathologie, repose sur une stratégie de séquestration du métal, qui est en fait biologiquement indisponible. Le métal est ainsi présent dans la plante, mais sous une forme qui ne peut pas intervenir dans le métabolisme vital du végétal.

Le prélèvement du métal par la plante varie selon le métal, la plante et le type des sols. ^[190] On peut toutefois énoncer quelques règles générales. Les racines de la plante exercent une forte influence sur leur environnement direct, la rhizosphère, en y libérant des composés organiques et minéraux. Ces composés sont appelés exsudats. Ces exsudats peuvent contenir des composés chélatant les métaux et facilitant leur passage dans la plante. La manière dont les métaux ou les chélats sont transférés à travers la plante, demeure inconnue.

Le terme hyperaccumulation est introduit en 1977 pour les plantes qui accumulent plus que 1 mg de Ni par gramme de matière sèche dans les pousses, dans leur milieu naturel. ^[183] Actuellement, plus de 400 espèces hyperaccumulatrices appartenant à 45 familles ont été identifiées. ^[191] La plupart d'entre elles, environ 300 espèces accumulent le Ni ^[192, 193] et 18 espèces accumulent le Zn.

Une plante hyperaccumulatrice de Zn est définie comme plante qui accumule au moins 10 mg de Zn par gramme de matière sèche dans ses pousses, dans ses habitats naturels. ^[192]

Les seuils de la concentration des métaux définissant l'hyperaccumulation varient selon le métal considéré : 100 mg/g pour le Cd (0.001% en MS), 1000 mg/kg pour (Pb, Ni, Co, et Cu) (0.1% en MS) et 10000 mg/kg pour le Zn et Mn (> 0.1% en Ms). ^[194]

Le tableau I.5 donne le nombre de plantes hyperaccumulatrices et la concentration des métaux dans les feuilles en pourcentage de matière sèche. Parmi ces plantes hyperaccumulatrices de métaux, on note les brassicaceae et les graminées.

Tableau I.5: Le nombre de plantes hyperaccumulatrices et concentrations de métaux dans les feuilles (% de matière sèche)

Métal	Concentration dans les feuilles (% de matière sèche)	Nombre de taxons	Nombre de familles
Zn	> 1	18	5
Cu	> 0,1	24	11
Co	> 0,1	26	12
Cd	> 0,001	1	1
Ni	> 0,1	Plus de 300	35
Pb	> 0,1	5	3

VI.5.1- Brassicaceae et graminées

Les brassicaceae se sont montrées des plantes très tolérantes aux métaux lourds. Elles peuvent accumuler le Zn dans les pousses à des concentrations supérieures à 1% de la matière sèche. ^[194-196] La plus connue parmi ces espèces est *Thalaspia caerulescens*, une fois développée sur un site contaminé de métaux, elle hyperaccumule le Zn et aussi le Cd à une teneur supérieure à 0.1 mg / kg de MS. ^[197-200] Quant aux graminées, grâce à leurs déterminations génétiques et physiologiques, elles peuvent tolérer des métaux et peuvent naturellement contenir jusqu'à 1% de leur matière sèche. D'autre part, deux graminées *Agrotis tenuis* et *Aristida stolonifera* se sont avérées très hypertolérantes aux métaux notamment au cuivre (> 300ppm). ^[201-203] Par ailleurs, il a été découvert que le maïs et les céréales sont aussi très tolérants aux métaux lourds. ^[204, 205] Le tableau I.6 donne le domaine de concentration des deux métaux pour lesquels la concentration dépasse une limite fixée pour des raisons écotoxicologiques.

Tableau I.6: Teneurs de maïs en Zn et Cd en mg/kg de matière sèche

Maïs \ Métal	Maïs normal (ppm)	Maïs toxique (ppm)
Zn	25	500
Cd	0,5	5

VII- INTERET DE L'HYPERACCUMULATION – PHYTOREMEDIATION

Des observations ont montré que la disparition des polluants organiques et inorganiques était plus rapide sur les sols couverts de végétaux que sur les sols nus. Ainsi, un autre aspect de la recherche sur les plantes concerne leur utilisation à dépolluer les sols contaminés par les produits organiques et inorganiques.

Connues sous le nom de phytoremédiation, les plantes hyperaccumulatrices sont utilisées pour absorber des concentrations élevées de métaux par leurs racines et les concentrer dans leurs feuilles. ^[206-207] Cette biomasse est récoltée pour l'incinérer et récupérer les métaux dans les cendres afin de les réutiliser en métallurgie. Enfin, la restauration des sites contaminés par les métaux, implique la reconstitution d'une couverture végétale (revégétalisation avec des espèces tolérantes aux métaux) tant pour des raisons esthétiques que dans un souci de protection (ruissellement, poussières).



Partie Expérimentale

I.- MATERIEL VEGETAL

I.1- ORIGINE GEOGRAPHIQUE ET PERIODE DE RECOLTE

Oudneya africana R.Br. constituée de racines, rameaux primaires, rameaux secondaires, rameaux tertiaires, feuilles et fruits et *Aristida pungens* L. constituée de tiges et de feuilles ont été récoltées au mois d'Avril 2001 à Oued N'SSA (transect, Ouargla-Touggourt). La récolte des plantes a été effectuée très soigneusement de manière à ne pas détériorer les éléments organiques et minéraux présents.

I.2- IDENTIFICATION BOTANIQUE

L'identification botanique a été faite par Monsieur **Chehema A.** (Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université Ouargla) et confirmée par Monsieur **Beloued A.** (Institut National d'Agronomie, INA, El Harrach, Alger) en utilisant la flore d'Ozenda. ^[1] Un échantillon des plantes a été déposé au niveau de l'herbarium de l'INA et au niveau du laboratoire de Chimie Organique, Substances Naturelles et Analyses (COSNA).

I.3- TRAITEMENT ET PREPARATION DE L'ECHANTILLON

- **Lavage – Broyage**

Tous les organes ont été lavés rapidement à l'eau distillée, séchés à l'air libre puis broyés.

II- TESTS PHYTOCHIMIQUES

De nos jours, la découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale pour la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à caractériser les différentes catégories de molécules existantes dans la plante. Ces dernières peuvent servir, non seulement à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matériaux économiques.

Pour cela, toutes les parties d'*Oudneya africana* R.Br. (racines, rameaux primaires, rameaux secondaires, rameaux tertiaires, feuilles et fruits) et d'*Aristida pungens* L. (tiges et feuilles) ont été soumises aux tests phytochimiques. Au cours de ces tests, trois solvants de polarité différente (eau, éther diéthylique, éthanol) ont été utilisés pour l'extraction des différentes familles de composés chimiques.

II.1- PRODUIT VEGETAL EPUISE AVEC L'ETHANOL

Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, mettre 50 g de matériel végétal en présence de 300 ml d'éthanol. Porter l'ensemble à reflux pendant 1 heure. Filtrer le mélange, ensuite soumettre l'extrait éthanolique aux tests suivants:

II.1.1- Alcaloïdes sels

Deux essais ont été réalisés :

- évaporer 20 ml de la solution éthanolique. Ajouter 5 ml d'HCl (10%) au résidu et chauffer dans un bain-marie. Filtrer le mélange et l'alcaliniser avec quelques gouttes d'une solution de NH_4OH (10%) jusqu'au pH 9. Extraire la solution avec l'éther diéthylique ensuite concentrer à sec. Dissoudre le résidu dans du HCl (2%). Caractériser les alcaloïdes avec les réactifs de Mayer et de Wagner.

- évaporer 20 ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml d'HCl (2N) au résidu et chauffer dans un bain-marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en deux parties égales. Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner.

Observation : Présence de turbidité ou précipitation.

(+) : est enregistré si le réactif produit une légère opacité.

(++) : est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation.

(+++): est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd.

II.1.2- Flavonoïdes

Traiter 5 ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0.5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de 3 minutes.

II.1.3- Tanins

A 1 ml de solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de $FeCl_3$ diluée. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue - noire, verte ou bleu - verte et un précipité, selon que les tanins sont cathéchiques, galliques ou ellagiques.

II.1.4- Composés réducteurs

Deux essais ont été réalisés :

- traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge - brique.

- traiter 1 ml de l'extrait éthanolique avec le réactif de Keller Kiliani. Un test positif est révélé par la formation d'un anneau brun - rouge et la solution acétique se colore lentement en bleu - vert.

II.1.5-Anthracénosides, coumarines et anthocyanosides

Pour les anthracénosides, les coumarines et les anthocyanosides, les étapes suivantes ont été adoptées. Prendre 25 ml de l'extrait éthanolique en présence de 15 ml de HCl (10%), porter à reflux pendant 30 minutes. Refroidir la solution et l'extraire 3 fois avec 15 ml d'éther. Traiter les deux phases obtenues séparément.

a) Anthracénosides

Traiter 8 ml de la solution extractive étherique par le réactif de *Borntrager*. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée - rouge au violet - pourpre.

b) Coumarines

Deux essais ont été réalisés :

- Evaporer 5 ml de la solution extractive étherique. Dissoudre le résidu dans 1 à 2 ml d'eau chaude. Diviser le volume en deux parties. Prendre le demi volume comme témoin et ajouter à l'autre volume 0.5 ml de NH_4OH (10%). Mettre deux taches sur un papier filtre et examiner sous la lumière UV. Une fluorescence intense indique la présence des coumarines.

- Placer 1 g d'échantillon de la plante humide dans un tube à essai. Couvrir le tube avec un papier imbibé d'une solution de NaOH, et le placer dans un bain-marie pendant quelques minutes. L'examen sous UV donne une fluorescence intense.

c) Anthocyanosides

Doser la solution aqueuse acide avec une solution de NaOH. S'il y a un virage de couleur en fonction du pH, la présence des anthocyanosides est confirmée.

- $\text{pH} < 3$, la solution prend une coloration rouge.

- $4 < \text{pH} < 6$, la solution prend une coloration bleue.

II.1.6- Stérols et stéroïdes

Deux essais ont été effectués :

- évaporer 10 ml d'extrait alcoolique, traiter le résidu obtenu avec 10 ml de chloroforme anhydre puis filtrer. Mélanger 5 ml de la solution chloroformique avec 5 ml d'anhydre acétique et ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter puis laisser reposer. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration violacée fugace virant au vert (maximum d'intensité en 30 minutes à 21°C).

- évaporer l'extrait alcoolique correspondant à 10 ml puis dissoudre le résidu obtenu dans 0.5 ml d'anhydride acétique et 0.5 ml de chloroforme. Traiter le filtrat avec le réactif de Liebermann Burchardt. Si une solution bleue - verte apparaît, elle indique la présence des hétérosides.

II.2- PRODUIT VEGETAL EPUISE AVEC DE L'EAU A CHAUD

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, mettre 50 g de racines en présence de 300 ml d'eau. Porter l'ensemble à reflux pendant 1 heure. Filtrer le mélange et soumettre l'extrait aqueux aux tests suivants :

II.2.1- Amidon

Traiter 5 ml de la solution préparée avec le réactif d'amidon. L'apparition d'une coloration bleue violacée indique la présence d'amidon.

II.2.2- Saponosides

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse un peu d'eau puis agiter fortement. Une écume persistante confirme la présence des saponosides. Abandonner le mélange pendant 20 minutes et évaluer la teneur en saponosides:

- pas de mousse = test négatif
- mousse moins de 1 cm = test faiblement positif
- mousse de 1-2 cm = test positif
- mousse plus de 2 cm = test très positif

II.2.3- Anthraquinones

Bouillir 1 g d'échantillon de la plante pendant quelques minutes en présence de 10 ml de KOH (0,5 N) auxquels est ajouté 1 ml de H₂O₂ dilué à 5 %. Refroidir le mélange, filtrer

puis acidifier le filtrat avec l'acide acétique. Extraire la solution acide obtenue avec 10 ml de benzène. Agiter l'extrait benzénique en présence de 5 ml de NH_4OH . Une réaction positive est révélée par la formation d'une couleur rouge au niveau de la couche alcaline.

II.2.4- Ergolines

Traiter 5 ml de la solution aqueuse avec la réaction de Van-Urk. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue

II.2.5- Polyuronides

Ajouter à 2 ml de la solution aqueuse, 10 ml d'éthanol et 4 à 5 gouttes d'hématoxyline. L'obtention d'un précipité violet, note la présence des polyuronides

II.3- PRODUIT VEGETAL EPUISE AVEC L'ETHER DIETHYLIQUE

Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, mettre 50 g en présence de 300 ml d'éther diéthylique. Porter l'ensemble à reflux pendant 1 heure. Filtrer le mélange et le soumettre aux différents tests suivants :

II.3.1- Huiles volatiles

Evaporer 20 ml de solution éthérique. Le résidu ainsi obtenu est dissout dans l'éthanol. La solution éthanolique obtenue est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu arôme. Concernant le résidu gras, ce dernier est saponifié. En fin de réaction, ajouter un peu d'eau et extraire la solution avec l'éther diéthylique.

II.3.2- Acides gras

Acidifier la solution aqueuse alcaline, puis l'extraire avec l'éther diéthylique. La solution éthérique est ensuite concentrée à sec. Un test positif est révélé par l'obtention d'un résidu gras.

II.3.3- Alcaloïdes bases

Evaporer 10 ml de la solution étherique. Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml de HCl (2%). Ajouter à la solution aqueuse alcaline 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer. La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

II.3.4- Emodols

Evaporer 3 ml de l'extrait étherique. Dissoudre le résidu dans 1 ml de NH₄OH concentré. Ensuite traiter la solution avec la réaction de Bornträger. Un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orangée – rouge au violet pourpre.

II.4- REACTIFS DE CARACTERISATION

II.4.1- Alcaloïdes

a) Réactif de Mayer

Dissoudre 1.358 g de HgCl₂ dans 60 ml d'eau. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble ou un précipité blanc.

b) Réactif de Wagner

Dissoudre 2 g de KI et 1.27 g de I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

II.4.2- Stéroïdes, hétérosides stéroïdiques et triterpéniques

Réaction de Liebermann Burchardt

Mélanger 5 ml de solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposer 30 minutes à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert. D'autre

part, cette réaction donne avec les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques respectivement des colorations verte - bleue et verte - violette.

II.4.3- Anthraquinones, anthracénosides et émodols

Réaction de Bornträger

En milieu alcalin aqueux, ces composés donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangée - rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

II.4.4- Composés réducteurs

a) La liqueur de *Fehling* est un mélange de deux solutions:

Fehling A: dissoudre x g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml d'eau distillée.

Fehling B: dissoudre 6.5 g de NaOH, 17.3 g de tartrate de sodium et potassium dans 35 ml d'eau distillée puis compléter le volume à 50 ml. Les composés réducteurs donnent avec le réactif de Fehling un précipité rouge brique.

b) **Réaction de Keller- killiani**

L'addition de 5 ml d'acide sulfurique concentré contenant des traces de sels ferriques à une solution de volume 5 ml d'hétérosides dans l'acide acétique concentré contenant également des sels ferriques conduit à la formation d'un anneau brun - rouge. La solution acétique se colore lentement en bleu - vert.

II.4.5- Amidon

Réactif d'amidon

Dissoudre 1.2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2.5 g d'iodure de potassium. Chauffer pendant 5 minutes. Diluer jusqu'à 500 ml. Chauffer 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée dans un bain-marie jusqu'à ébullition.

Ajouter le réactif d'amidon. Un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleue - violacée.

II.4.6- Ergolines

Réaction de Van Urk

L'addition de la p-diméthylaminobenzaldehyde en milieu acide à la solution d'ergoline donne une coloration bleue

III- APPAREILS ET METHODES EXPERIMENTALES

III.1- APPAREILS

Les chromatographies analytiques sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur plaques de silice Kieselgel 60 F254 Art. 5719 Merck.

Les produits sont révélés par extinction de fluorescence en lumière UV à 254 nm, fluorescence en lumière UV à 366 nm et par le réactif au molybdate d'ammonium (100 g de molybdate d'ammonium + 1000 ml H₂O/H₂SO₄ concentré). Ce réactif révèle beaucoup de composés organiques après pulvérisation et chauffage de quelques minutes.

Les chromatographies préparatives sur couche épaisse (CCE) ont été réalisées sur plaque de silice Kieselgel 60 PF254 Art.7747 Merck.

Les chromatographies préparatives sous moyenne pression (0.5 bar) ont été exécutées sur colonne :

- silice Kieselgel 60H Art.7736 Merck.

- silice Kieselgel 40H Art.7734 Merck.

Les spectres de masse (SM) ont été enregistrés sur un appareil de type AEI MS-50 pour l'impact électronique (IE).

Les spectres de RMN 1H ont été enregistrés sur les appareils Bruker de type WP200SY (calculateur Aspect 2000), AC200 (calculateur Aspect 3000) et WM 400. Les

déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) pris comme référence interne. J est la constante de couplage exprimée en hertz (Hz) et H l'intégration. Les abréviations s, d, t, q, dd, m désignent respectivement singulet, doublet, triplet, quadruplet, doublet dédoublé et multiplet.

Les spectres en lumière infrarouge (IR) ont été réalisés sur spectrophotomètre Nicolet FIT-IR 205. Les bandes d'absorption sont exprimées en cm^{-1} .

Les spectres en lumière ultra-violette (UV) ont été enregistrés sur spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 5 UV/visible. Les échantillons sont en solution dans le méthanol et sont placés dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm.

Les spectres de RMN ^{13}C sont enregistrés sur les appareils Bruker de type WP200SY (calculateur Aspect 2000), AC200 (calculateur Aspect 3000) à la fréquence de 50.2 MHz. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm.

III.2- METHODES EXPERIMENTALES

III.2.1- Préparation des échantillons pour la spectrométrie UV

L'échantillon en solution est placé dans une cuve en quartz de trajet optique de 1 cm. La solubilisation de l'échantillon est réalisée avec du méthanol très pur ou de l'éthanol à 95%. La concentration idéale pour l'obtention d'un bon spectre est d'environ 40 mg/l. Pour y parvenir, on pèse sur une balance de précision 2 mg de produit que l'on solubilise dans 2 ml de solvant. On prélève exactement 1 ml de cette solution (soit 1 mg de l'échantillon) pour le diluer dans une fiole jaugée de 25 ml. La concentration du produit est alors de 40 mg/l.

III.2.2- Déroulement d'une étape de purification par chromatographie

a) choix du matériel

Le choix de la colonne est déterminé par la masse de l'échantillon.

- 10 mg de produit pour une plaque couche mince (CCM).
- environ 50 mg de produit pour une plaque couche épaisse (CCE).

- la colonne devient nécessaire pour un échantillon de poids supérieur à 200 mg.

b) Choix de la taille de la colonne

Le poids d'adsorbant nécessaire est égal à 30 fois la masse de l'échantillon. Le choix de la colonne est telle que la hauteur de l'adsorbant doit être égale à 8 fois son diamètre.

c) Essai de différents systèmes de solvants par CCM analytique

Avant de purifier un produit, il faut trouver une phase mobile efficace, c'est à dire permettant de parvenir à :

- une bonne élution du produit à isoler.
- une bonne séparation des composants du mélange.
- une bonne résolution (le produit doit lors de la révélation présenter une forme homogène, la zone où il se trouve ne doit pas être trop étalée).

d) Récupération du produit

En CCM et CCE, le produit est révélé par fluorescence ultraviolette (ou par extinction de fluorescence). La zone de silice ainsi identifiée est récupérée par grattage, puis versée sur un Schott en verre fritté. Le produit adsorbé sur les graines de silice est élué avec un solvant très polaire (CH_2Cl_2 + MeOH 20%). Ensuite, on procède à l'évaporation pour récupérer le produit pur.

III.2.3- Remarques diverses

- Toute étape de purification commence par une CCM analytique, non seulement pour vérifier l'efficacité d'un système de solvants, mais aussi pour déterminer les produits à isoler. Il est rare en effet, de pouvoir séparer tous les composants d'un mélange. Il faut bien souvent se contenter d'isoler le(s) produit(s) majoritaire(s). Néanmoins, les fractions peu intéressantes sont aussi récupérées pour procéder au bilan massique de la manipulation.

- L'isolement d'une fraction après une première chromatographie de colonne sur gel de silice conduit rarement à un produit pur. L'analyse de la fraction récoltée, conduit la

plupart du temps à observer un mélange complexe qui devra être soumis à une nouvelle purification.

- En CCE, la séparation de deux composés très proches nécessite parfois deux éluions : la plaque chromatographique est séchée, puis soumise à une seconde migration.

- En CCM analytique, on utilise des plaques de faible hauteur, dont le temps d'éluion dépasse rarement 10 minutes. En revanche, en CCE préparative, les plaques sont plus hautes et le temps d'éluion d'environ une heure permet une meilleure séparation des composés. Cependant, on observe quelquefois, l'apparition de nouveaux produits (indiscernables en CCM analytique), qui compliquent le processus de purification car la quantité de produit déposé en CCE est plus importante, et les impuretés deviennent visibles.

- En raison de la forte polarité des produits, des solvants très éluants (c'est à dire à forte proportion en méthanol) ont été utilisés. Le méthanol ayant tendance à solubiliser la silice, l'éluion des produits s'accompagne d'un apport de silice qui pollue et rend aberrant le calcul de la masse de produit isolé. Il faudra donc ultérieurement redissoudre le produit dans un solvant moins polaire, qui insolubilisera la silice.

- Enfin la numérotation des fractions suit les règles suivantes : si l'on prend l'exemple de la fraction OA1H, OA désigne le nom de la plante (*Oudneya africana*), 1 indique la première colonne de purification, enfin H détermine l'ordre de sortie de la colonne ou la position de la fraction au niveau de la plaque chromatographique. Ainsi lorsqu'on travaille en phase normale, la polarité du produit augmente dans le sens croissant. Donc la fraction A représente la première fraction élue hors de la colonne où, la fraction dont le coefficient de rétention (R_f) est le plus élué dans le cas de la CCM.

IV- EXTRACTION-PURIFICATION

Les tanins, les terpénoides, les saponosides et les flavonoides sont extraits par une solution aqueuse, mais ils sont le plus souvent obtenus par un solvant moins polaire. ^[208 - 211]

Il a été prouvé que l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le méthanol (MeOH) sont de bons solvants d'extraction. Ainsi nous avons utilisé l'AcOEt pour extraire les stérols et les stéroïdes à partir des feuilles et des fruits d'*Oudneya africana* R.Br. et des tiges et des feuilles d'*Aristida pungens* L. Ces extraits sont notés respectivement LA, FrA, TA et FA. Les autres composés

trouvés tels que les flavonoides, les saponosides et les tanins ont été extraits par le MeOH. Les extraits obtenus sont notés respectivement LM, FrM, TM et FM.

IV.1- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES ET DES FRUITS D'*OUDNEYA AFRICANA* R.Br. (LA, FrA)

Nous avons soumis l'extrait LA (6610 mg) au fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice. Nous avons regroupé les fractions en fonction de leurs Rf après analyse sur CCM. Le Rf est le facteur de rétention. Les constituants d'un mélange sont caractérisés par le facteur de rétention Rf calculé par la formule :

$$\mathbf{Rf} = \text{distance parcourue par le composé} / \text{distance parcourue par le solvant.}$$

Le Rf dépend des constituants analysés, de l'adsorbant et du système d'élution.

IV.1.1- Isolement des composés 1 et 2

L'extrait des feuilles LA (6160 mg) a été purifié par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient de solvants CH₂Cl₂ / MeOH. Nous avons obtenu 9 fractions (OA1A, ..., OA1I) (tableau II.1).

Tableau II.1 : Fractionnement de l'extrait d'AcOEt des feuilles d'*Oudneya africana* R.Br.

Eluant	Fractions	Masse (mg)
CH ₂ Cl ₂	OA1A	423
	OA1B	342
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (99 : 1)	OA1C	454
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 : 2)	OA1D	340
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (97 : 3)	OA1E	283
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 : 5)	OA1F	256
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 : 10)	OA1G	53
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80 : 20)	OA1H	554
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (60 : 40)	OA1I	387

Le bilan massique montre que 3090 mg ont été récupérés sur les 6610 mg chromatographiés, soit un rendement de 46.74%.

Une deuxième séparation chromatographique effectuée sur colonne de silice de la fraction OA1B en utilisant comme éluant Heptane / AcOEt (8 : 2), nous a permis d'obtenir cinq fractions (tableau II.2). Les fractions OA2B et OA2C ont conduit aux deux composés : le composé 1 (stigmasténol), et le composé 2 (β -sitostérol).

Tableau II.2 : Fractionnement de la fraction OA1B

Eluant	Fractions	Masse (mg)
Heptane / AcOEt (8 : 2)	OA2A	135.7
	OA2B	68
	OA2C	59
	OA2D	14
	OA2E	26.5

Le bilan massique montre que 297.7 mg ont été récupérés sur les 342 mg chromatographiés, soit un rendement de 87.04%.

IV.1.2- Isolement du composé 3

La fraction OA1F (256 mg, tableau II.1) est chromatographiée sur colonne de gel de silice en utilisant comme éluant Heptane /Acétone (65 :5). Cette chromatographie nous a donné cinq fractions (tableau II.3).

Le bilan massique montre que 211.5 mg ont été récupérés sur les 256 mg chromatographiés, soit un rendement 82.61%. La fraction OA3C a conduit au composé 3 (stigmastérol).

Tableau II.3 : Fractionnement de la fraction OA1F

Eluant	Fractions	Masse (mg)
	OA3A	63
Heptane / Acétone (99 : 1)	OA3B	49
Heptane / Acétone (97 : 3)	OA3C	23
Heptane / Acétone (95 : 5)	OA3D	59
Heptane / Acétone (92 : 8)	OA3E	17.5

IV.1.3- Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits d'*Oudneya africana* R.Br. (FrA)

Le fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits d'*Oudneya africana* R.Br. (FrA) nous a donné les mêmes produits (stigmastérol, β -sitostérol et stigmastérol).

IV.2- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE METHANOL DES FEUILLES D'*ODUNEYA AFRICANA* R.Br. (LM)

Nous avons repris l'extrait méthanolique dans l'eau distillée jusqu'à dissolution complète (avec un léger chauffage). La phase aqueuse a été extraite à 5 reprises par le toluène, puis par l'AcOEt, l'éther diéthylique et ensuite par le butanol. Les phases organiques de chaque extraction pour chaque solvant sont réunies, séchées, puis évaporées pour donner un résidu sec.

Le résidu de l'acétate d'éthyle a été ensuite, purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice. Les 271 fractions (de 15 à 20 ml) collectées ont été rassemblées en 11 échantillons (tableau II.4).

Le bilan massique montre que 314 mg ont été récupérés sur les 322 mg chromatographiés soit un rendement de 97.63%.

Tableau II.4 : Fractionnement de l'extrait de méthanol des feuilles d'*Oudneya africana* R.Br. (LM)

Eluant	Fractions	Masse (mg)
CH ₂ Cl ₂	OA4A	123
	OA4B	107
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (99 : 1)	OA4C	53
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (98 : 2)	OA4D	98
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 : 5)	OA4E	462
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 : 10)	OA4F	216
	OA4G	505
	OA4H	363
	OA4I	597
	OA4J	406
	OA4K	214

IV.2.1- Purification de la fraction OA4F (216 mg)

Système de solvants : AcOEt / cyclohexane (7 : 3)

4 plaques de CCE

Résultats : nous avons obtenu cinq fractions :

- OA5A (96 mg)
- OA5B (27.6 mg)
- OA5C (19.7 mg)
- OA5D (21.3 mg)
- OA5E (42.1 mg)

L'analyse de ces fractions en CCM révèle des mélanges complexes de nombreux produits.

IV.2.2- Purification de la fraction OA5A (96 mg)

Système de solvants : cyclohexane / AcOEt (5 : 5)

2 plaques de CCE

Résultats : nous avons isolé trois fractions :

- OA6A (19 mg)
- OA6B (16.6 mg)
- OA6C (33.7 mg)

Ces fractions analysées par CCM révèlent aussi des mélanges complexes de nombreux produits. En raison de leurs faibles poids, ces fractions ne peuvent donc pas être étudiées.

La fraction OA6C présente plus de 5 taches révélées au molybdate d'ammonium.

IV.2.3- Purification de la fraction OA6C (33.7 mg)

Système de solvants : cyclohexane / AcOEt (5 : 5)

1 plaque de CCE

Résultats : nous avons obtenu trois fractions :

- OA7A (7.3 mg) : mélange
- OA7B (11.2 mg) : mélange
- OA7C (13.7 mg) : mélange

IV.2.4- Purification de la fraction OA5C (19.7 mg)

Système de solvants : Hexane / Acétone (6 : 4)

2 plaques de CCM

Résultats : nous avons obtenu deux fractions :

- OA8A (4.7 mg) : produit monotache
- OA8B (4 mg) : produit monotache

Le produit OA8A présente une coloration rose après révélation au molybdate d'ammonium. Vu les faibles quantités obtenues l'analyse de ces composés est difficile.

IV.2.5- Purification de la fraction OA5D (21.3 mg)

Système de solvants : Hexane / Acétone (6 : 4)

2 plaques de CCM

Résultats : nous avons obtenu trois fractions :

- OA9A (2.9 mg) : monotache
- OA9B (6.9 mg) : monotache
- OA9C (3.5 mg) : mélange

Là également, vu les faibles quantités obtenues, l'analyse de ces composés est difficile.

IV.2.6- Purification de la fraction OA4I (597 mg)

Une colonne de diamètre 18 mm est remplie avec 16 g de silice n° 7734.

Solvant : gradient de CH₂Cl₂ / MeOH (90 : 10)

Le produit n'étant pas soluble dans le solvant de départ, il a été mélangé à de la silice moyenne (grains plus gros) pour obtenir une pâte qui a été déposée par sédimentation au sommet de la colonne.

Résultat : les résultats que nous avons obtenus sont donnés dans le tableau II.5.

Tableau II.5 : Fractionnement de la fraction OA4I

Eluant	Fractions	Masse (mg)
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 : 5) CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 : 10)	OA10A	12.7
	OA10B	27.5
	OA10C	17.5
	OA10D	21.5
	OA10E	9.2
	OA10F	17
	OA10G	37.9
	OA10H	47.6
	OA10I	72.3
	OA10J	40.6

Le bilan massique montre que 303.8 mg ont été récupérés sur les 597 mg chromatographiés, soit un rendement de 50.88%.

En CCM analytique, les fractions OA10G et OA10H nous présentent, entres autres, un composé dont la révélation au molybdate d'ammonium conduit à une coloration mauve.

D'autre part, les fractions OA10I et OA10J nous présentent aussi un produit très net après révélation avec le même réactif. Ces deux produits ont été donc isolés.

IV.2.7- Purification de la fraction OA10J

Système de solvants : CH₂Cl₂ / MeOH (90 : 10)

1 plaque de CCE

Résultats : nous avons obtenu deux fractions :

- OA11A (21.9 mg) : mélange
- OA11B (6.9 mg) : monotache

IV.2.8- Purification de la fraction OA10I

Système de solvants : CH₂Cl₂/ MeOH (90 : 10)

1 plaque de CCE : cette plaque a été deux fois élue.

Résultats : nous avons obtenu trois fractions :

- OA12A (30.9 mg) : mélange
- OA12B (6.9 mg) : mélange
- OA12C (17.6 mg) : monotache

La comparaison par CCM analytique nous prouve que les produits OA11B et OA12C sont bien les mêmes. Ces deux fractions sont rassemblées pour nous donner le produit **4** (épicathéchine).

IV.2.9- Purification des fractions OA10G et OA10H

Système de solvants : CH₂Cl₂/ MeOH (90 : 10)

2 plaques de CCE

Résultats : nous avons obtenu deux fractions :

- OA13A (32.9 mg) : mélange
- OA13B (19 mg) : monotache (RMN)

La fraction OA13B nous a conduit au composé **5** (épiatzéléchine).

IV.3- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES TIGES ET DES FEUILLES D'ARISTIDA PUNGENS L. (TA ET FA)

Le fractionnement de l'extrait TA (2000 mg) a été effectué par chromatographie sur colonne de gel de silice. Les fractions sont regroupées en fonction de leurs R_f après analyse sur CCM.

IV.3.1- Isolement des composés 6 et 7

L'extrait des tiges TA (2000 mg) purifié par chromatographie sur colonne de silice avec un gradient de solvants CH₂Cl₂ / MeOH, nous a donné 6 fractions (AP1A, ..., AP1F) (tableau II.6).

Tableau II.6: Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des tiges d'*Aristida pungens* L. (TA)

Eluant	Fractions	Masse (mg)
	AP1A	351.1
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (99 : 1)	AP1B	403.7
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (97 : 3)	AP1C	534.7
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (95 : 5)	AP1D	184
CH ₂ Cl ₂ /MeOH (90 : 10)	AP1E	78.9
	AP1F	387.7

Le bilan massique montre que 1940 mg ont été récupérés sur les 2000 mg chromatographiés, soit un rendement de 97%.

IV.3.2- Purification de la fraction AP1B

Une deuxième séparation chromatographique sur colonne de silice de la fraction AP1B a été réalisée en utilisant comme éluant Heptane / AcOEt (8 : 2). Cette purification nous a permis d'obtenir trois fractions (tableau II.7).

Tableau II.7 : Fractionnement de la fraction AP1B

Eluant	Fractions	Masse (mg)
	AP2A	34
Heptane/AcOEt (99 : 1)	AP2B	281.4
Heptane / Acétone (97 : 3)	AP2C	47.5

Le bilan massique montre que 362.9 mg ont été récupérés sur les 403.7 mg chromatographiés, soit un rendement de 89.89 %.

IV.3.3- Purification de la fraction AP2B

Une troisième séparation chromatographique sur colonne de silice de la fraction AP2B en utilisant comme éluant Heptane / AcOEt (8 : 2). Cette purification nous a donné six fractions (tableau II.8).

Tableau II.8 : Fractionnement de la fraction AP2B

Eluant	Fractions	Masse (mg)
	AP3A	27.4
	AP3B	31
Heptane / Acétone (99 : 1)	AP3C	27.1
Heptane / Acétone (97 : 3)	AP3D	34
	AP3E	39.7
	AP3F	104.5

Le bilan massique montre que 263.7 mg ont été récupérés sur les 281.4 mg chromatographiés, soit un rendement de 93.71 %.

IV.3.4- Purification de la fraction AP3F

Système de solvants : Hexane/CH₂Cl₂ (70 : 30)

2 plaques de CCE

Résultats : nous avons obtenu trois fractions :

- AP4A (37.3 mg) : monotache (RMN)
- AP4B (42.1 mg) : monotache (RMN)

- AP4C (21.4 mg)

Les fractions AP4A et AP4B nous ont conduit respectivement aux composés **6** (fridéline) et **7** (lupéol).

IV.3.5- Fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d'*Aristida pungens* L. (FA)

Le fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d'*Aristida pungens* L. (FA) nous a donné les mêmes produits (fridéline et lupéol).

Les molécules **1** - **5** ont été isolées pour la première fois à partir d'*Oudneya africana* R.Br. et les molécules **6** et **7** ont été obtenues pour la première fois à partir d'*Aristida pungens* L.

V- TENEUR DES METAUX LOURDS

V.1- SPECTROMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (SAA)

La spectrométrie d'absorption atomique permet le dosage de nombreux matériaux inorganiques et étudie les émissions ou absorptions de lumière par l'atome libre. Généralement, seuls les électrons externes de l'atome sont concernés.

a) Principe

L'absorption des radiations électromagnétiques des régions visibles et UV du spectre par les atomes libres résulte d'un changement dans la structure électronique. On l'observe lorsque la radiation caractéristique (de résonance en général) d'un élément passe dans un nuage de vapeur atomique de l'échantillon. L'échantillon est vaporisé par aspiration de la solution dans une flamme ou par évaporation d'une surface chauffée électriquement.

b) Loi d'absorption en absorption atomique

L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière. Selon la loi de Beer Lambert, l'absorbance est proportionnelle au coefficient d'absorption spécifique a , au trajet optique b et à la concentration c .

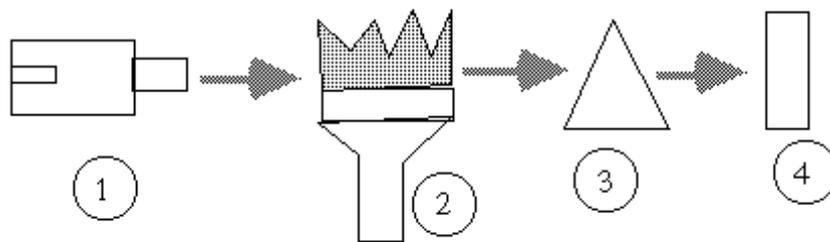
$$A = abc$$

Où, $A = \log I_0/I$; I = intensité après absorption par les atomes ; I_0 = intensité initiale de la source lumineuse.

Il a été noté qu'en pratique, cette relation n'est pas toujours vérifiée. La courbe d'étalonnage n'est pas toujours une droite surtout si la concentration devient trop élevée. La gamme de dosage est le domaine dans lequel la courbe d'étalonnage est pratiquement une droite. Il est limité pour les faibles concentrations par la limite de détection et pour les fortes concentrations par l'erreur sur la fidélité : à une très forte variation de la concentration correspond une faible variation de l'absorbance. La gamme de dosage est généralement donnée par le constructeur. Elle dépend de la raie de dosage utilisée.

c) Appareillage

Le dispositif expérimental utilisé en absorption atomique se compose d'une source, d'une lampe à cathode creuse ①, d'un brûleur et un nébuliseur ②, d'un monochromateur ③ et d'un détecteur ④ relié à un amplificateur et un dispositif d'acquisition. ^[3]



d) Lampe à cathode creuse

La lampe à cathode creuse est constituée par une enveloppe de verre scellée et pourvue d'une fenêtre en verre ou en quartz contenant une cathode creuse cylindrique et une anode. La cathode est constituée de l'élément que l'on veut doser. Un vide poussé est réalisé à l'intérieur de l'ampoule qui est ensuite remplie d'un gaz rare (argon ou néon) sous une pression de quelques mm de Hg.

Lorsqu'on applique une différence de potentiel de quelques centaines de volts entre les deux électrodes, une décharge s'établit. Le gaz rare est alors ionisé et ses ions bombardent alors la cathode, arrachant des atomes à celle-ci. Ces atomes sont donc libres et sont excités par chocs : il y a émission atomique de l'élément constituant la cathode creuse. La particularité du rayonnement ainsi émis est qu'il est constitué de raies très intenses et très fines.

e) Nébuliseur

L'échantillon à analyser est en solution. Celle-ci est aspirée au moyen d'un capillaire par le nébuliseur. A l'orifice du nébuliseur, du fait de l'éjection d'un gaz à grande vitesse, il se crée une dépression (effet Venturi). La solution d'analyse est alors aspirée dans le capillaire et à la sortie, elle est pulvérisée en un aérosol constitué de fines gouttelettes. Cet aérosol pénètre alors dans la chambre de nébulisation dont le rôle est de faire éclater les gouttelettes et d'éliminer les plus grosses. Ce brouillard homogène pénètre alors dans le brûleur.

f) Flamme – atomisation

L'aérosol pénètre dans le brûleur puis dans la flamme. Au bout d'un certain parcours au seuil de la flamme, le solvant de la gouttelette est éliminé, il reste les sels ou particules solides qui sont alors fondus, vaporisés puis atomisés. La flamme air acétylène est la plus répandue et permet de réaliser le dosage de nombreux éléments. Sa température est de 2500°C environ. A la place d'une flamme, on peut également utiliser un four cylindrique en graphite pour atomiser l'échantillon.

g) Monochromateur et amplificateur

Le monochromateur est destiné à défaire la sélection de la longueur d'onde émise, modifiée par la traversée au niveau du brûleur. La réception constituée par un photomultiplicateur associé à un amplificateur linéaire à logarithmique, fournit la valeur de l'absorption. Les principales caractéristiques du dosage et de l'atomisation de nos échantillons sont définies dans le tableau II.8 et celles de l'appareil dans le tableau II.9.

Tableau II.8: Les conditions d'atomisation pour les éléments traces dosés

Elément	Raie principale (nm)	Sensibilité (mg/l)	Max absolu (mg/l)
Cu	324.8	0.077	4
Co	228.8	0.12	3.5
Ni	341.5	0.17	5
Pb	283.3	0.45	5
Cd	228.8	0.028	2
Zn	213.7	0.018	0.8
Fe	271.9	0.34	10

Tableau II.9: Les caractéristiques du spectromètre d'absorption atomique à flamme

Référence de l'appareil	Analyst 300 PerkinElmer
Lampe	cathodique HCl
Flamme	acétylène/air

V.2- EXTRACTION DES MÉTAUX LOURDS

Les techniques d'analyses élémentaires consistent essentiellement à transformer les constituants du végétal en sels dosables. Le dosage de ces anions et cations concerne donc la matière minérale c'est à dire ce qui reste après l'incinération

Les différentes parties d'*Oudneya africana* R.Br. (racines (R), rameaux primaires (R1), rameaux secondaires (R2), rameaux tertiaires (R3) et feuilles (L)), et d'*Aristida pungens* L. (tiges (T), nœuds (N), gaine (G) et feuilles (F)) sont broyées pour être ensuite calcinées.

V.2.1- Protocole expérimental de l'incinération

On pèse dans une capsule de porcelaine 200 à 300 mg de poudre végétale (R, R1, R2, R3, F dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. et T, N, G, F dans le cas d'*Aristida pungens* L.). La capsule est placée dans un four à moufle. Les meilleurs résultats sont obtenus en gardant le

four à 300°C jusqu'à ce que le carbone cesse d'être incandescent. Nous avons augmenté la température du four jusqu'à une température de 400-450°C, afin d'obtenir des cendres blanches friables. L'oxydation des dernières traces du matériel organique est alors réalisée en ajoutant 1 à 2 ml de HNO₃ (1N) après refroidissement de la capsule. On évapore cette dernière à sec sur une plaque chauffante ou au bain de sable et on la replace au four à 400°C pendant une heure.

V.2.2- Préparation des différentes solutions par attaque acide

Au cours de notre travail, trois solutions acides (solution d'acide nitrique concentrée, solution d'acide chlorhydrique concentrée et l'eau régale) ont été utilisées pour essayer d'extraire la totalité des métaux lourds dans la matière végétale calcinée.

a) Mise en solution des métaux lourds par l'acide nitrique (HNO₃)

0.5 g de cendre a été introduit dans un erlenmeyer. On ajoute 5 ml de l'acide nitrique concentré HNO₃ (60%). Après avoir fermé l'erlenmeyer, la réaction est abandonnée à température ambiante, pendant 16 heures sous agitation. Puis la réaction est apportée à 70° au bain-marie et suivie d'une agitation pendant 8 heures. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 50 ml.

b) Mise en solution des métaux lourds par HCl

0.5 g de cendre a été introduit dans un erlenmeyer. On ajoute 5ml de l'acide chlorhydrique concentré HCl (35%). Après avoir fermé l'erlen, on chauffe à une température entre 40-60° pendant 8 heures sous une agitation. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec rinçage à l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 25 ml.

c) Mise en solution des métaux lourds par l'eau régale

1 g de cendre a été introduit dans un erlenmeyer où on réalise l'attaque par 10 ml d'eau régale (HCl/HNO₃ (1:3)). Après avoir fermé l'erlenmeyer, on chauffe sur plaque chauffante pendant 3 heures. Après refroidissement, une filtration est effectuée avec rinçage en utilisant l'eau distillée. La solution finale est jaugée à 50 ml.

V.3- DOSAGE DES SOLUTIONS

Nous avons soumis les solutions préparées des différentes parties de nos deux plantes aux analyses des métaux lourds (Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) par spectromètre d'absorption atomique (SAA). Pour ce faire, il est impératif de préparer des solutions étalons de concentrations connues.

V.3.1- Préparation des solutions étalons

Cadmium (Cd)

Une solution étalon de 2 ppm¹ est préparée en pesant exactement 0.54 mg de Cd (NO₃)₂.4H₂O que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 1 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Cobalt (Co)

Une solution étalon de 3.5 ppm est préparée en pesant exactement 1.41 mg de CoCl₂.6H₂O que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 2 ppm est préparée à partir de 57.1 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 1 ppm est préparée à partir de 28.5 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

¹ ppm : partie par million ; m/l.

Cuivre (Cu)

Une solution étalon de 5 ppm est préparée en pesant exactement 2.68 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 3.17 ppm est préparée à partir de 63.4 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 1.58 ppm est préparée à partir de 31.6 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Fer (Fe)

Une solution étalon de 5 ppm est préparée en pesant exactement 3.51 mg de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 1 ppm est préparée à partir de 20 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Nickel (Ni)

Une solution étalon de 10 ppm est préparée en pesant exactement 4.78 mg de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution étalon intermédiaire de 5 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution étalon de 1 ppm est préparée à partir de 10 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Plomb (Pb)

Une solution étalon de 20 ppm est préparée en pesant exactement 3.13 mg de Pb (CH₃COO)₂ que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 10 ppm est préparée à partir de 50 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 5 ppm est préparée à partir de 25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Zinc (Zn)

Une solution étalon de 0.8 ppm est préparée en pesant exactement 0.26 mg de Zn(CH₃COO)₂.2H₂O que l'on met dans un bécher et que l'on dissout dans un minimum d'eau. On verse ce contenu dans une fiole jaugée de 100 ml et on complète le volume avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une solution intermédiaire de 0.53 ppm est préparée à partir de 66.25 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

Une autre solution de 0.26 ppm est préparée à partir de 32.5 ml de la solution étalon que l'on introduit dans une fiole de 100 ml, puis on complète à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

V.5- CALCUL DE LA CONCENTRATION DES METAUX

La teneur ou concentration des métaux dans la matière sèche de l'échantillon, est exprimée comme suit :

$$T(\text{ppm}) = \frac{X \times V}{M \times D}$$

X : est la concentration de l'analyte en ppm, au niveau de la solution d'attaque.

V : volume final en ml de la solution d'attaque.

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

D : facteur de dilution ($D = 1$).

VI- ETUDE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN D'*LOUDNEYA AFRICANA* R.Br. D'*ARISTIDA PUNGENS* L. ET DES ANTIMICROBIENS

La présence des flavonoides, des saponosides, des tanins, des stérols et des stéroïdes peut conférer aux plantes une activité antimicrobienne.

Selon les résultats obtenus dans une étude réalisée au département de biologie – faculté des sciences – université de Tlemcen sur la résistance des antibiotiques aux bactéries hospitalières, nous avons jugé utile de tester nos extraits des feuilles et des fruits d'*Oudneya africana* R.Br. (LA, LM, FrA et FrM) et des extraits des tiges et des feuilles d'*Aristida pungens* L. (TA, TM, FA et FM) vis-à-vis des différents microorganismes : bactéries, levures et moisissures.

VI.1- PROVENANCE DES GERMES

Les souches pathogènes utilisées sont indiquées dans le tableau II.10. Elles sont celles qui causent les maladies courantes (infections urinaires, broncho-pulmonaires, cutanées, digestives, causées par les bactéries). Ce sont aussi des contaminants fréquents (les moisissures) provoquant d'importantes mycoses (les levures).

Concernant, les bactéries hospitalières, elles sont isolées des dispositifs médicaux (cathéters, sondes) du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Tlemcen. Les résultats obtenus sont comparés à ceux des antibiotiques et des antifongiques testés sur les mêmes souches.

Tableau II.10 : Provenance des germes étudiés

Souches utilisées	Origine
<p><u>BACTERIES :</u></p> <p>Bactéries à GRAM (-) :</p> <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa1) (112)</p> <p><i>Pseudomonas putida</i> (Pp) (116)</p> <p><i>Pseudomonas Proteus</i> (Pr.99)</p>	<p>Souches isolées des dispositifs médicaux (cathéters, sondes) du CHU de Tlemcen au niveau du laboratoire de microbiologie. (Département de biologie. Tlemcen)</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa2) (9070)</p>	<p>I.P.P (Institut Pasteur de Paris)</p>
<p>Bactéries à GRAM (+) :</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i> (St) 602</p> <p><i>Listeria monocytogens</i> (LM) 19111</p>	<p>ATCC (American Type Culture Collection)</p>
<p><u>LEVURES :</u></p> <p><i>Candida albicans</i> (Ca1) ATCC</p> <p><i>Candida albicans</i> (Ca2) 444</p>	<p>I.P.P (Institut Pasteur de Paris)</p>
<p><u>MOISSISSURES :</u></p> <p><i>Aspergillus flavus</i> (Af) (994224)</p> <p><i>Cladosporium herbarum</i> (Ch) (3369)</p> <p><i>Botrytis cinerea</i> (Bc)(76.3127)</p> <p><i>Fusarium oxysporium</i> (Fo) (963917)</p>	<p>Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN) Paris, France.</p>

VI.2- EFFET DES ANTIBIOTIQUES (ATB)

La sensibilité des souches suivantes a été testée vis-à-vis des ATB cités dans le tableau II.11 :

Bactérie Gram (-) :

Pseudomonas aeruginosa (Pa1) ; *Pseudomonas aeruginosa* (Pa2)

Pseudomonas putida (Pp) ; *Pseudomonas Proteus* (Pr)

Bactérie Gram (+) :

Staphylococcus aureus (St) ; *Listeria monocytogens* (LM)

Tableau II.11 : Les antibiotiques utilisés

Famille	ATB	Sigle	Charge du disque (µg)
β-lactamines	Amoxicilline	AMX	25
	Cephazoline	CZ	30
Aminosides	Streptomycine	S	10
Tétracyclines	Tétracycline	TE	30
Macrolides	Erythromycine	E	15
Sulfamides et Associations	Triméthoprime-sulfamide	SXT	1.25 + 3.75
Quinolones	Acide nalidixique	NA	30
Pénicillines	Carbénicilline	CB	100
Divers	Rifampicine	RA	30

Les antibiotiques ont été choisis en fonction de ceux utilisés au laboratoire de microbiologie à l'hôpital de Tlemcen, et aussi en fonction de leur disponibilité.

Méthode utilisée

La méthode utilisée est celle de la diffusion des ATB sur gélose ou méthode des disques. Après la préparation des inoculums, et l'ensemencement de la gélose Muller-Hinton (MH) par inondation l'excès du liquide est aspiré et la surface de la gélose est laissée sécher 15 à 20 minutes à $37\pm 1^\circ\text{C}$. A l'aide d'un distributeur de disques, on place sur la surface de la gélose les différents disques d'ATB choisis. Les boîtes ont été laissées durant 20 minutes à la température ambiante pour permettre une bonne diffusion de l'ATB. Elles ont été ensuite incubées à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 heures. La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque, puis comparée à une échelle étalonnée fournie par l'institut Pasteur.

VI.3- EFFET DES ANTIFONGIQUES (ATF)

La sensibilité des champignons vis-à-vis des antifongiques cités dans le tableau II.12 a été réalisée sur des souches de levures (*Candida albicans* : Ca1 et Ca2 et sur les moisissures suivantes : *Aspergillus flavus* (Af) , *Cladosporium herbarum* (Ch), *Botrytis cinerea* (Bc) et *Fusarium oxysporium* (Fo))

Tableau II.12 : Les antifongiques utilisés

ATF	Sigle	Charge du disque (μg)
Amphotéricine B	AB	100
Econazole	EC	50
Miconazole	MCZ	50
Clotrimazole	CTR	50
Flucytosine	FC	1
Mitraconazole	MTR	50

Méthode utilisée

La même technique de l'antibiogramme a été utilisée. Les ATF sont déposés sous forme de disques à la surface du milieu de culture. Ensuite, les boîtes sont incubées à $30\pm 1^\circ\text{C}$

pendant 24 à 48 heures pour les levures et à $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 10 à 12 heures pour les moisissures.

VI.4- ETUDE DU POUVOIR ANTIMICROBIEN DES EXTRAITS (LM, LA, FrM, FrA, TM, TA, FM ET FA)

VI.4.1- Techniques d'étude du pouvoir antimicrobien

Les techniques utilisées sont celles de la diffusion sur gélose ou méthode des disques et la technique sur milieu liquide.

a) En milieux solides

Cette méthode se base sur la diffusion de l'extrait testé dans la gélose. Elle consiste à déposer à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé par la suspension de germes choisis, des disques de papiers filtres imprégnés des extraits à tester.

Méthode utilisée

Après l'ensemencement du milieu gélosé par l'inoculum préalablement calibré, nous avons déposé à la surface des disques de papier filtre (de 6mm de diamètre) imprégnés des extraits à raison de 4 μl pour l'extrait méthanolique et 8 μl pour l'extrait à l'acétate d'éthyle. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition en mm.

b) En milieux liquides : Bactéries et levures

Cette technique consiste à faire agir en phase liquide des concentrations croissantes des extraits sur des microorganismes.

Méthode utilisée

A 9ml d'eau distillée stérile, on ajoute aseptiquement 1 ml de notre extrait de façon à ce que le solvant, le méthanol pour l'extrait méthanolique, et l'acétone pour celui de l'acétate d'éthyle (car ce dernier n'est pas miscible à l'eau) ne dépasse pas les 5% car, après des essais, on a pu prouver qu'à ce pourcentage le solvant n'agit pas sur la croissance des germes. On agite rigoureusement pendant quelques minutes pour disperser l'extrait dans l'eau distillée. On obtient ainsi la solution mère (SM) à partir de laquelle, on procédera à des dilutions successives allant de 10^{-2} jusqu'à 10^{-3} .

Pour les tubes témoins, on ajoute l'eau distillée stérile au lieu des extraits (T1), ainsi que deux autres témoins l'un ne contenant seulement, le milieu de culture (T2) et l'autre le solvant à la place de l'extrait (T3).

Dans des tubes contenant chacun 8 ml du bouillon nutritif (BN) stérile, on ajoute 1.5 ml de chaque dilution et 0.5 ml d'une culture bactérienne jeune.

Après incubation à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 heures pour les bactéries et à $30\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 heures pour les levures, on ensemence les souches en stries sur milieu solide. Après une deuxième incubation aux mêmes conditions que la première, on note le développement ou l'inhibition de chaque souche.

La gamme des concentrations de tous les extraits bruts pour évaluer l'activité antimicrobienne, est représentée dans les tableaux II.13 et II.14.

Tableau II.13 : Gamme des concentrations des extraits d'*Oudneya africana* R.Br. (LM, LA, FrM et FrA) utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Dilutions		SM 10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Volumes des extraits dans chacune des dilutions (μl)		1000	100	10
Concentrations des extraits dans chacune des dilutions (mg/ml)	FrM	13,8	1,38	0,138
	FrA	10,1	1,01	0,101
	LM	15	1,5	0,15
	LA	21,3	2,1	0,21
Concentrations des extraits dans le milieu ($\mu\text{g/ml}$)	FrM	2693,75	269,375	26,9375
	FA	1948,75	194,875	19,4875
	LM	3275	327,5	32,75
	LA	4131,25	413,125	41,3125

Tableau II.14 : Gamme des concentrations des extraits d'*Aristida pungens* L. (TM, TA, FM et FA) utilisés pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne

Dilutions		SM 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Volumes des extraits dans chacune des dilutions (µl)		1000	100	10
Concentrations des extraits dans chacune des dilutions (mg/ml)	TM	14.9	1.49	0.149
	TA	10.5	1.05	0.105
	FM	18	1.8	0.18
	FA	22.3	2.2	0.22
Concentrations des extraits dans le milieu (µg/ml)	TM	2673.75	279.375	27.9375
	TA	1968.75	196.875	19.6875
	FM	3375	337.5	33.75
	FA	4181.25	418.125	41.8125

VI.4.2- Détermination des intervalles des CMI par la méthode de contact direct

La CMI est définie comme étant la plus faible concentration en extrait pour laquelle, on n'observe pas de croissance visible à l'œil nu. Cette technique consiste à disperser l'extrait à des concentrations variables dans le milieu gélosé avant sa solidification.

Méthode utilisée

La solution mère (SM) a été préparée de la même façon que la méthode précédente. Dans des tubes contenant chacun 13.5 ml de milieu gélosé et encore en état de fusion, on ajoute aseptiquement 1.5 ml de la 'SM' ou des diverses dilutions (tableau II.15 et II.16)

Les boîtes témoins ont été préparées de la même manière que la méthode précédente. Après passage au vortex, on coule les suspensions dans des boîtes de pétri et on laisse refroidir. Des souches jeunes sont ensuiteensemencées (en stries pour les bactéries et les levures et en spots pour les moisissures) et incubées (les températures et les temps d'incubation sont déjà cités), après on note le développement ou l'inhibition de germe à diverses concentrations de l'extrait.

Tableau II.15 : Gamme de concentrations des extraits d'*Oudneya africana* R.Br. (FrM, FrA, LA et LA) utilisés pour la détermination des CMI

Dilutions		1/10	1/20	1/50	1/90	1/100
Volumes des extraits dans chacune des dilutions (µl)		1000	90	60	20	10
Concentrations des extraits dans chacune des dilutions (mg/ml)	FrM	13.823	6.9115	2.7646	1.5358	1.3823
	FrA	10.173	5.086	2.0346	1.1303	1.0173
	LA	21.39	10.695	4.278	2.3766	2.1319
	LM	15.013	7.5065	3.0026	1.6677	1.5013
Concentrations des extraits dans les solutions (µg/ml)	FrM	2673,75	1343.591	535.82	297.74	258.83
	FrA	1948.75	979.27	390.53	217.01	188.64
	LA	4131.25	2076.00	827.90	460.05	399.92
	LM	3275	1645.72	656.31	364.69	317.03

Tableau II.16 : Gamme de concentrations des extraits d'*Aristida pungens* L. (TM, TA, FA et FA) utilisés pour la détermination des CMI

Dilutions		1/10	1/20	1/50	1/90	1/100
Volumes des extraits dans chacune des dilutions (µl)		1000	90	60	20	10
Concentrations des extraits dans chacune des dilutions (mg/ml)	TM	14.923	7.4615	2.9846	1.6581	1.4923
	TA	10.53	5.265	2.106	1.17	1.053
	FA	22.355	11.1775	4.471	2.4838	2.2355
	FM	18.01	9.005	3.602	2.001	1.801
Concentrations des extraits dans les solutions (µg/ml)	TM	2793.75	1403.89	559.61	310.89	270.375
	TA	1968.75	989.32	394.53	219.23	190.58
	FA	4181.25	2095.78	838.31	465.71	418.125
	FM	3375.01	1695.98	676.35	375.83	326.71

Remarque

Les milieux de culture utilisés pour les différentes méthodes sont :

- Muller Hinton pour les bactéries.
- Sabouraud Dextrose Agar + chloramphénicol pour les levures.
- Sabouraud Dextrose Agar pour les moisissures.

VI.4.3- Préparation des inoculums

a) Bactéries

Les souches conservées dans la gélose nutritive (GN) inclinée à 4°C sont revivifiées dans du bouillon nutritif et incubées à 37±1°C pendant 18 à 24 heures. 0.1 ml de cette culture, est ajoutée à 10 ml de BHIB (Brain Heart Infusion Broth, Pronadisa Hispanalab, S.A.).

b) Levures

Les souches conservées dans la gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol à 4°C sont revivifiées dans du bouillon nutritif et incubées à 30±1°C pendant 24 à 48 heures. 0.1ml de cette culture est ajoutée à 10 ml d'eau physiologique stérile.

c) Moisissures

L'inoculum se présente sous forme d'une suspension de spores dans de l'eau physiologique stérile à 0,1% de Tween 80. L'inoculum utilisé pour tous les tests, est de l'ordre de 10⁶ à 10⁷ UFC/ml pour les bactéries et les levures et de 10⁸ à 10⁹ spores/ml pour les moisissures.



Résultats et Discussions

I- TESTS PHYTOCHIMIQUES

Les tests phytochimiques consistent à détecter les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par des réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés.

I.1- *LOUDNEYA AFRICANA* R.Br.

Les résultats obtenus sur les différents organes (racines (R), rameaux primaires (R1), rameaux secondaires (R2), rameaux tertiaires (R3), feuilles (L) et fruits (Fr)) sont résumés dans le tableau III.1.

Tableau III.1 : Les résultats des tests phytochimiques d'*Oudneya africana* R.Br.

Famille chimique	Racines (R)	Rameaux primaires (R1)	Rameaux secondaires (R2)	Rameaux tertiaires (R3)	Feuilles (L)	Fruit (Fr)
Alcaloïdes des sels	-	-	-	-	-	-
Stérols et stéroïdes	++	+	++	+	+++	+++
Flavonoïdes	+	++	+	++	+	+
Saponosides	+	+	+	+	+++	+++
Composés réducteurs	+	+	+	+	+	+
Acides gras	+	++	+	++	+	+
Emodols	-	-	-	-	-	-
Tanins	+	+++	++	+++	++	++

- : absence ;

+++ : Présence en forte quantité ;

+ : présence en faible quantité ;

++ : présence en quantité moyenne

L'analyse de ces résultats expérimentaux nous conduit aux conclusions suivantes:

- les flavonoïdes, les saponosides, les tanins, les stérols et les stéroïdes sont présents dans toutes les parties étudiées de la plante en quantités variables.

- la présence des stérols, des stéroïdes et des tanins en quantité importante a été confirmée respectivement par une réaction fortement positive avec le réactif de LIEBERMANN BURCHARDT en donnant une coloration violette et avec la solution diluée

de chlorure ferrique (FeCl_3 à 2%) en donnant une coloration bleue.

- les saponosides sont présents dans toutes les parties de la plante avec une dominance importante dans les feuilles (L) et les fruits (Fr).

- les flavonoïdes sont également présents dans toutes les parties de la plante avec une dominance importante dans les rameaux primaires (R1) et les rameaux secondaires (R2).

- les alcaloïdes sels, sont absents dans toutes les parties de la plante.

- la présence des composés réducteurs dans toutes les parties de la plante en quantité moyenne a été vérifiée par la liqueur de Fehling donnant un précipité rouge brique.

I.2- *ARISTIDA PUNGENS* L.

Les résultats obtenus sur les tiges (T) et les feuilles (F) d'*Aristida pungens* L. sont représentés dans le tableau III.2.

Tableau III.2 : Les résultats des tests phytochimiques d'*Aristida pungens* L.

Famille chimique	Tiges (T)	Feuilles (F)
Flavonoïdes	+	+
Tanins	+	+
Stérols et stéroïdes	+	+
Coumarines	+	+
Alcaloïdes	-	-
Anthracénosides	-	-
Anthocyanosides	-	-
Amidon	+	+
Emodols	-	-
Anthraquinones	-	-
Composés réducteurs	+	+
Huiles volatiles	-	-
Saponosides	+	+

+ : test positif ; - : test négatif

Les différentes familles existantes dans notre plante (tiges (T) et feuilles (F)) justifient son utilisation thérapeutique. En effet, la présence des tanins cathéchiques confirmée par la réaction positive avec une solution de chlorure ferrique donnant une coloration verte foncée, justifie l'utilisation d'*Aristida pungens* L. pour la cicatrisation des plaies.

D'autre part la présence des saponénines stéroïdiques, confirmée par la réaction de LIEBERMANN BURCHARDT, explique l'utilisation d'*Aristida pungens* L. par les nomades marocains pour la cicatrisation des plaies ^[32] et par certains citoyens d'Ouargla pour calmer les douleurs dentaires.

Les flavonoïdes, les tanins, les coumarines, l'amidon, les composés réducteurs, les stérols et les stéroïdes sont présents dans les deux parties de la plante, en quantités variables alors que les saponosides sont présents en faible quantité.

Les anthracénosides, les anthocyanosides, les anthraquinones, les émодols, les alcaloïdes, et les huiles volatiles sont totalement absents dans les deux parties de la plante ((T) et (F)).

II- EXTRACTION- PURIFICATION

II.1- RENDEMENTS DES EXTRAITS D'*ODUNEYA AFRICANA* R.Br. ET D'*ARISTIDA PUNGENS* L.

Protocol général d'extraction

A 50 g de drogue séchée et broyée, on ajoute 500 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt). La solution extractive est obtenue après agitation de 5 heures et filtration. Le marc est extrait à cinq reprises par 300 ml d'AcOEt. Les phases organiques sont réunies, séchées puis évaporées pour donner l'extrait d'AcOEt. Les mêmes opérations d'extraction par le méthanol (MeOH) ont été utilisées au marc récupéré précédemment, et les phases organiques sont réunies, séchées puis évaporées pour donner l'extrait du MeOH.

Les résidus obtenus sont conservés dans des flacons et gardés au frais. Les rendements des extraits de MeOH comme le montre les tableaux III.3 et III.4 sont plus élevés que ceux de l'AcOEt. Par ailleurs, le rendement des extraits des feuilles est plus élevé que celui des fruits et des tiges.

Tableau III.3 : Rendements des extraits d'*Oudneya africana* R.Br.

Extraits	Rendements (%)
FrM	3.73
FrA	1.09
LM	5.93
LA	1.83

Tableau III.4 : Rendements des extraits d'*Aristida pungens* L.

Extraits	Rendements (%)
TM	4.41
TA	1.03
FM	6.86
FA	1.65

II.2- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES FEUILLES ET DES FRUITS D'*OUEDNEYA AFRICANA* R.Br. (LA ET FrA)

II.2.1- Caractéristiques des composés isolés de LA

La masse de 6610 mg de l'extrait LA fractionnée par chromatographie sur colonne de silice (tableau II.1, partie expérimentale) nous a permis d'obtenir des fractions de polarités variables.

L'analyse des différentes données spectrales de RMN, d'IR, d'UV et de masse, ainsi que l'examen de la littérature nous ont permis d'établir la structure de nos composés.

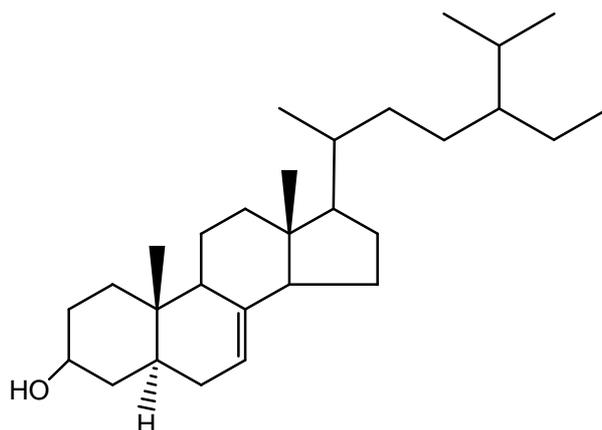
Nous avons isolé le composé **1** (stigmasténol) à partir de la fraction OA1B avec un rendement de 19.88 % (tableau II.2, partie expérimentale) et un Rf de 0.47 dans le système de solvants Heptane + AcOEt (80 : 20). Ce composé a été identifié par comparaison de nos données spectrales obtenues avec celles publiées. ^[212] En Infra-rouge, on observe une bande OH à 3619 cm⁻¹, des bandes C-H (2869 cm⁻¹, 2938 cm⁻¹, 2969 cm⁻¹) et une bande témoin de carbones insaturés à 1606 cm⁻¹.

Le spectre de RMN, nous a donné :

- un pic à 5.27 ppm correspondant à un proton éthylénique.
- un pic à 3.01 ppm correspondant au proton d'une fonction OH.
- des pics de 0.96 à 2.15 ppm correspondant aux CH₂ et CH₃ de la molécule.

Notons que le spectre de masse nous a permis de confirmer la proposition de structure de ce stérol (stigmasténol). En effet, les fragmentations du spectre du produit, correspondent à celles du spectre du stigmasténol.

m/z : 414, 399, 329, 314, 273, 255, 246, 299.

**1 (stigmastérol)**

Le composé **2** (β -sitostérol) a été isolé de la fraction OA1B avec un rendement de 17.25 % (tableau II.2, partie expérimentale) et un R_f de 0.32 dans le système de solvants Heptane + AcOEt (80 : 20).

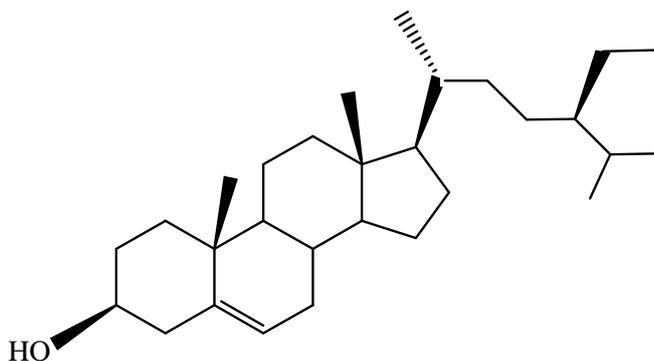
Le spectre de masse réalisé en IE du composé nous a montré un ion moléculaire M^+ de 414 g/mole.

Le spectre de RMN nous a indiqué la présence :

- d'un pic à 5.35 ppm correspondant à un proton éthylénique.
- d'un pic à 3.05 ppm correspondant au proton d'une fonction OH.
- des pics de 0.65 à 2.25 ppm correspondant aux CH_2 et CH_3 de la molécule.

Par comparaison du spectre obtenu, avec ceux donnés dans la littérature, nous avons identifié la molécule.

Par ailleurs nous avons effectué une chromatographie sur couche mince avec d'une part, la molécule dont la structure est recherchée, et d'autre part, avec la molécule dont les résultats en spectroscopies sont similaires. Nous avons obtenu deux taches identiques avec les mêmes $R_f = 0.31$ dans les mêmes conditions de solvants Heptane + AcOEt (80 : 20) nous permettant ainsi de confirmer notre hypothèse. La molécule est du β -sitostérol.

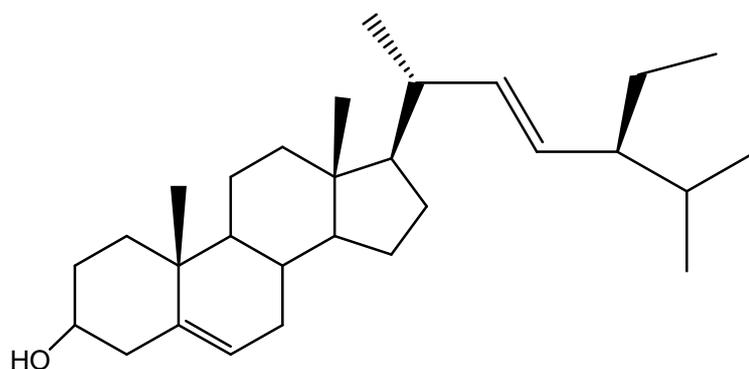
**2 (β -sitostérol)**

Nous avons isolé le composé **3** (stigmastérol) à partir de la fraction OA1F (tableau II.3, partie expérimentale) avec un rendement de 8.98 % dans le système de solvants Heptane + Acétone (65 : 5) et un Rf de 0.37.

Le spectre de masse IE nous a montré un pic M^+ à m/z 414 g/mole. La formule la plus probable est $C_{29}H_{48}O$ correspondant à celle d'un stigmastérol.

La RMN 1H nous a indiqué la présence de signaux correspondant aux protons éthyléniques à 5.37 ppm et 5.48 ppm, un signal à 3.25 ppm correspondant au proton de la fonction OH, et un signal de 0.96 ppm à 2.15 ppm correspondant à l'ensemble des protons CH_2 et CH_3 de la molécule.

Une recherche bibliographique nous a montré que les données précédentes, correspondent bien au stigmastérol. ^[213] Une chromatographie sur couche mince du produit standard (stigmastérol commercial) a été réalisée et nous a permis de déterminer de façon certaine la molécule.



3 (stigmastérol)

En raison des produits déjà connus dans la littérature, l'examen du spectre de RMN 1D et le spectre de masse pour ces trois composés isolés nous a suffi pour confirmer leur structure.

L'analyse des autres fractions (tableau II.3, partie expérimentale) révèle des mélanges complexes comprenant de nombreux produits, difficiles à isoler par les méthodes classiques.

II.2.2- Caractéristiques des composés isolés de FrA

Les mêmes produits ont été isolés à partir de l'extrait d'acétate d'éthyle des fruits FrA d'*Oudneya africana* R.Br. avec les rendements suivants :

Le stigmastérol a été obtenu avec un rendement de 18.53 %.

Le β -sitostérol a été obtenu avec un rendement de 16.97 %.

Le stigmastérol a été obtenu avec un rendement de 9.03 %.

De même, compte tenu de la difficulté de séparation des produits, certaines fractions n'ont pas été suffisamment purifiées, d'autres composés n'ont pas encore été identifiés.

II.3- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT DE METHANOL DES FEUILLES D'*OUADNEYA AFRICANA* R.Br. (LM)

La masse de 3220 mg de l'extrait LM fractionnée par chromatographie sur colonne de silice (tableau II.4 partie expérimentale) nous a donné des fractions de polarités variables. L'analyse des différentes données spectrales de RMN (1H, 13C, DEPT, HMBC), d'IR, d'UV et de masse, ainsi que l'examen de la littérature nous ont permis d'établir la structure de composés. Nous avons obtenu le composé **4** à partir des fractions OA10J et OA10I (voir partie expérimentale, p76 - 77) avec un rendement de 21.7 % et un Rf de 0.43 dans le système de solvants CH₂Cl₂ / MeOH (90 : 10). Les résultats de spectres de RMN 1H et 13C, du DEPT et du spectre HMBC sont donnés dans le tableau III.5 et III.6.

Tableau III.5 : Les données expérimentales de RMN 1H du 13C, du DEPT et du spectre HMBC du composé **4**

N° de C	DEPT	δ théorique (a) (en ppm)	δ observé (en ppm)	HMBC Corrélations 13C →1H
2	CH	79.1	79.8	2', 3, 4, 6
3	CH	66.8	67.4	4, 2
4	CH ₂	28.3	29.18	3, 2
5	Cq	156.7	157.18	6, 8, 4
6	CH	96.8	96.8	8
7	Cq	157.1	157.9	2, 4, 8, 6
8	CH	96.0	95.9	6
9	Cq	157.1	157.6	6, 8, 2, 4
10	Cq	100.3	100.0	8, 6, 3, 4
1'	Cq	131.8	132.2	2', 5', 6', 2, 3, 4
2'	CH	115.4	115.3	2, 6', 5'
3'	Cq	145.0	145.7	2', 5', 6', 2
4'	Cq	145.2	145.9	2', 5', 6'
5'	CH	116.4	115.8	2, 2', 5', 6'
6'	CH	119.6	119.4	2', 5', 2

(a) Référence : The Flavonoids Advances in research. J.B. HARBONNE and T. J. MABRY (1982, Chapman and Hall Ltd).

Le spectre de masse réalisé en FAB nous a donné un ion $MH^+ = 291$, soit une masse de 290 g/mole.

Le spectre UV présente deux pics d'absorption caractéristiques du chromophore des cycles benzéniques :

- $\varepsilon (\lambda = 277.4 \text{ nm}) = 4502 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- $\varepsilon (\lambda = 218.8 \text{ nm}) = 16109.5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

La RMN ^{13}C indique 15 carbones, et les valeurs d'intégrations du spectre RMN ^1H indiquent 9 protons. Pour compléter les données de la masse, on suppose la présence de 5 groupements hydroxyles et d'un oxygène, ce qui permet de proposer la formule brute suivante $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$.

Tableau III.6 : Les données expérimentales de RMN ^1H et du spectre de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ du composé **4**

N° de C	δ (en ppm)	COSY corrélations $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$	Constantes de couplage J (Hz)
4b	2.75 (dd)	4a, 3, 2	3
4a	2.88 (dd)	4b, 3, 2	18
3	4.2 (m)	4, 2	18
2	4.8 (s)	4, 3, 2', 6', 2'	4
8	5.93 (d)*	6	2 (méta)
6	5.95 (d)*	8	2 (méta)
6'	6.75 (m)*	5', 2', 2	
5'	6.8 (m)*	6', 2'	
2'	7 (d)*	2, 6'	2 (méta)

* δ caractéristiques des protons aromatiques

a) Calcul du nombre d'insaturation

Si la molécule était saturée, on aurait la formule brute $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$, soit 32 protons. Or, il n'y a que 14 protons, soit un défaut de 18 protons. Chaque proton compte pour une demi-insaturation. Il y a donc 9 insaturations.

b) RMN ^{13}C

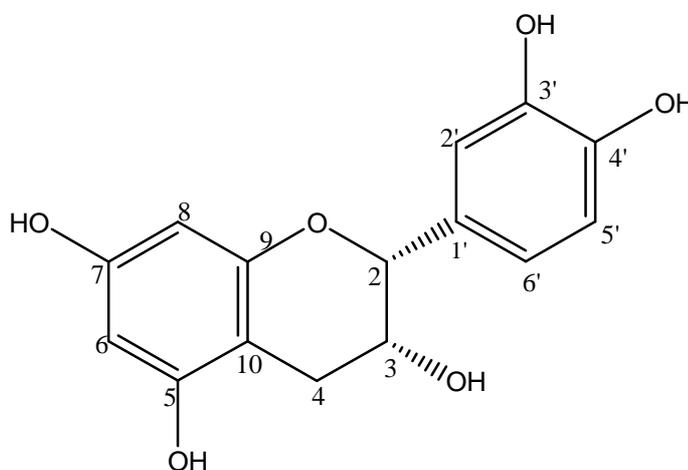
La RMN ^{13}C nous a révélé la présence :

- d'un groupe de 3C quaternaire autour de 157 ppm et d'un groupe de 2C quaternaire autour de 145 ppm, correspondant à priori à 5 carbones aromatiques substitués par un

oxygène (car fortement déblindés).

- de 3 CH vers 115 ppm appartenant à un cycle aromatique.
- de 2 CH autour de 96 ppm, pouvant être attribués à 2 CH aromatiques en position méta sur un autre cycle.
- de 2 CH à 67 et 79 ppm très déblindés pour des carbones primaires indiquant la présence de substituants oxygénés.

La présence de 9 insaturations nous laissent supposer d'une part, l'existence d'un cycle et de deux cycles aromatiques (un cycle compte pour une insaturation et un cycle aromatique compte pour 4 insaturations) et les hypothèses développées précédemment nous permettent d'autre part, de proposer la structure du composé **4** (épicatéchine).



4 (épicatéchine)

c) RMN ¹H

La RMN ¹H nous a indiqué :

- la présence de 2 doublets dédoublés à 2.8 ppm qui intègrent pour 2 protons. Ces 2 protons sont liés entre eux par une forte constante de couplage (18 Hz). Ce fort couplage de type géminale indique qu'il s'agit de protons portés par le carbone secondaire C4. Chacun de ces protons couple aussi avec son voisin commun H3 (3 et 4 Hz). Le spectre COSY nous a montré également un couplage du proton en 3 avec celui en 2. Ceci permet de proposer l'enchaînement suivant :

- la faible constante de couplage entre les protons 2 et 3, montre une stéréochimie cis et permet de différencier la cathéchine (trans) de l'épicatéchine (cis).

- on constate l'existence de deux types de protons aromatiques : un groupe de trois protons aromatiques vers 7 ppm (H2', H5', H6') d'une part et un groupe de deux protons aromatiques d'autre part vers 6 ppm (H6 et H8). Ceci permet de confirmer la présence de deux cycles aromatiques.

- le proton aromatique en 2' apparaît sous la forme d'un doublet fin (2Hz, caractéristique d'un couplage méta avec le proton en 6'). Il n'a donc pas de voisin direct. Le spectre COSY met toutefois en évidence un autre couplage plus lointain avec H2.

- les protons aromatiques H6 et H8 sont responsables de deux doublets (un à 5.93 ppm et l'autre à 5.95 ppm). Leur constante de couplage (2 Hz) indique qu'ils sont en position méta.

On remarque bien, que tous les couplages mis en évidence par le spectre COSY sont en accord avec la structure de l'épicathéchine.

d) spectre 2D HMBC

Le spectre HMBC nous a détecté les corrélations entre un carbone et ses protons éloignés. De plus les corrélations longues distances nous ont fournis des renseignements concernant les carbones quaternaires. Ainsi, le carbone quaternaire en 1' corrèle avec les protons benzéniques 2', 5' et 6' et les protons 2 et 3 du cycle voisin.

D'autre part, il existe des corrélations entre les carbones C9 et C10 et leurs protons voisins portés par les carbones C6 et C8. Cette information permet donc d'attribuer les signaux à 5.9 ppm de la RMN 1H aux protons aromatiques 6 et 8.

Le signal du carbone secondaire (à 28.5 ppm) permet d'identifier les signaux des protons 2 et 3 car il existe des corrélations longues distances entre C4, H2 et H3.

Par ailleurs, le composé **5** a été isolé des fractions OA10G et OA10H (voir partie expérimentale, p.77) avec un rendement de 22.2 % et un Rf de 0.37 dans le système de solvants CH₂Cl₂ / MeOH (90 : 10).

Les résultats de spectres de RMN 1H et 13C, du COSY 1H/1H et du DEPT sont donnés dans le tableau III.7.

Le spectre UV présente deux fortes absorptions comparables à celles de l'épicatéchine :

$$- \varepsilon (\lambda = 272.4 \text{ nm}) = 3020 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

$$- \varepsilon (\lambda = 224.0 \text{ nm}) = 22330 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

Tableau III.7 : Les données expérimentales de RMN 1H et 13C, du COSY 1H/1H et du DEPT du composé **5**

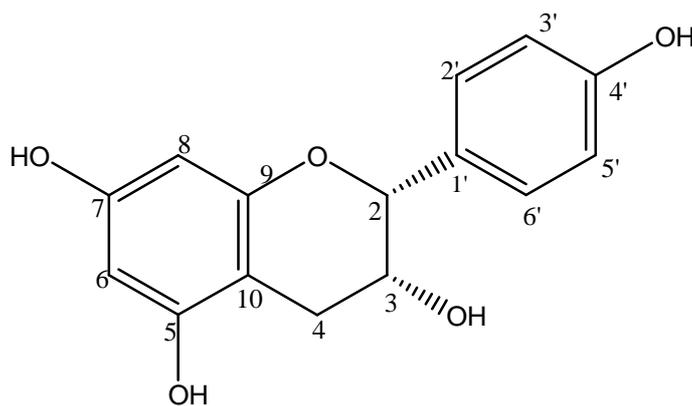
N° de C Ou H lié	RMN 13C δ en ppm	DEPT	RMN 1H δ en ppm, J en Hz	COSY Couplage 1H \rightarrow 1H
2	79.8	CH	4.8 (d)	4a, 4b, 3, 6'
3	67.4	CH	4.2 (m)	4a, 4b, 2
4a	29.3	CH ₂	2.7 (dd, 4 et 17 Hz)	4b, 2, 3
4b			2.9 (dd, 3 et 17 Hz)	
5	157.4	Cq		
6	96.4	CH	5.9 (dd, 2 Hz)	
7	157.6	Cq		
8	95.9	CH	5.9 (dd, 2 Hz)	
9	157.8	Cq		
10	100.1	Cq		
1'	131.6	Cq		
2'	129.2	CH	7.3 (d, 9 Hz)	2', 6'
3'	115.7	CH	6.8 (d, 9 Hz)	3', 5'
4'	157.9	Cq		
5'	115.7	CH	6.8 (d, 9 Hz)	3', 5'
6'	129.2	CH	7.3 (d, 9 Hz)	6', 2'

a) RMN 1H :

Le spectre RMN 1H a le même aspect que celui du composé **4**, cependant nous avons remarqué deux différences notables :

- la disparition du multiplet à 6.8 ppm.
- la présence d'un système AB, sous forme de deux doublets (un à 7.3 ppm et l'autre à 6.8 ppm avec une constante de couplage de 9 Hz) intégrant 2 fois pour 2 protons. Ceci est caractéristique d'un groupement phényle disubstitué en position para.

Ces résultats nous ont conduit à l'hypothèse de structure connue dans la littérature sous le nom d'**épiatzéléchine**. Cette structure correspond à celle du composé **4**, la différence réside dans l'absence d'hydroxyle en **3'**. Les protons **2'** et **6'** et les protons **3'** et **5'** sont équivalents. La faible constante de couplage entre les protons H2 et H3 est en faveur d'une stéréochimie cis.

**5** (épiafzéléchine)**b) RMN 13C**

Le spectre de RMN 13C nous a permis de dénombrer 15 carbones (13 signaux dont deux correspondent à deux carbones). Par rapport au spectre de l'épicaéthéchine, il manque un carbone quaternaire au profit d'un carbone tertiaire. Cela nous a confirmé l'hypothèse de la substitution de l'hydroxyle par un hydrogène en 3'. Cette substitution provoque un blindage du carbone correspondant (il passe de 145 ppm à 129 ppm). Tous ces faits nous ont permis par comparaison avec les données de la littérature, de proposer la structure d'épiafzéléchine.

II.4- FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT D'ACETATE D'ETHYLE DES TIGES ET DES FEUILLES D'ARISTIDA PUNGENS L. (TA ET FA)

II.4.1- Caractéristiques des composés isolés de TA

La masse de 2000 mg de l'extrait TA fractionnée par chromatographie sur colonne de silice (tableau II.6, partie expérimentale), nous a donné 6 fractions de polarités variables.

L'analyse des différentes données spectrales de RMN (1H, 13C), d'IR, de masse, ainsi que l'examen de la littérature nous ont permis d'établir la structure de différents composés.

Nous avons isolé les composés **6** et **7** à partir de la fraction AP3F (voir partie expérimentale, p.79 - 80) avec respectivement des rendements de 35.69 % et 40.28 % et un Rf de 0.32 et 0.41 dans le système de solvants Hexane / CH₂Cl₂ (70 : 30). Les résultats de spectres de RMN 1H et 13C du composé **6** sont donnés dans le tableau III.8.

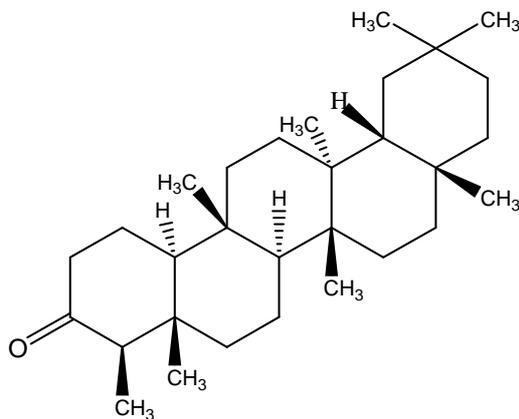
Le spectre de masse réalisé en IE du composé **6** nous a révélé un ion moléculaire M⁺ de 426 g/mole et des fractions M/z : 341, 303, 283, 273, 259, 246, 232, 218, 205, 191, 189, 163, 149, 123, 109, 95, 69, 55.

Le spectre IR (KBr) nous a donné les bandes caractéristiques suivantes en cm⁻¹ : 2946, 2882, 2869, 1719, 1464, 1385, 1359.

Tableau III.8 : Les données expérimentales de RMN ¹H et du ¹³C du composé **6**

Position du proton	¹ H-RMN	¹³ C-RMN
1	1.95, 1.71 (ddd)	22.3 (t)
2	2.3, 2.27 (ddd)	41.5 (t)
3	-	213.2 (s)
4	2.25 (q)	58.2 (d)
5	-	42.1 (s)
6	1.73, 1128 (d)	41.3
7	1.49, 1.36 (m)	18.2 (t)
8	1.38 (dd)	53.1 (d)
9	-	37.4 (s)
10	1.53 (m)	59.4 (d)
11	1.45, 1.26 (m)	35.6 (t)
12	1.33, 1.33 (m)	30.5 (t)
13	-	39.7 (s)
14	-	38.3 (s)
15	1.47, 1.27 (m)	32.4 (t)
16	1.58, 1.35 (m)	36.0 (t)
17	-	30.0 (s)
18	1.56 (m)	42.8 (d)
19	1.37, 1.21 (m)	35.3 (t)
20	-	28.1 (s)
21	1.50, 1.31 (m)	32.7 (t)
22	1.50, 0.94 (m)	39.2 (t)
23	0.88 (d)	7.2 (q)
24	0.71 (s)	15.0 (q)
25	0.86 (s)	17.9 (q)
26	1.0 (s)	20.2 (q)
27	1.04 (s)	18.6 (q)
28	1.17 (s)	32.1 (q)
29	0.99 (s)	35.7 (q)
30	0.94 (s)	32.8 (q)

Les résultats obtenus nous ont conduit à l'hypothèse de structure connue dans la littérature sous le nom de fridéline.



6 fridéline

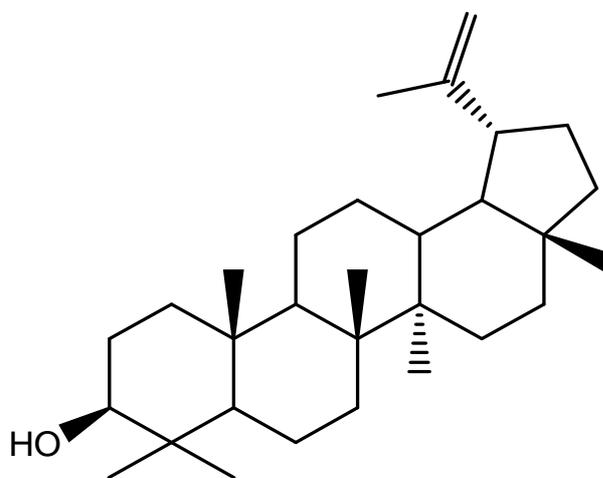
En ce qui concerne le composé **7**, les résultats spectraux sont comme suit :

Le spectre de masse réalisé en IE du composé nous a détecté un ion moléculaire M^+ de 426 g/mole.

Le spectre de RMN nous a indiqué la présence :

- d'un pic à 4.64 et à 4.87 ppm correspondants aux protons éthyléniques.
- d'un pic à 3.15 ppm correspondant au proton d'une fonction OH.
- des pics de 0.83 à 1.64 ppm correspondant aux CH_2 et CH_3 de la molécule.

Par ailleurs nous avons effectué une chromatographie sur couche mince avec d'une part, la molécule dont la structure est recherchée, et d'autre part, avec la molécule dont les résultats en spectroscopies sont similaires. Nous avons obtenu deux taches identiques avec les mêmes $R_f = 0.41$ dans les mêmes conditions de solvants Hexane / CH_2Cl_2 (70 : 30) nous permettant ainsi de confirmer notre hypothèse. La molécule est du lupéol.



7 lupéol

II.4.2- Caractéristiques des composés isolés de FA

Les mêmes composés sont isolés à partir de l'extrait d'AcOEt des feuilles d'*Aristida pungens* L. avec pratiquement les mêmes rendements.

- la fridéline a été obtenue avec un rendement de 35.01 %.
- le lupéol a été obtenu avec un rendement 39.87 %.

L'analyse des autres fractions nous a révélé aussi des mélanges complexes comprenant de nombreux produits difficiles à isoler par les méthodes de séparation classiques.

En conclusion, il est à noter que, les composés analysés et identifiés, ont été isolés pour la première fois dans cette étude pour ces deux plantes à savoir : *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L.

III- DOSAGE DES METAUX

III.1- POURCENTAGE DE LA MATIERE MINERALE

Nous avons déterminé la teneur des éléments minéraux en pourcentage dans les différentes parties des deux plantes, *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. après la calcination en utilisant la formule suivante :

$$\% = \frac{M_c}{M_s}$$

Mc : matière sèche après calcination

Ms : matière sèche avant calcination

Les résultats obtenus sont représentés dans les tableaux III.10 et III.11.

Tableau III.9 : Pourcentage de matières minérales dans les différentes parties d'*Oudneya africana* R.Br.

Organe	Partie minérale (%)
Racine	2.9
Rameaux primaires (R1)	2.7
Rameaux secondaires (R2)	4.9
Rameaux tertiaires (R3)	5.4
Feuilles (L)	13.6

Tableau III.10: Pourcentage de matières minérales dans les différentes parties d'*Aristida pungens* L.

Organe	Partie minérale (%)
T	5.74
Nœud (N)	1.21
Gaine (G)	5.94
Feuille (F)	5.19

Selon ces résultats, on note que, la matière minérale est plus concentrée dans :

- les feuilles, que dans les autres organes dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.
- la gaine et la tige que dans les autres organes dans le cas d'*Aristida pungens* L.

III.2- CONCENTRATION DES METAUX LOURDS DANS *LOUDNEYA AFRICANA* R.Br. ET *ARISTIDA PUNGENS* L.

Pour obtenir une teneur véritablement 'totale' du métal, on doit dissoudre toutes les formes de l'élément. Pour cela, plusieurs extractants exposés dans la littérature, sont considérés comme donnant des teneurs 'totales'. Ce sont l'acide fluorhydrique, l'acide nitrique, l'acide chlorhydrique, ou une combinaison de plusieurs acides (eau régale, réactif, triacide).

Les résultats de la spectroscopie d'absorption atomique (SAA) des solutions préparées par attaque acide (HNO₃, HCl et eau régale) sont indiqués respectivement dans les tableaux III.11, III.12 et III.13 dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. et dans les tableaux III.14, III.15 et III.16 dans le cas d'*Aristida pungens* L. Les métaux dosés sont Cu, Co, Ni, Pb, Cd, Zn et Fe.

Tableau III.11 : Concentration des métaux dans les différentes parties d'*Oudneya africana* R.Br. (extraction avec HNO₃)

Métal	Cu	Co	Ni	Pb	Cd	Zn	Fe
Racine	1.873	0.6098	0.261	3.0277	0.160	16.235	9.134
R1	0.913	0.829	0.389	15.793	0.190	3.151	32.289
R2	2.115	1.183	0.146	2.104	0.283	6.689	30.610
R3	5.683	2.184	1.437	6.863	1.437	11.013	105.552
L	20.912	9.0983	12.968	56.423	5.568	173.140	244.229

Tableau III.12 : Concentration des métaux dans les différentes parties d'*Oudneya africana* R.Br. (extraction avec HCl)

Métal	Cu	Co	Ni	Pb	Cd	Zn	Fe
Racine	15.777	0.588	1.677	4.973	0.4860	20.693	301.464
R1	2.810	0.527	0.500	6.100	0.033	8.275	47.340
R2	8.176	0	2.146	8.773	0.450	9.945	62.6126
R3	5.886	0.4880	1.654	12.465	0.963	53.236	265.272
L	7.501	2.308	10.251	20.774	0.373	42.430	184.691

Tableau III.13 : Concentration des métaux dans les différentes parties d'*Oudneya africana* R.Br. (extraction avec eau régale)

Métal	Cu	Co	Ni	Pb	Cd	Zn	Fe
Racine	4.377	0	0.520	0	0.064	3.831	6.566
R1	5.061	0.024	0	6.07	0.067	2.880	4.4345
R2	5.245	2.701	1.821	14.5531	0.890	25.125	74.327
R3	14.635	5.534	76.131	13.170	2.401	67.817	835.693
L	28.531	2.417	15.020	84.601	0.489	16.676	90.358

Tableau III.14 : Concentration des métaux dans les différentes parties d'*Aristida pungens* L. (extraction avec HNO₃)

Métal	Cu	Co	Ni	Pb	Cd	Zn	Fe
T	81.07	5.37	43.50	9.99	1.72	95.00	305.19
N	74.29	00	94.12	0	20.49	124.33	394.10
G	31.59	5.13	40.47	0	0.59	60.13	160.88
F	25.53	3.57	35.24	8.85	0	9.11	6.62

Tableau III.15 : Concentration des métaux dans les différentes parties d'*Aristida pungens* L. (extraction avec HCl)

Métal	Cu	Co	Ni	Pb	Cd	Zn	Fe
T	84.72	6.75	43.64	7.29	5.04	84.72	292.32
N	51.31	18.80	86.36	2.06	28.20	12.13	60.28
G	24.31	5.22	41.92	0	1.78	17.81	22.30
F	20.14	17.60	38.45	12.58	2.17	10.35	51.60

Tableau III.16 : Concentration des métaux dans les différentes parties d'*Aristida pungens* L. (extraction avec eau régale)

Métal	Cu	Co	Ni	Pb	Cd	Zn	Fe
T	52.18	10.93	22.71	52.72	0.34	42.87	205.42
N	59.37	0	44.63	16.49	2.42	34.63	784.20
G	32.21	0	18.70	28.77	0.47	18.38	84.86
F	16.18	0	0	28.09	0.23	17.14	300.62

Vu la différence entre les résultats obtenus par les trois extractants, il semble bien que ces derniers ne soient pas capables d'extraire de l'échantillon, la totalité du métal et on ne peut donc pas estimer rigoureusement la teneur des métaux. Ainsi, pour pouvoir obtenir une teneur véritablement 'totale', on doit dissoudre toutes les formes assimilables de l'élément.

En effet, les plantes prélèvent majoritairement les éléments traces par les racines via la solution du sol. Ce prélèvement racinaire se fait sous forme ionique pour certains métaux (Cd, Zn), ^[214] sous forme de complexes anioniques (Cd) ^[215] et sous forme de complexes organiques pour d'autres (Pb, Fe). ^[216]

La quantification de ces formes assimilables nécessite des études de spéciation en solution. La notion de spéciation est définie comme la répartition et la quantification des différentes formes chimiques de l'élément dans le sol qui réunies, donnent sa concentration totale. La spéciation contribue à définir la mobilité des éléments traces et permet donc, d'établir des perspectives de comportements et d'évolution des éléments traces en fonction des conditions du milieu et de leur modification.

Malgré ces incertitudes, il est possible d'évaluer dans notre cas le pouvoir d'extraction

de chaque solution acide utilisée pour chaque métal dosé. Les résultats d'extraction de chaque métal par les trois solutions acides sont représentés sous forme d'histogrammes par les figures 1-7 dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. et les figures 8-17 dans le cas d'*Aristida pungens* L.

a) *Oudneya africana* R.Br.

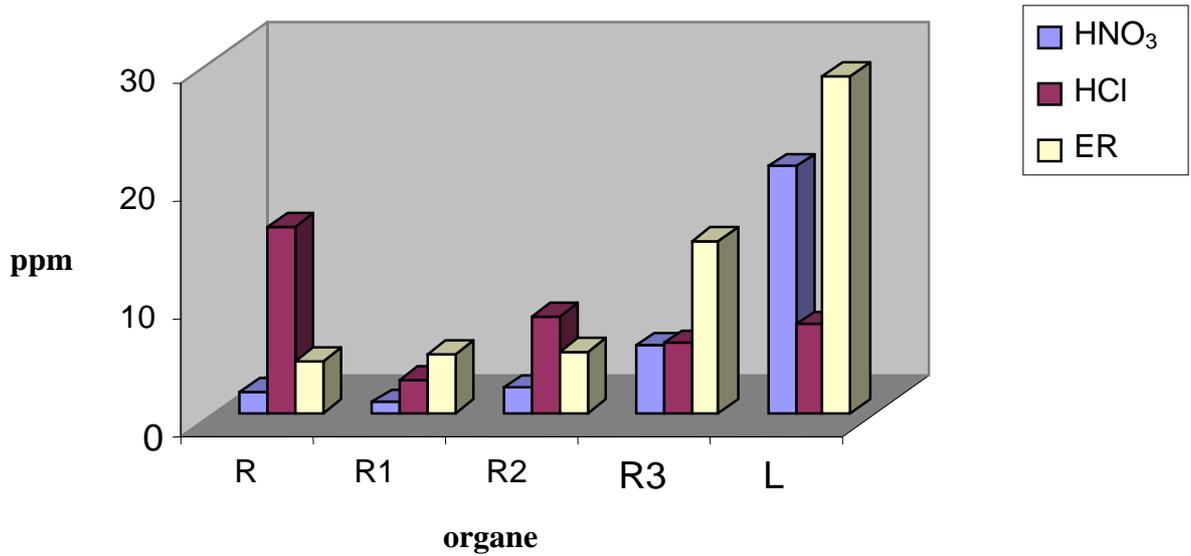


Figure 1 : Concentration de Cu (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

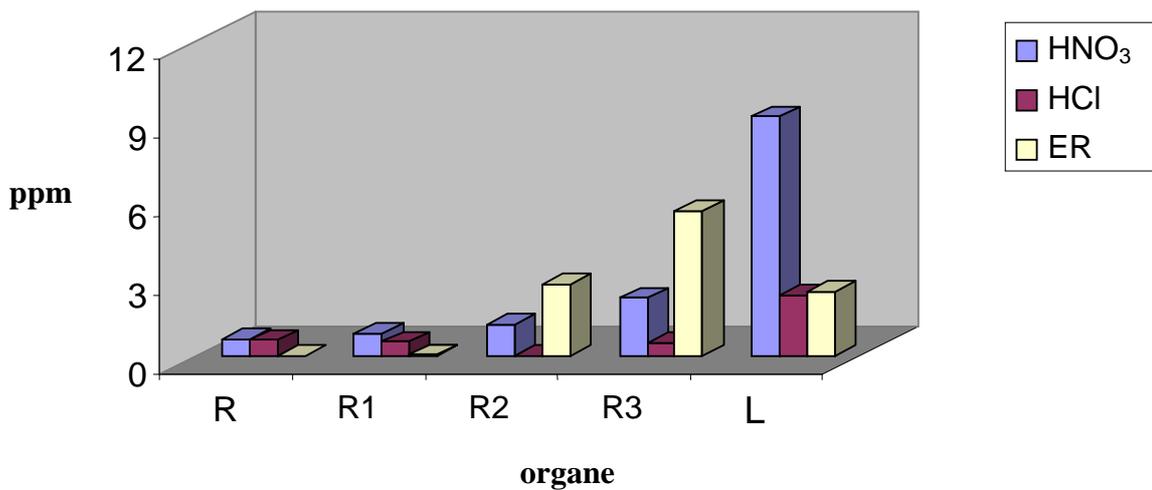


Figure 2 : Concentration de Co (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

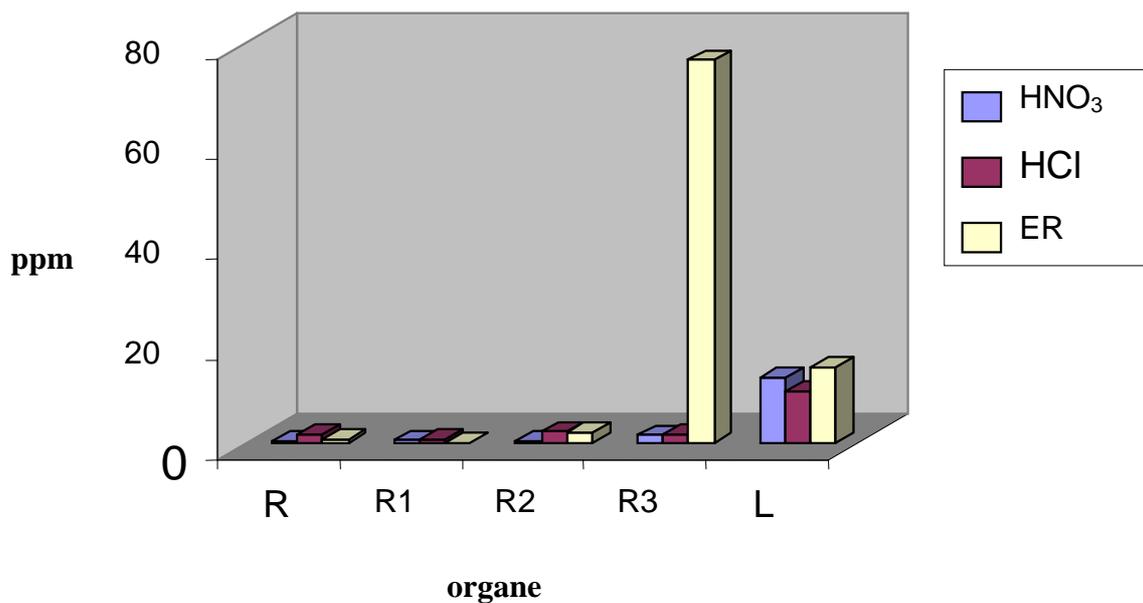


Figure 3: Concentration de Ni (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

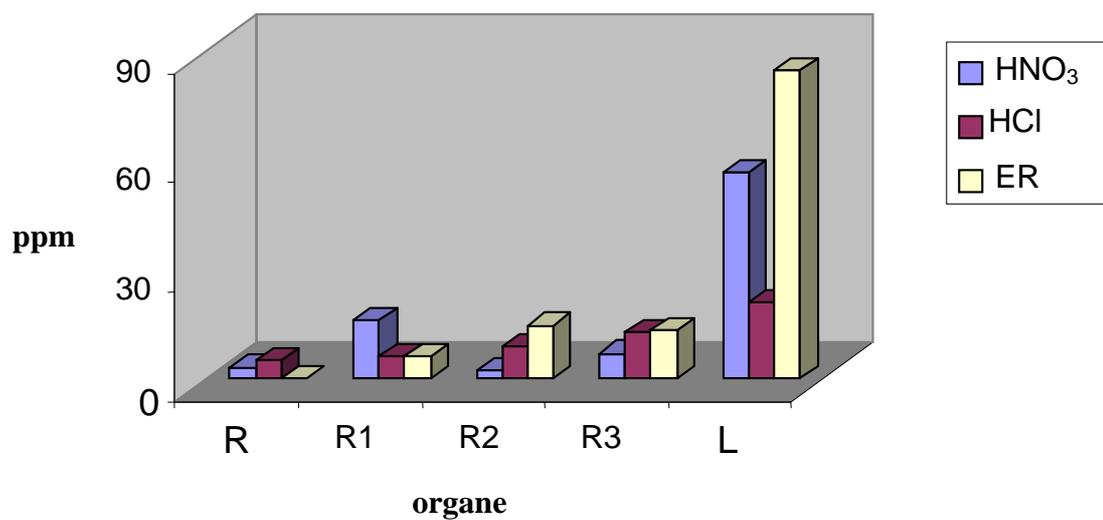


Figure 4 : Concentration de Pb (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

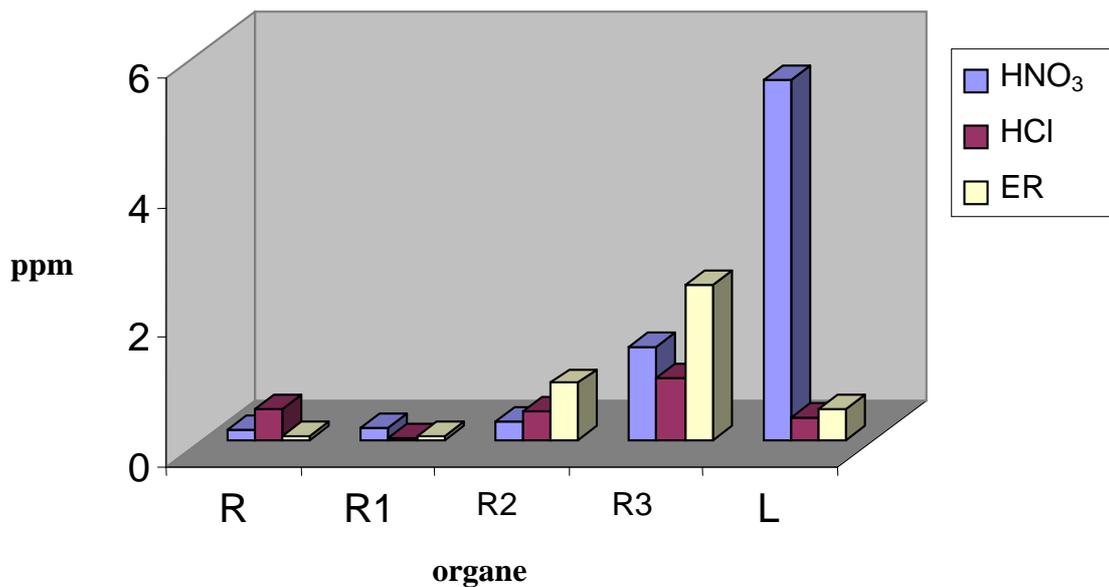


Figure 5 : Concentration de Cd (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

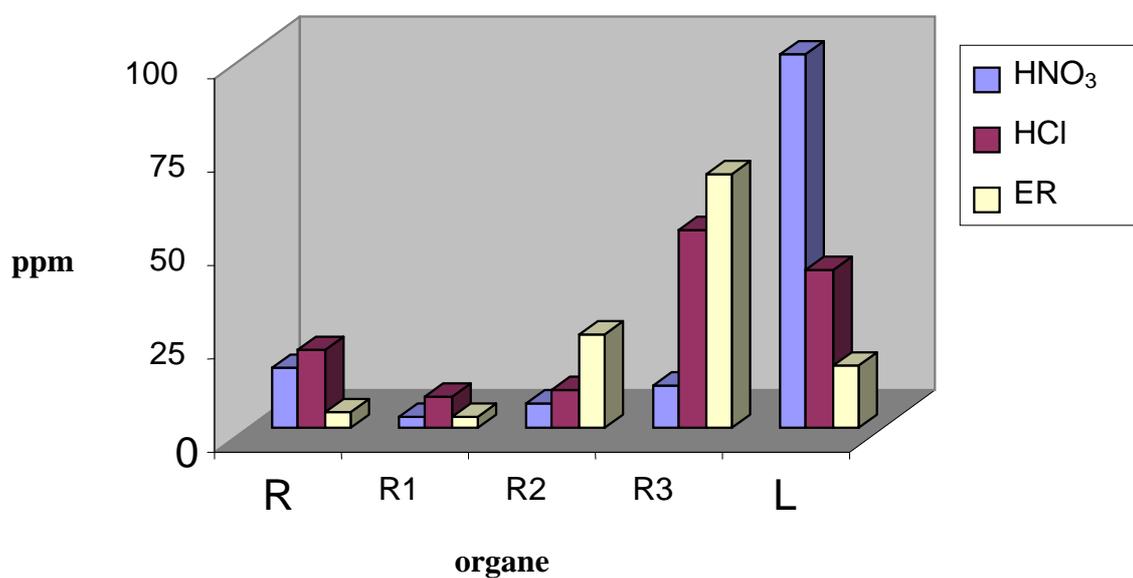


Figure 6 : Concentration de Zn (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

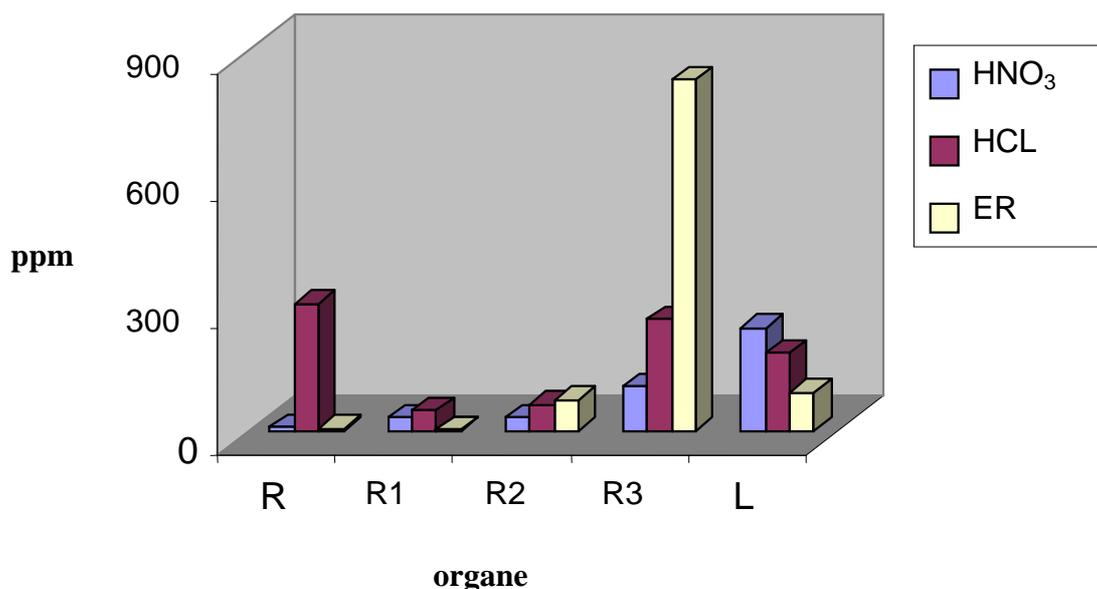


Figure7: Concentration de Fe (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

Il ressort de ces histogrammes d'une part que :

- l'eau régale extrait mieux le Cu, le Ni, le Pb et le Fe.
- le HNO₃ extrait mieux le Cd, Co, et le Zn.

Ainsi, les teneurs maximales observées des métaux dosés dans *Oudneya africana* R.Br. sont de 28.53 ppm de Cu, de 9.09 ppm de Co, de 76.13 ppm de Ni, de 84.60 ppm de Pb, de 5.56 ppm de Cd, de 173.14 ppm de Zn et de 835.69 ppm de Fe.

D'autre part, on remarque que la concentration des métaux lourds varie d'un organe à l'autre dans la plante. En effet, le Cd, le Zn, le Co et le Pb se fixent préférentiellement dans les feuilles et les rameaux tertiaires. Le Ni et le Fe se concentrent dans les rameaux tertiaires. Contrairement aux autres métaux étudiés, le Cu se répartit dans tous les organes de la plante.

b) *Aristida pungens* L.

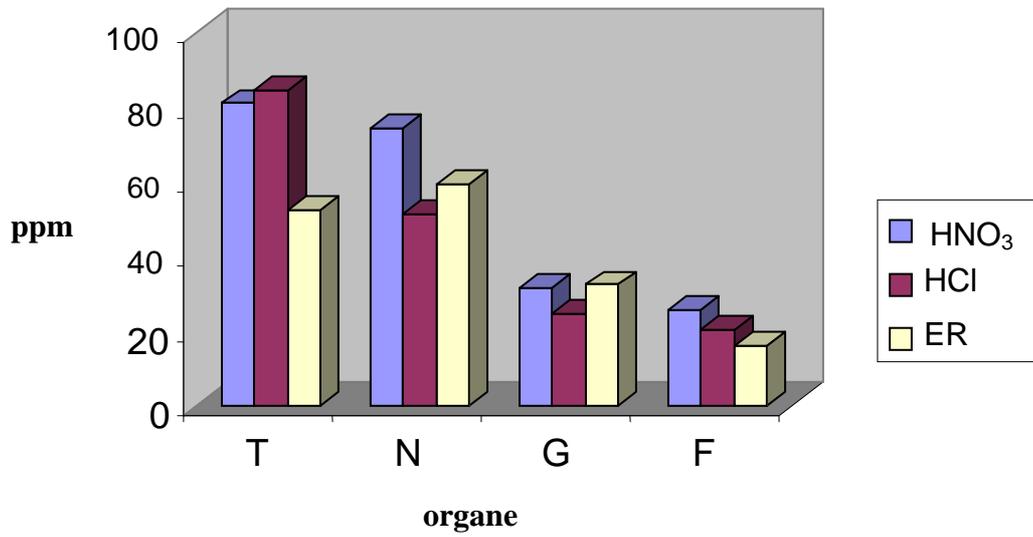


Figure 8: Concentration de Cu (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

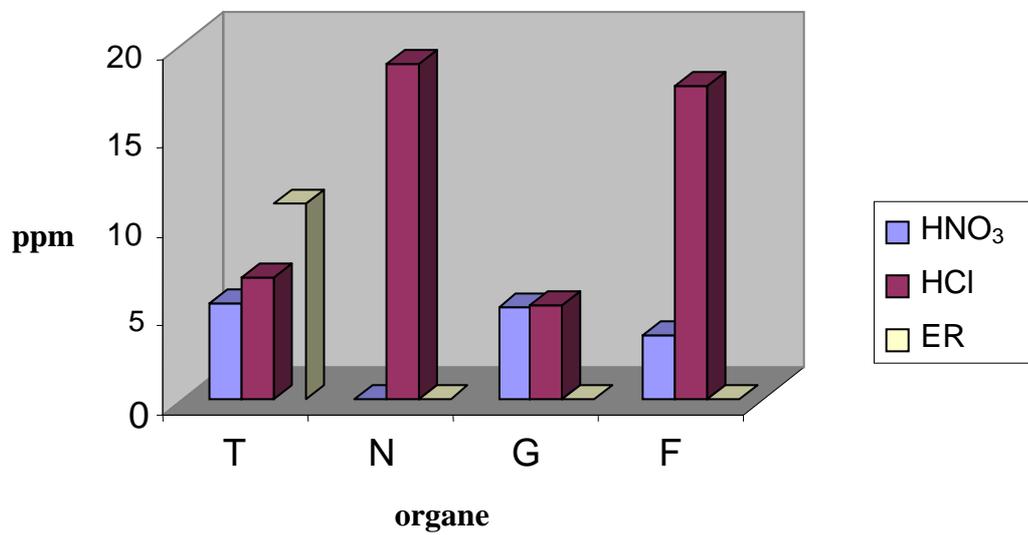


Figure 9: Concentration de Co (extraction par HNO₃, HCl et eau régale (ER))

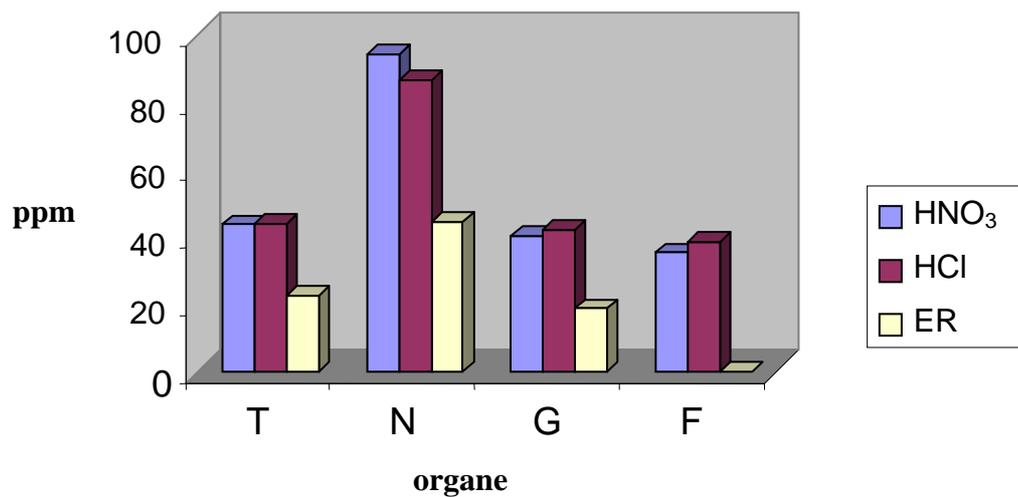


Figure10 : Concentration de Ni (extraction par HNO₃, HCl et eau régale)

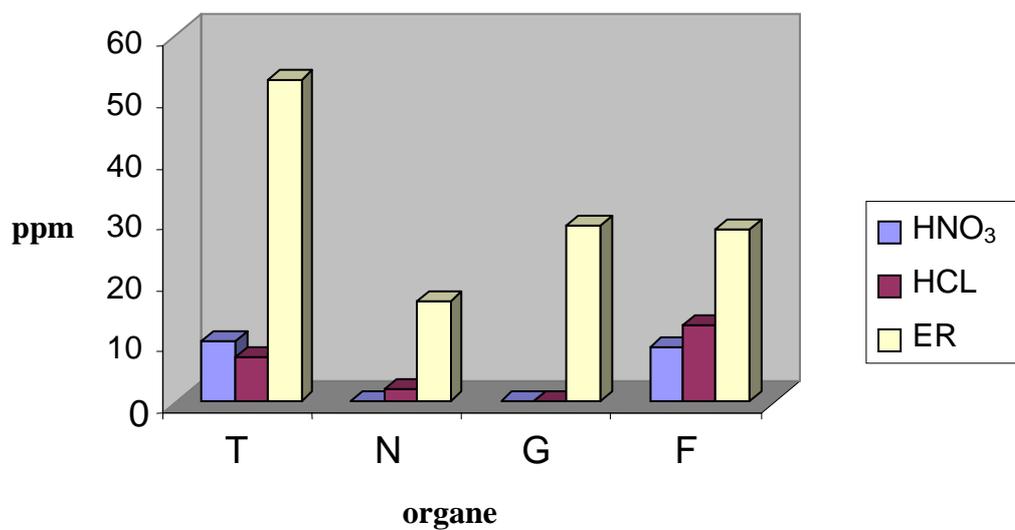


Figure 11: Concentration de Pb (extraction par HNO₃, HCl et eau régale)

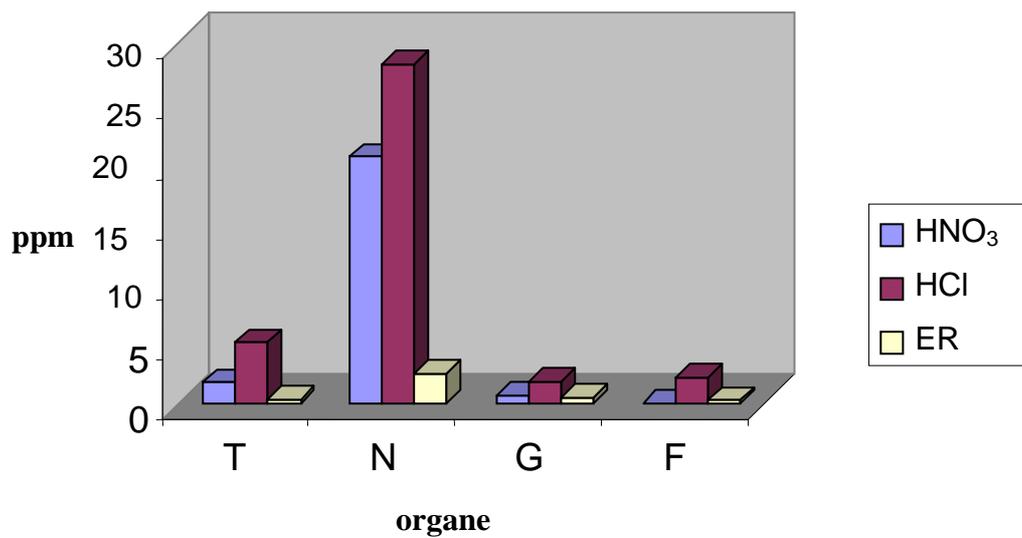


Figure12 : Concentration de Cd (extraction par HNO₃, HCl et eau régale)

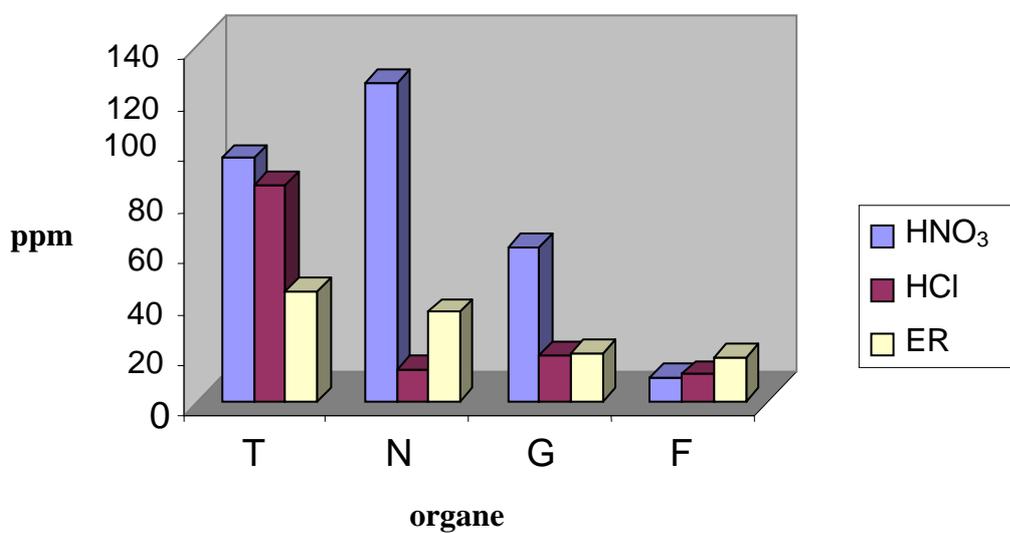


Figure13 : Concentration de Zn (extraction par HNO₃, HCl et eau régale)

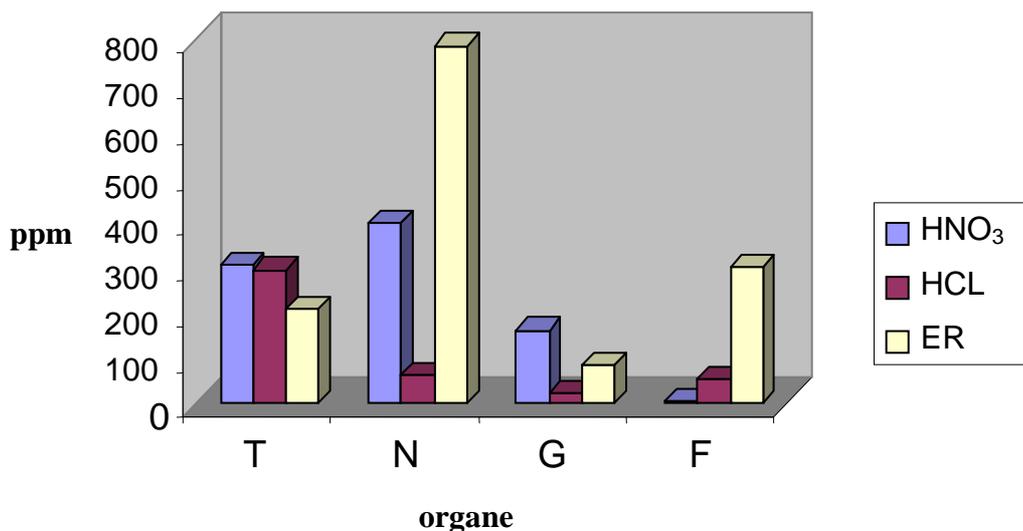


Figure14 : Concentration de Fe (extraction par HNO₃, HCl et eau régale)

Selon ces histogrammes, on remarque dans le cas d'*Aristida pungens* L. qu'un métal dans un organe donné, peut mieux être extrait par l'une ou l'autre solution acide.

- Dans le cas du Cu, on constate que selon l'organe :

- Le HCl est capable d'extraire mieux le Cu dans les tiges.
- Le HNO₃ est capable d'extraire mieux le Cu dans les nœuds et les tiges.
- L'eau régale est capable d'extraire mieux le Cu dans les gaines.

- Dans le cas du Ni, on remarque que selon l'organe :

- Le HCl est capable d'extraire mieux le Ni dans les tiges, les feuilles et les gaines.
- Le HNO₃ est capable d'extraire mieux le Ni dans les nœuds.

D'autre part:

- Le HNO₃ est capable d'extraire mieux le Zn.

- Le HCl est capable d'extraire mieux le Cd et le Co.

- L'eau régale est capable d'extraire mieux le Pb.

De même que précédemment, la concentration des métaux lourds varie d'un organe à un autre de la plante.

- Le Zn et le Ni se répartissent dans toute la plante, mais ils sont plus concentrés dans les nœuds.

- Le Cu se répartit dans toute la plante, mais se concentre plus dans les tiges et les nœuds.

- Le Pb se répartit dans toute la plante, mais se concentre plus dans les tiges.
- Le Co se répartit dans toute la plante.
- Le Cd se concentre plus principalement dans les nœuds.

Toutefois, les valeurs optimales obtenues des métaux dosés dans le cas d'*Aristida pungens* L. sont de 84.72 ppm de Cu, de 18.80 ppm de Co, de 94.12 ppm de Ni, de 52.72 ppm de Pb, de 28.20 ppm de Cd, de 124.33 ppm de Zn et de 784.20 ppm de Fe.

Les incertitudes obtenues par les différents extractants font qu'il est difficile de comparer nos valeurs obtenues avec celles données dans la littérature, car elles sont obtenues avec des méthodes d'extraction trop différentes.

Cependant, vu les résultats significatifs obtenus, on peut tout de même les comparer avec ceux de la littérature pour les plantes en général et fourragères en particulier (tableaux I.3 et I.4 ; partie théorique).

a) Résultats d'*Oudneya africana* R.Br.

- Cu : la concentration en Cu est de 28.53 ppm. Cette valeur s'échelonne dans le seuil de toxicité ([20-200 ppm] pour les plantes en général et [25-40 ppm] pour les plantes fourragères).

- Ni : la concentration en Ni est de 76.13 ppm. Cette valeur s'échelonne également dans le seuil de toxicité ([10-100 ppm] pour les plantes en général et [50-100 ppm] pour les plantes fourragères).

- Cd : la concentration en Cd est de 5.56 ppm. Cette valeur est au delà du seuil de toxicité pour les plantes en général [1 ppm] et s'échelonne dans le seuil de toxicité des plantes fourragères [5-700 ppm].

- Pb : la concentration en Pb est très supérieure (84.60 ppm) aux seuils des plantes [8 ppm].

- Fe : la concentration en Fe est de 835.69 ppm. Cette valeur s'échelonne dans le seuil de toxicité [100-1000 ppm] pour les plantes en général.

Quant aux autres métaux (Co et Zn), ils dépassent largement les teneurs normales dans les plantes.

Ainsi, *Oudneya africana* R.Br. accumule les métaux.

b) Résultats d'*Aristida pungens* L.

- Cu : la concentration en Cu est de 84.72 ppm. Cette valeur est largement supérieure

au seuil de toxicité [25-40 ppm] pour les plantes fourragères et s'échelonne dans le seuil de toxicité [20-200 ppm] pour les plantes en général.

- Co : la concentration est de 18.80 ppm. Cette valeur est au dessous du seuil de toxicité [25-100 ppm] pour les plantes fourragères et s'échelonne dans le seuil de toxicité [15-50 ppm] pour les plantes en général.

- Ni : la concentration est de 94.12 ppm. Cette valeur s'échelonne dans le seuil de toxicité des plantes ([10-100 ppm] pour les plantes en général et [50-100 ppm] pour les plantes fourragères).

- Pb : la concentration en Pb (52.72 ppm) est très supérieure aux seuils de toxicité des plantes [8 ppm].

- Cd : la concentration en Cd est de 28.20 ppm. Cette valeur est largement au dessus du seuil de toxicité pour les plantes en général [1 ppm] et s'échelonne dans le seuil de toxicité des plantes fourragères [5-700 ppm].

- Zn : la concentration en Zn est de 124.33 ppm. Cette valeur est au dessous du seuil de toxicité pour les plantes fourragères [500-1500 ppm] et s'échelonne dans le seuil de toxicité des plantes en général [100-400 ppm].

- Fe : la concentration en Fe est de 784.20 ppm. Cette valeur s'échelonne dans le seuil de toxicité [100-1000 ppm] pour les plantes en général.

Ces résultats obtenus pour la détermination des concentrations des métaux lourds dans nos deux plantes à partir des trois extractants choisis ne nous permettent pas d'évaluer la teneur totale d'un élément. Néanmoins ces valeurs élevées en métaux lourds dans nos deux plantes, malgré leur présence sur un sol sableux naturellement pauvre en matière minérale et particulièrement en métaux lourds, nous permettent de les classer parmi les plantes hyperaccumulatrices.

En comparant les valeurs des concentrations des métaux lourds dans les deux plantes, on remarque qu'*Aristida pungens* L. accumule mieux les métaux lourds qu'*Oudneya africana* R.Br. Ces résultats confirment le développement du système racinaire d'*Aristida pungens* L. qui lui permet probablement d'extraire les métaux dans tous les niveaux du sol.

IV- POUVOIRS ANTIBACTERIENS ET ANTIFONGIQUES DES ANTIMICROBIENS (méthode des disques)

IV.1- EFFET DES ATB ET DES EXTRAITS

Les résultats de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des ATB, des extraits d'*Oudneya*

africana R.Br. (LM, LA, FrM, FrA) et des extraits d'*Aristida pungens* L. (TM, TA, FM, FA) sont donnés respectivement dans les tableau III.17 et III.18 et représentés sous forme d'histogrammes par les figures 15 et 16.

Tableau III.17: Antibiogramme : diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

	LM	LA	FrM	FrA	AMX	S	E	SXT	RA	CZ	TE	NA	CB
LM	8	6	6	7	8	6	8	12	9	6	6	6	6
St	6	8	6	10	12	7	11	13	12	6	6	6	6
Pa1	8	25	11	24	6	6	6	6	7	6	6	6	6
Pa2	8	25	11	24	6	6	6	6	7	6	6	6	6
Pp	6	8	8	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Pr	6	8	6	8	6	6	6	6	6	6	6	6	6

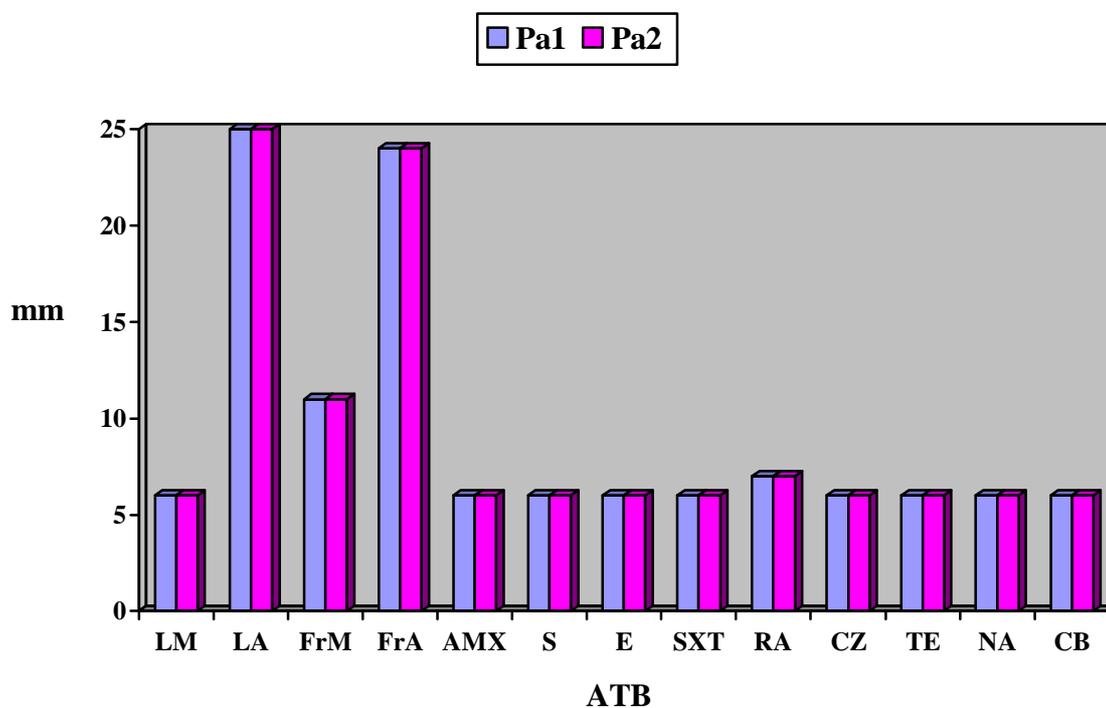
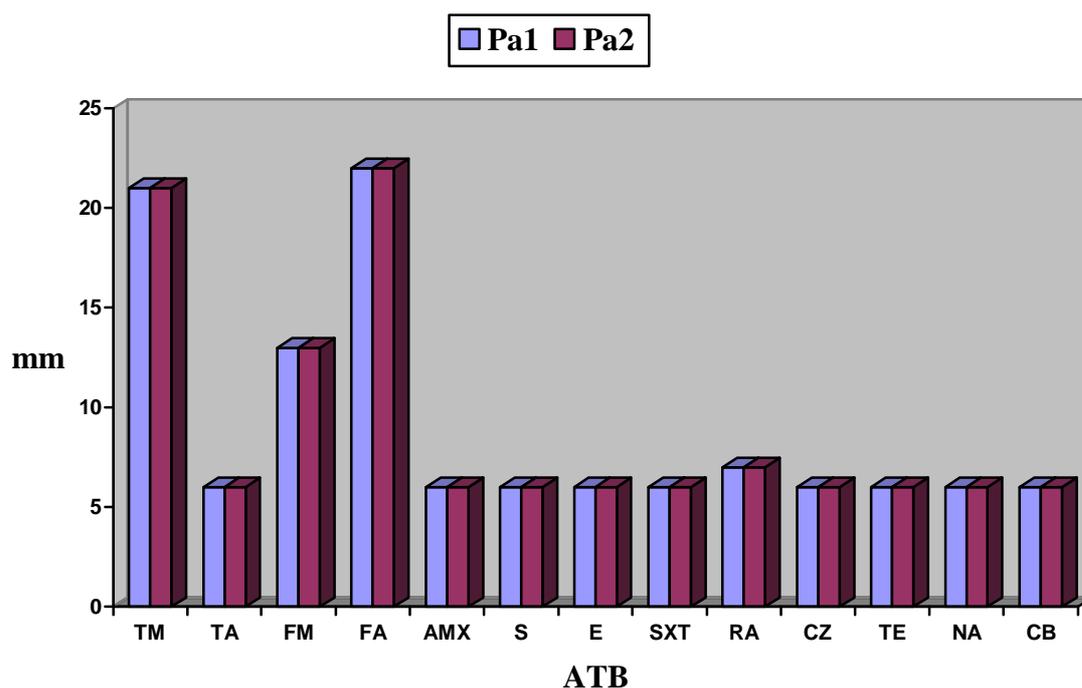


Figure 15 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches (Pa1, Pa2) en fonctions des extraits LM, LA, FrM, FrA et des ATB dans le cas d'*Oudneya africana*.R.Br.

Tableau III.18: Antibiogramme : diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas d'*Aristida pungens* L.

	TM	TA	FM	FA	AMX	S	E	SXT	RA	CZ	TE	NA	CB
LM	6	3	6	7	8	6	8	12	9	6	6	6	6
St	6	8	14	6	12	7	11	13	12	6	6	6	6
Pa1	21	6	13	22	6	6	6	6	7	6	6	6	6
Pa2	21	6	13	22	6	6	6	6	7	6	6	6	6
Pp	6	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Pr	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6

**Figure 16 :** Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches (Pa1, Pa2) en fonction des extraits TM, TA, FM, FA et des ATB dans le cas d'*Aristida pungens* L.

Comme le montrent les résultats schématisés par les figures 15 et 16, tous les ATB sont intermédiaires à l'ensemble des bactéries gram (+) et gram (-) comparés aux extraits LA, FrA, FrM, TM, FM et FA. Ainsi, il ressort que *Pseudomonas aeruginosa* (Pa1 et Pa2) se

révèle très résistante à la plupart des ATB utilisés, alors qu'elle est fortement inhibée par les extraits LA, FrA, TM et FA avec respectivement des diamètres d'inhibition de 25, 24, 21 et 22 mm et moyennement inhibée par FrM et FM avec respectivement des diamètres d'inhibition de 11 et 13 mm.

IV.2- EFFET DES ATF ET DES EXTRAITS

La sensibilité des levures, moisissures (citées dans la partie expérimentale) et de tous les extraits a été testée vis-à-vis des ATF. Les résultats obtenus dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. sont reportés dans le tableau III.19. Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition de chaque souche (levure et moisissure) en fonction des ATF testés sont représentées par les figures 17-22 sous forme d'histogrammes.

Tableau III.19: Antifongigramme : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

	LM	LA	FrM	FrA	EC	MTR	AB	FC	MCZ	CTR
Ca1	6	14	6	10	15	6	20	6	12	12
Ca2	6	20	8	20	14	6	15	6	18	22
Af	6	23	11	20	20	6	6	6	10	12
Ch	6	11	6	12	11	6	12	6	6	6
Bc	6	15	12	20	12	6	15	6	17	8
F₀	6	25	6	30	13	6	20	6	19	9

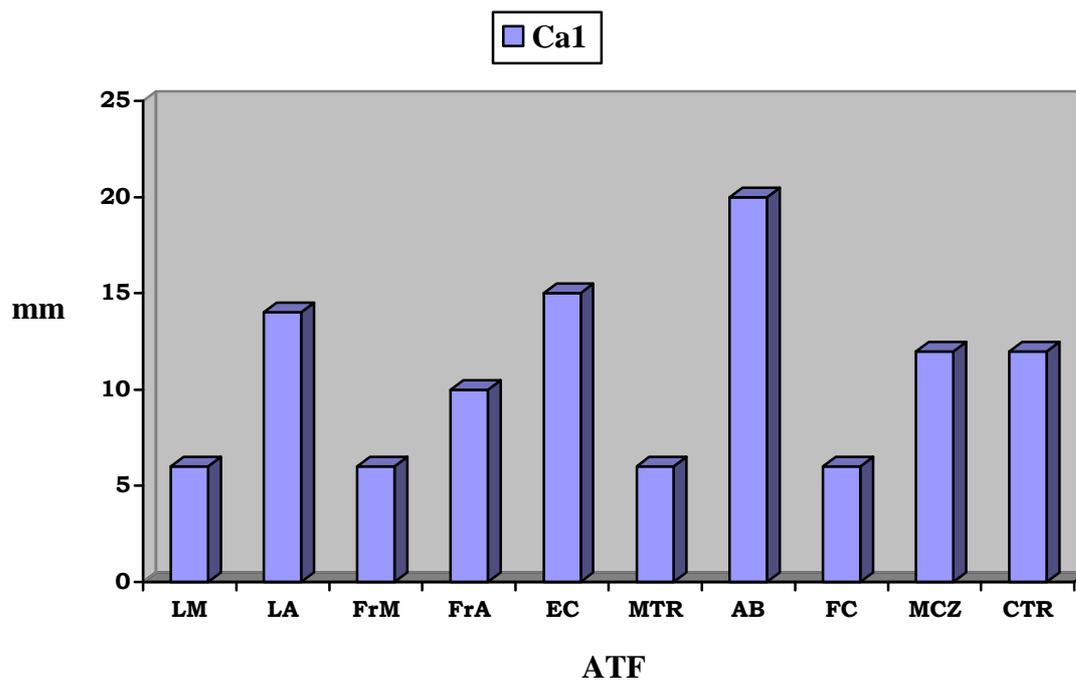


Figure 17 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Candida albicans* Ca.1 en fonction des ATF testés dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

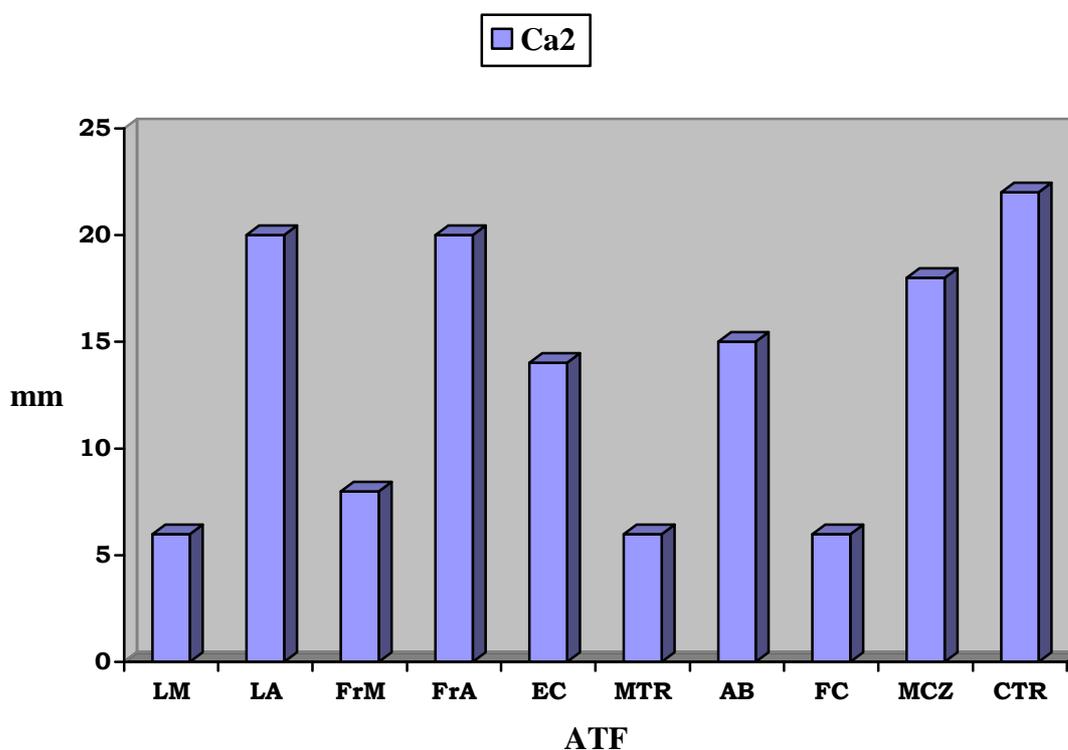


Figure 18 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Candida albicans* Ca.2 en fonction des ATF testés dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

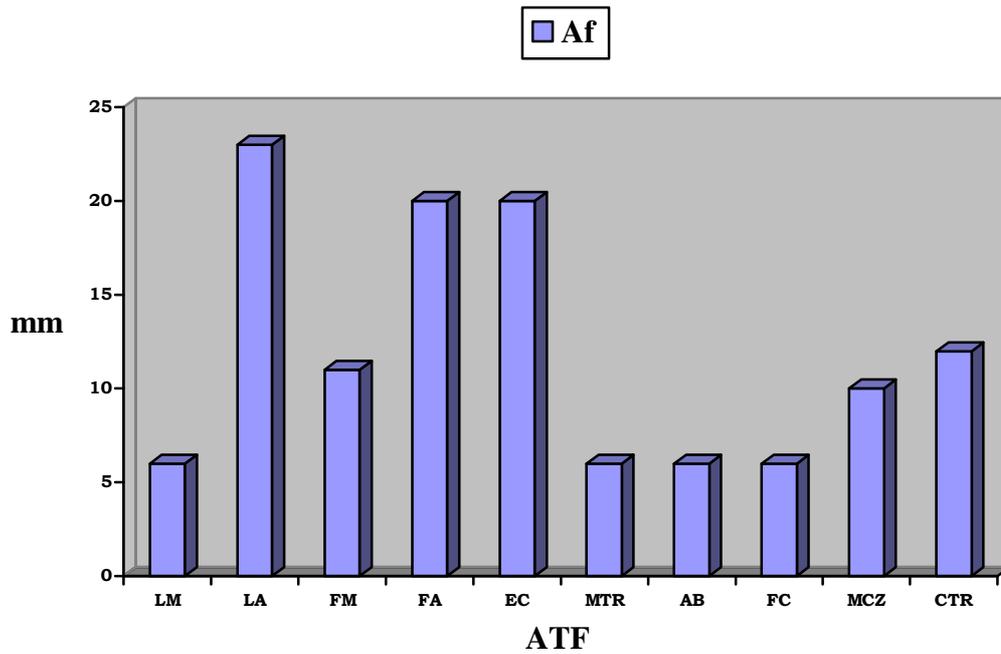


Figure 19 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'*Aspergillus flavus* Af en fonction des ATF testés dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

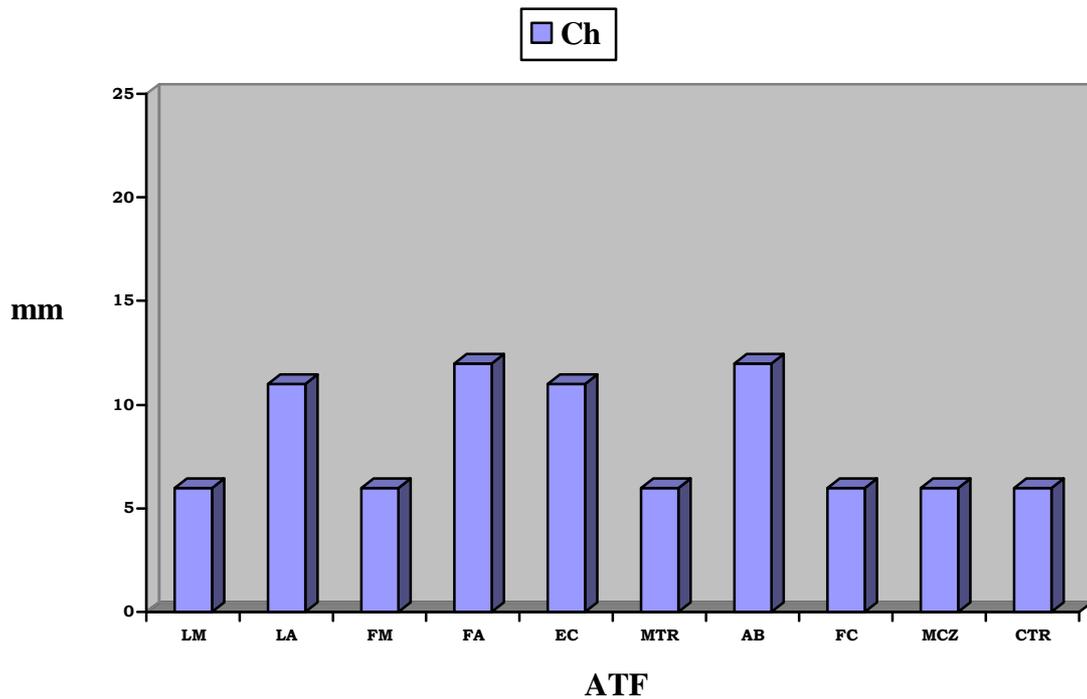


Figure 20 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Cladosporium herbarum* en fonction des ATF testés dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

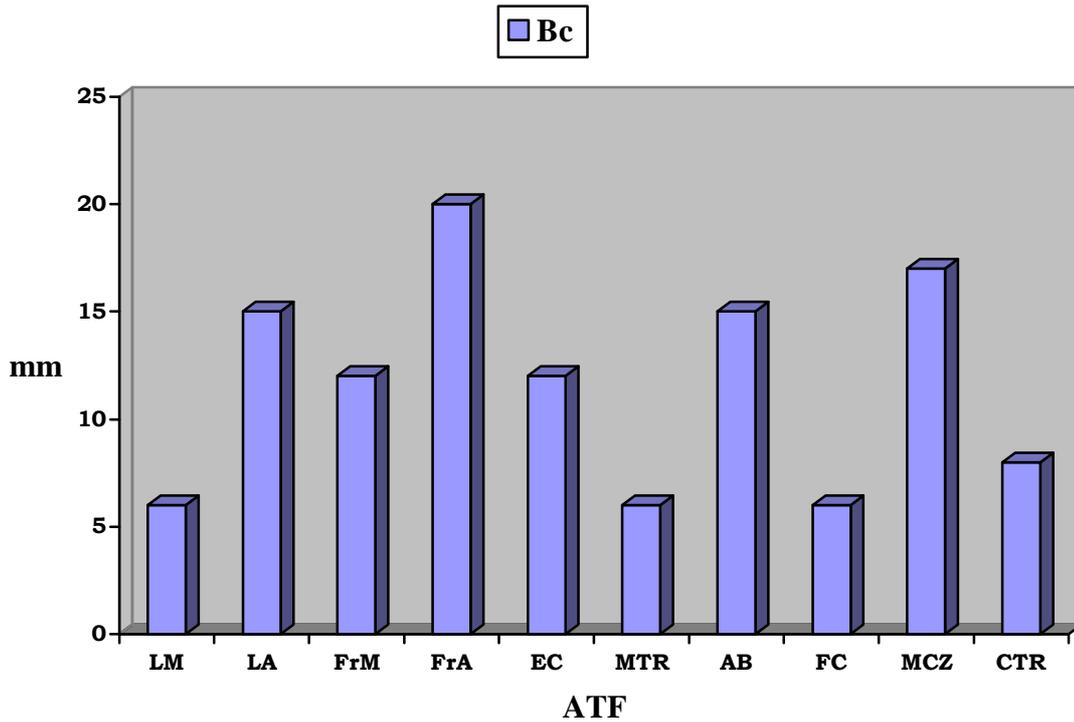


Figure 21 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Botrytis cinerea* Bc en fonction des ATF testés dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

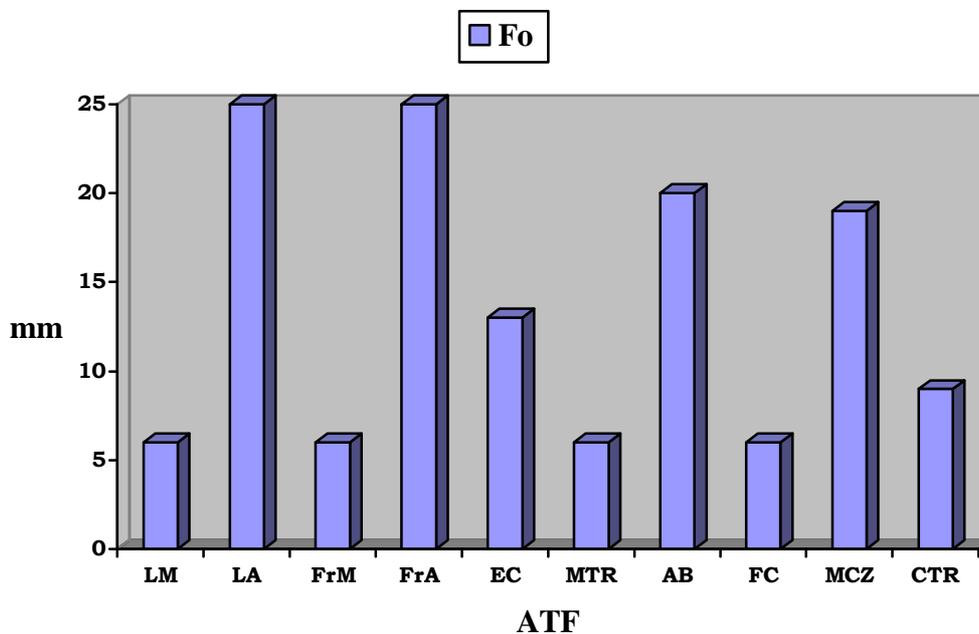


Figure 22 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporium* Fo en fonction des ATF testés dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br.

Concernant *Aristida pungens* L., les résultats obtenus sont reportés dans le tableau III.20. Les moyennes des diamètres des zones d'inhibition de chaque souche (levure et moisissure) en fonction des ATF testés sont représentées par les figures 23-28 sous forme d'histogrammes.

Tableau III.20: Antifongigramme : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas d'*Aristida pungens* L.

	TM	TA	FM	FA	EC	MTR	AB	FC	MCZ	CTR
Ca1	6	8	6	10	15	6	20	6	12	12
Ca2	6	10	8	18	14	6	15	6	18	22
Af	6	10	14	18	20	6	6	6	10	12
Ch	6	9	6	12	11	6	12	6	6	6
Bc	6	6	13	20	12	6	15	6	17	8
F₀	6	6	6	31	13	6	20	6	19	9

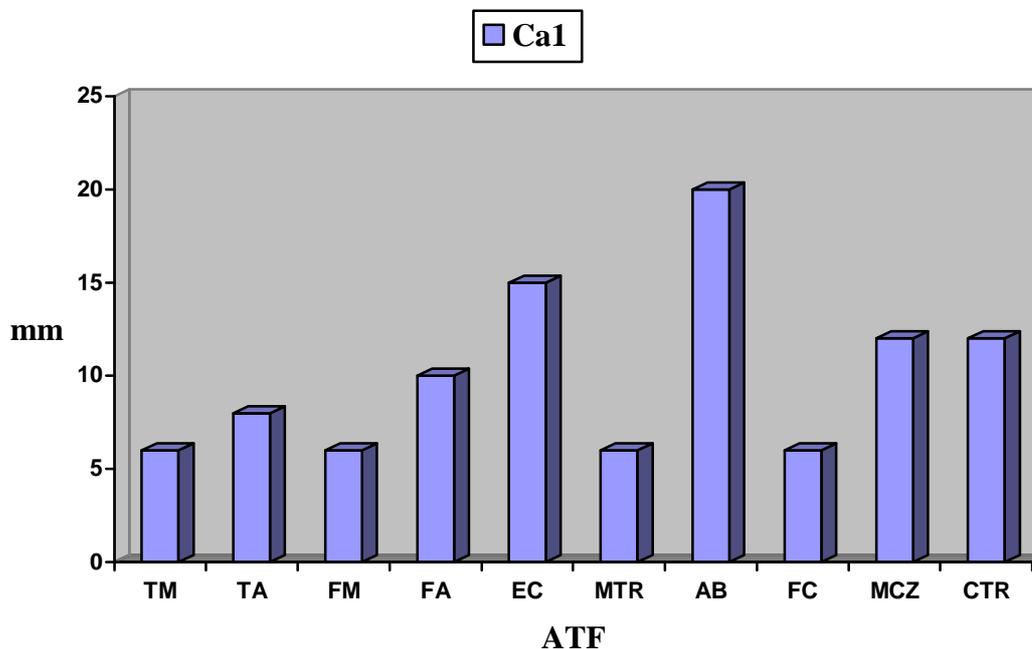


Figure 23 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Candida albicans* Ca1 en fonction des ATF testés dans le cas d'*Aristida pungens* L.

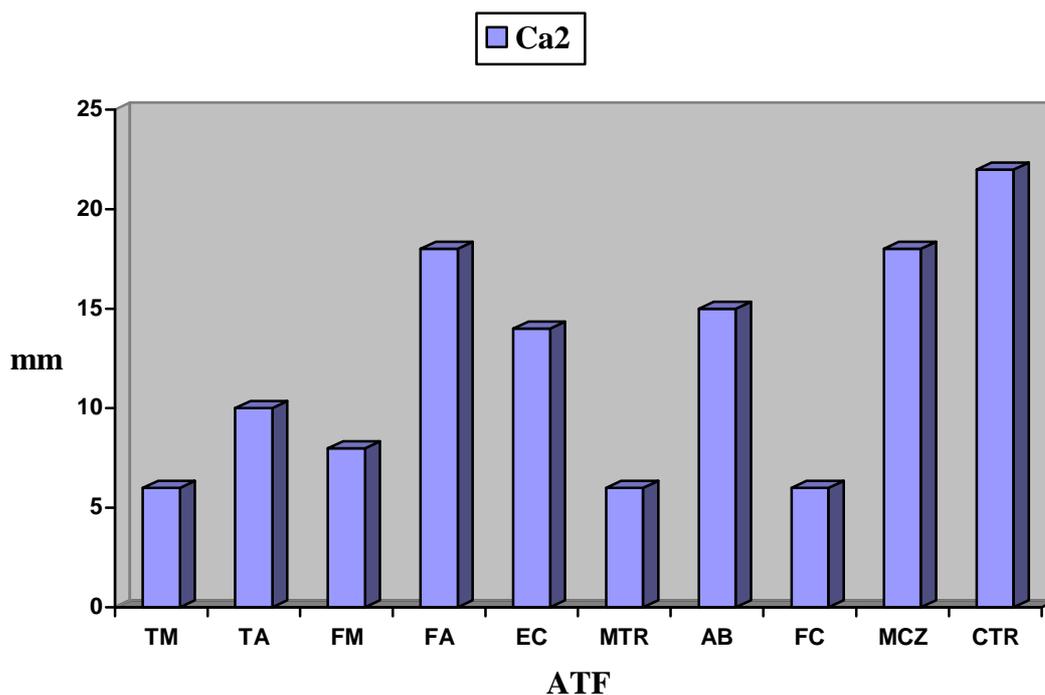


Figure 24 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Candida albicans* Ca2 en fonction des ATF testés dans le cas d'*Aristida pungens* L.

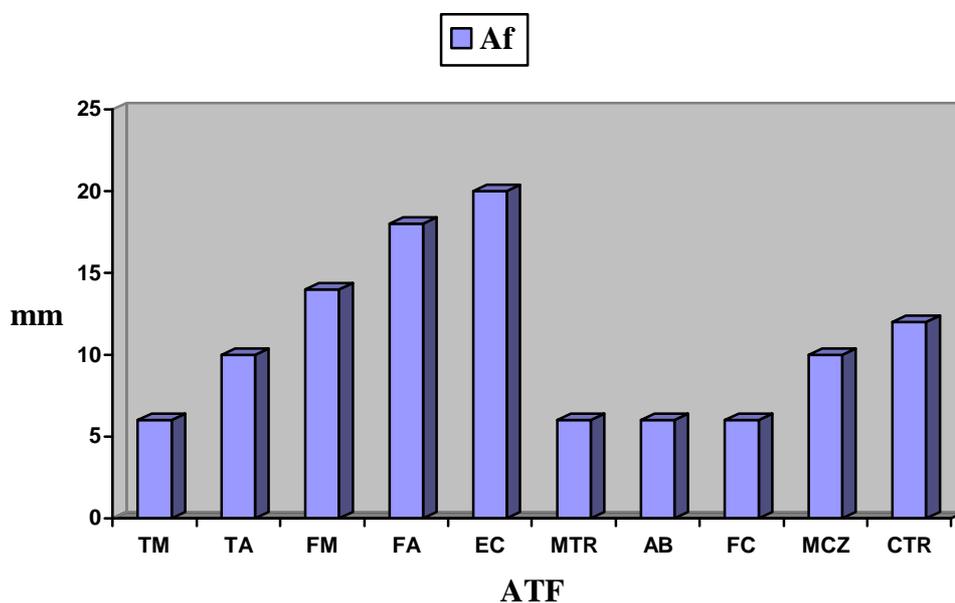


Figure 25 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition d'*Aspergillus flavus* Af en fonction des ATF testés dans le cas d'*Aristida pungens* L.

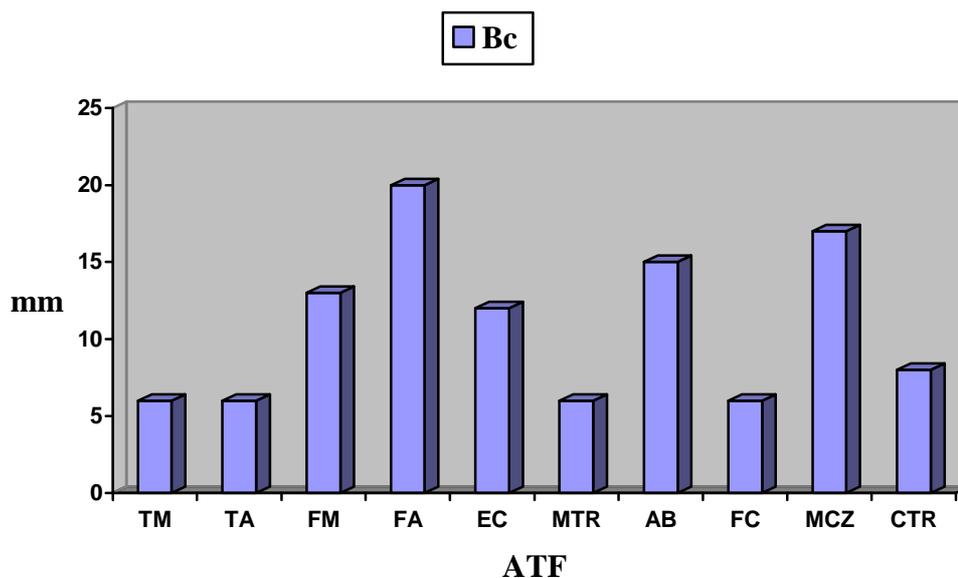


Figure 26 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Cladosporium herbarum* Ch en fonction des ATF testés dans le cas d'*Aristida pungens* L.

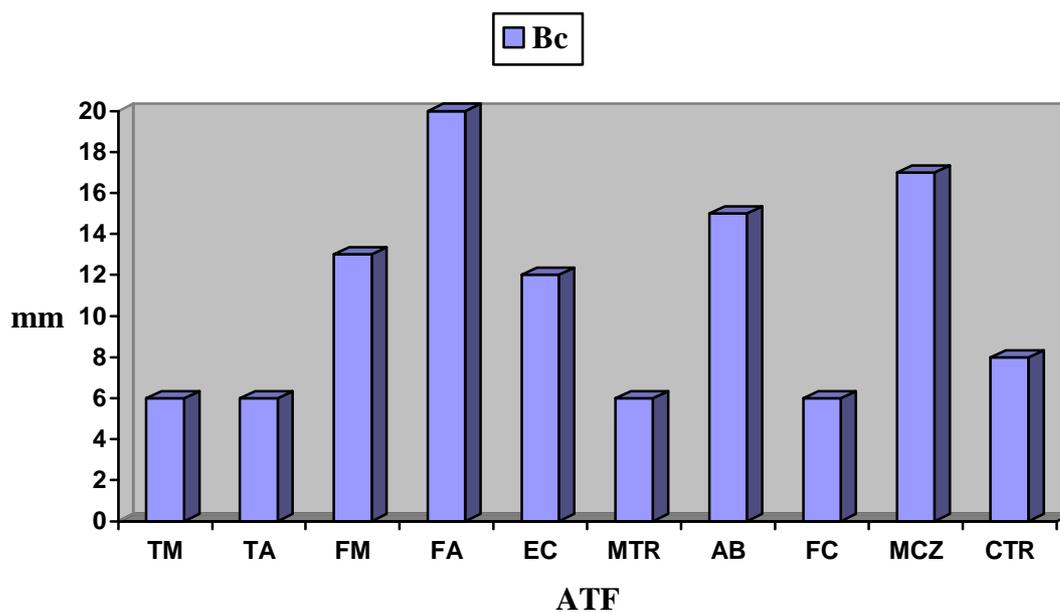


Figure 27 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Botrytis cinerea* Bc en fonction des ATF testés dans le cas d'*Aristida pungens* L.

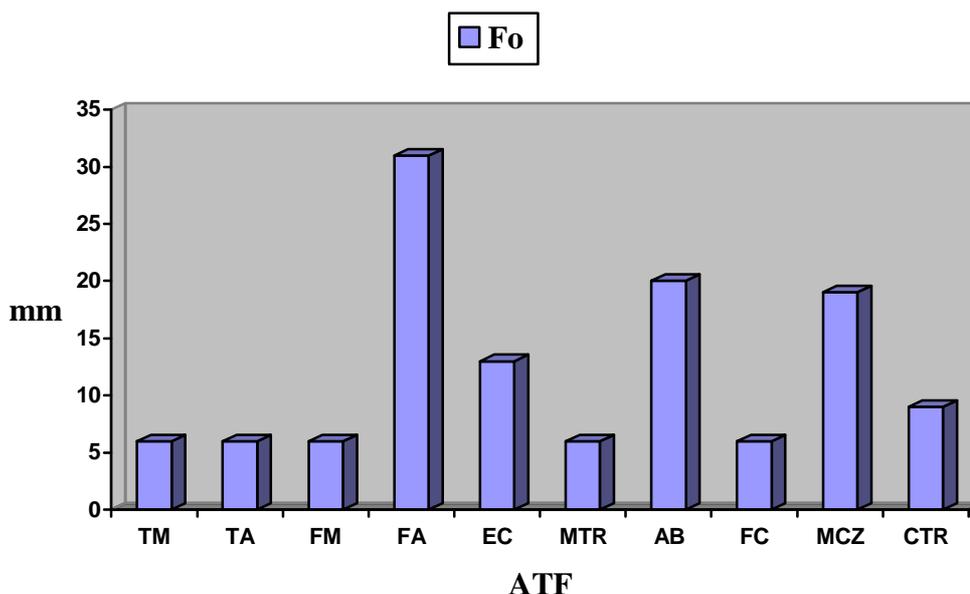


Figure 28 : Moyennes des diamètres (mm) des zones d'inhibition de *Fusarium oxysporium* Fo en fonction des ATF testés dans le cas d'*Aristida pungens* L.

Si l'on considère l'ensemble des résultats, il ressort que certains ATF sont inactifs pratiquement sur certaines souches testées. En effet, *Aspergillus flavus* Af est résistante aux antifongiques suivants : Mitraconazole, Amphotéricine B, et Flucytosine. *Cladosporium herbarum* Ch est résistante aux antifongiques suivants : Mitraconazole, Flucytosine, Miconazole et Clotrimazole. *Botrytis cinerea* Bc et *Fusarium oxysporium* Fo sont résistantes aux Mitraconazole et Flucytosine et intermédiaires au Clotrimazole.

Quant aux levures *Candida albicans* Ca1 et Ca2, elles sont insensibles aux Mitraconazole et Flucytosine.

En plus, en concordance avec les propriétés antifongiques des stérols, des stéroïdes, des tanins et des flavonoides, LA et FrA révèlent une activité antifongique significative. FrA est plus active contre *Fusarium oxysporium* Fo et *Botrytis cinerea* Bc que LA avec respectivement une zone d'inhibition de 30 et 25 mm ; 20 et 15 mm. Au contraire LA est plus active contre *Aspergillus flavus* Af que FrA avec respectivement une zone d'inhibition de 23 et 20 mm.

En outre, LA et FrA inhibent la croissance de *Candida albicans* Ca2 avec une zone d'inhibition de 20 mm.

D'autre part, on remarque que FA possède un large spectre antifongique.

En effet, FA inhibe considérablement la croissance des moisissures notamment *Fusarium oxysporium* Fo, *Aspergillus flavus* Af et *Botrytis cinerea* Bc avec respectivement,

un diamètre d'inhibition de 31, 18 et 20 mm. FA inhibe également considérablement la levure *Candida albicans* Ca.2 avec un diamètre d'inhibition de 18 mm.

De même FM révèle une activité antifongique intéressante contre *Aspergillus flavus* Af et *Botrytis cinerea* Bc avec respectivement un diamètre d'inhibition de 14 et 13 mm.

Il ressort de ces tests antimicrobiens trois résultats intéressants :

- nos deux plantes présentent une bonne activité antibiotique contre *Pseudomonas aeruginosa* une bactérie très connue pour sa résistance contre les antibiotiques. [172]

- un bon spectre d'action contre la levure *Candida albicans*. Cette levure naturellement présente chez l'homme dans la bouche, le tube digestif et les voies génitales, peut devenir pathogène dans certaines conditions comme par exemple une diminution des fonctions immunitaires de l'organisme. Dans ce cas, elle provoque une infection mycosique ou candidose. [217]

- une très forte action sur le champignon *Fusarium oxysporium* Fo. Ce dernier s'attaque au palmier dattier et provoque le bayoud. Il s'agit d'une fusariose qui cause des dégâts sévères dans les palmeraies. [218] Le champignon pénètre dans les racines du palmier dattier et chemine à travers le système vasculaire du stipe jusqu'à la couronne foliaire. Les folioles d'une palme se replient successivement sur les rachis et blanchissent d'où le nom de bayoud (de abyad : blanc en arabe). L'arbre dégénère ainsi et meurt au bout de quelques semaines ou plusieurs mois selon les conditions climatiques. [219]

V- POUVOIRS ANTIBACTERIENS ET ANTIFONGIQUES DES ANTIMICROBIENS (méthode sur milieu liquide)

Les résultats obtenus du pouvoir antimicrobien de tous nos extraits selon la méthode sur milieu liquide sont illustrés dans les tableaux III.21 et III.22.

Tableau III.21: Pouvoir antimicrobien des extraits (FrM, FrA, LM et LA) dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. selon la méthode sur milieu liquide

Extraits					FrM			FrA			LM			LA		
Dilutions		T ₁	T ₂	T ₃	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	SM	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Souches		T ₁	T ₂	T ₃	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
Pseudomonas	Pa1	++	-	-	++	++	++	-	±	+	++	++	++	-	±	+
	Pa2	++	-	-	++	++	++	-	±	+	++	++	++	-	±	+
	Pr	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Pp	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Bactéries Gram+	LM	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	St	++	-	-	++	++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++
Levures	Ca1	++	-	-	++	++	++	+	++	++	+	++	++	+	+	++
	Ca2	++	-	-	+	++	++	-	±	+	+	++	++	-	±	+
moisissures	A.f	++	-	-	+	+	++	-	±	+	+	++	++	-	±	+
	Ch	++	-	-	+	++	++	+	+	++	+	++	++	+	±	++
	Bc	++	-	-	+	+	++	-	±	+	+	++	++	-	±	++
	Fo	++	-	-	+	++	++	-	±	+	+	++	++	-	±	++

- : pas de croissance ; ± : croissance faible ; + : croissance ;
 ++ : croissances importantes ; T: témoin

Tableau III.22: Pouvoir antimicrobien des extraits (TM, TA, FM et FA) dans le cas d'*Aristida pungens* L. selon la méthode sur milieu liquide

Extraits					TM			TA			FM			FA		
Souches	Dilution	T ₁	T ₂	T ₃	SM 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	SM 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	SM 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	SM 10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
	<i>Pseudomonas</i>	Pa1	++	-	-	-	±	+	++	++	++	±	+	++	-	±
Pa2		++	-	-	-	±	+	++	++	++	±	+	++	-	±	+
Pr		++	-	-	++	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Pp		++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Bactéries Gram+	LM	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	St	++	-	-	++	++	++	++	++	++	±	+	++	++	++	++
Levures	Ca1	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+
	Ca2	++	-	-	++	++	++	++	++	±	++	++	++	-	±	+
moisissures	A.f	++	-	-	++	++	++	++	++	+	++	±	+	-	±	+
	Ch	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	Bc	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	±	+
	Fo	++	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	±	+

- : pas de croissance ; ± : croissance faible ; + : croissance ;
++ : croissances importantes ; T: témoin

Pour ce qui est des résultats obtenus par cette technique, on note la présence de germes dans le premier témoin (T1) contenant l'eau distillée et leur absence dans le deuxième témoin (T2) ne contenant que le milieu de culture (milieu stérile) et dans le troisième témoin (T3) contenant le solvant (méthanol et acétone). Ce dernier a un effet inhibiteur sur nos souches. Suite à ceci, les solvants sont utilisés à un pourcentage inférieur ou égal à 5 % car après plusieurs essais, à cet intervalle nous avons remarqué qu'il n'y a pas d'inhibition.

De plus selon ces résultats, la sensibilité des souches inhibées se situe entre les dilutions 10⁻¹ et 10⁻².

V.1-DETERMINATION DES CMI PAR LA METHODE DE CONTACT DIRECT

a) *Oudneya africana* R.Br.

Les intervalles des concentrations minimales inhibitrices des extraits (FrM, FrA, LM et LA) d'*Oudneya africana* R.Br. obtenus par la méthode de contact direct en milieu gélosé sont reportés dans le tableau III.23.

Tableau III.23: Intervalles des CMI des extraits d'*Oudneya africana* R.Br. (FrM, FrA, LM et LA) relatifs aux souches testées ($\mu\text{g/ml}$)

Souche	FrM	FrA	LM	LA
LM	-	-	-	-
St	-	-	-	-
Pa1 Pa2	-	[390.53-979.27]	-	[827.90-2076.00]
Pp	-	-	-	-
Pr	-	-	-	-
Ca1	-	-	-	-
Ca2	-	[979.27-1948.75]	-	[2076.00-4131.25]
Af	-	[979.27-1948.75]	-	[827.90-2076.00]
Ch	-	-	-	-
Bc	-	[979.27-1948.75]	-	[2076.00-4131.25]
Fo	-	[217.01-390.53]	-	[827.90-2076.00]

Ces résultats nous permettent de déterminer des CMI de nos extraits qui ont des effets remarquables sur les souches.

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (Pa1 et Pa2), les moisissures *Aspergillus flavus* Af et *Fusarium oxysporium* Fo sont inhibés par l'extrait LA au même intervalle de CMI [827.90-2076.00] $\mu\text{g/ml}$. La levure *Candida albicans* Ca2 et la moisissure *Botrytis cinerea* Bc sont inhibées par l'extrait LA au même intervalle de CMI [2076.00-4131.25] $\mu\text{g/ml}$. De la même façon l'extrait FrA inhibe au même intervalle de CMI [979.27-1948.75] $\mu\text{g/ml}$ la levure *Candida albicans* Ca2 et les moisissures *Aspergillus flavus* Af ainsi que *Botrytis cinerea* Bc.

Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (Pa1 et Pa2) et la moisissure *Fusarium oxy*

sporium Fo sont inhibées respectivement par l'extrait FrA aux intervalles de CMI [390.53-979.27] µg/ml et [217.01-390.53] µg/ml.

b) *Aristida pungens* L.

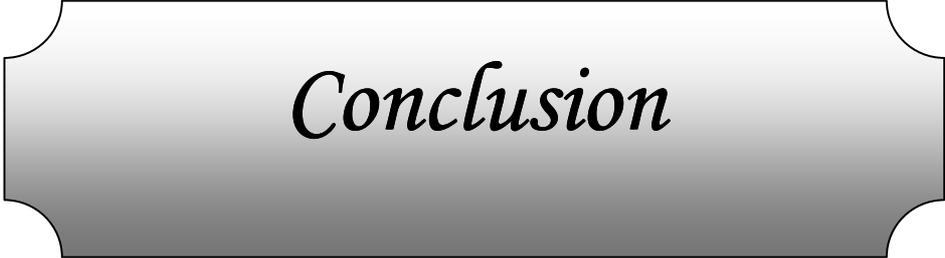
Les intervalles des concentrations minimales inhibitrices des extraits d'*Aristida pungens* L. (TM, TA, FM et FA) obtenus par la méthode de contact direct en milieu gélosé sont reportés dans le tableau III.24.

Tableau III.24: Intervalles des CMI des extraits d' *Aristida pungens* L. (TM, TA, FM et FA) relatifs aux souches testées (µg/ml)

Souche	TM	TA	FM	FA
LM	-	-	-	-
St	-	-	-	-
Pa1 Pa2	[559.61-1403.89]	-	-	[838.31-2095.78]
Pp	-	-	-	-
Pr	-	-	-	-
Ca1	-	-	-	-
Ca2	-	-		[838.31-2075.78]
Af	-	-		
Ch	-	-		
Bc	-	-		[838.31-2095.78]
Fo	-	-		[465.71-838.31]

Les résultats obtenus montrent que les microorganismes les plus sensibles sont les moisissures particulièrement *Fusarium oxysporium* Fo inhibée à un intervalle de CMI inférieur à ceux obtenus pour les bactéries et les autres souches [465.71-838.31] µg/ml.

L'extrait TM inhibe les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* (Pa1 et Pa2) à un intervalle de CMI [559.61-1403.89] µg/ml inférieur à celui de FA [831.31-2095.78] µg/ml.



Conclusion

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de ce travail complètent et confortent une démarche scientifique de plus en plus fréquente à savoir, l'établissement de relations entre l'utilisation empirique de plantes par les populations et la connaissance scientifique et plus particulièrement chimique de ces plantes.

Ce travail se place également dans une problématique de recherche pluridisciplinaire, associant des techniques caractéristiques de la chimie organique, de la chimie analytique et de la biologie.

Oudneya africana R.Br. et *Aristida pungens* L. présentent un intérêt direct. Ce sont en effet, deux plantes qui sont non connues chimiquement. L'analyse de leur contenu chimique nous a permis d'une part, de caractériser la présence des différentes familles de composés (flavonoïdes, saponosides, tanins, stérols, stéroïdes,...) en quantités variables, dans les différentes parties des deux plantes en question, et d'autre part d'isoler et d'identifier cinq composés le stigmasténol, le β -sitostérol, le stigmastérol, l'épicatéchine et l'épiafzéléchine dans le cas d'*Oudneya africana* R.Br. et de deux composés la fridéline et le lupéol dans le cas d'*Aristida pungens* L.

En réponse aux objectifs fixés, nous nous prononcerons en termes de résultats obtenus, de limites et de prospectives.

Des résultats qui nous semblent les plus significatifs, on retiendra l'existence d'une bonne corrélation entre l'usage traditionnel et l'activité antimicrobienne et entre le caractère xérophytisme et l'accumulation ou l'hyperaccumulation des métaux lourds.

Vu la pauvreté en métaux lourds dans les sols sableux, *Oudneya africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. se sont révélées d'une grande capacité d'accumuler les métaux lourds. Nous avons trouvé des concentrations élevées notamment en Cu, Ni, Cd et Pb. Ces teneurs s'échelonnent dans le seuil de concentrations toxiques des plantes fourragères. Cette observation pose le problème de contamination dans la chaîne alimentaire.

Par ailleurs, l'étude de l'activité biologique sur les différentes souches pathogènes nous a montré que nos extraits de plantes possèdent une bonne activité antimicrobienne.

Les tests sur les microorganismes ont montré une meilleure activité antibiotique et antifongique des extraits des deux plantes que ceux des ATB et des ATF.

En termes de limites, nous retiendrons principalement les points suivants :

- l'identification chimique de certaines molécules qui n'a pu être menée à terme du fait de la faible quantité des produits et des fractions.

- les composés dans les fractions récupérées après chromatographie de colonne sur gel de silice ont des comportements chimiques voisins difficiles à séparer.

Ces limites étant soulignées, il convient de placer ce travail dans un contexte plus prospectif, car sur de nombreux points, il ouvre la voie à des pistes nouvelles.

Il s'agit premièrement de compléter le travail par l'identification de la molécule responsable de ces activités antimicrobiennes et deuxièmement l'aspect de la valorisation de la matière végétale. De plus, il révèle l'autre aspect de la recherche sur les plantes tolérantes et accumulatrices aux métaux lourds, à savoir, leur utilisation pour dépolluer les sols contaminés par les métaux lourds (phytoremédiation des sols pollués).

En définitif, ce travail, s'il fixe des résultats certains, ouvre des perspectives et des pistes de recherches, tant au niveau de la connaissance scientifique, qu'à celui d'une possibilité de valorisation de la matière végétale de nos régions.

ABREVIATIONS

AcOEt	Acétate d'éthyle
CH₂Cl₂	Chlorure de méthyle
CCM	chromatographie sur couche mince
CCE	chromatographie sur couche épaisse
MeOH	méthanol
IR	infrarouge
cm	centimètre
ml	millilitre
mm	millimètre
g	gramme
mg	milligramme
N	normalité
R_f	facteur de rétention ou rapport frontal
RMN	résonance magnétique nucléaire
COSY	correlated spectroscopy
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
SM	spectre de masse
IE	impact électronique
FAB	fast atom bombardement
TMS	triméthylsilyl
UV	ultra violet (lampe)
LA	extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d' <i>Oudneya africana</i> R.Br.
FrA	extrait d'acétate d'éthyle des fruits d' <i>Oudneya africana</i> R.Br.
LM	extrait de méthanol des feuilles d' <i>Oudneya africana</i> R.Br.
FrM	extrait de méthanol des fruits d' <i>Oudneya africana</i> R.Br.
TA	extrait d'acétate d'éthyle des tiges d' <i>Aristida pungens</i> L.
FA	extrait d'acétate d'éthyle des feuilles d' <i>Aristida pungens</i> L.
TM	extrait de méthanol des tiges d' <i>Aristida pungens</i> L.
FM	extrait de méthanol des feuilles d' <i>Aristida pungens</i> L.
LM	<i>Listeria monocytogens</i>
St	<i>Staphylococcus aureus</i>
Pa1, Pa2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Pp	<i>Pseudomonas putida</i>
Pr	<i>Pseudomonas proteus</i>
AMX	Amoxicilline
S	Streptomycine
E	Erytromycine
SXT	Trimethoprime-sulfamides
RA	Rifampicine
CZ	Cephazoline
TE	Tetracycline
NA	Acide nalidixique
CB	Carbenicilline
Ca1, Ca2	<i>Candida albicans</i>
Af	<i>Aspergillus flavus</i>
Ch	<i>Cladosporium herbarium</i>
Bc	<i>Botrytis cinerea</i>
Fo	<i>Fusarium oxysporium</i>
EC	Econazole
MTR	Mitraconazole
AB	Amphotéricine
FC	Flucytosine
MCZ	Miconazole
CTR	Clotrimazole

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

1. Anti-microbial Activity of Extracts from Algerian *Aristida pungens* L. 2005
2. Anti-microbial Activity of the Sterols and Steroids Extracted from Algerian *Oudneya africana* R.Br. Sous Presse

COMMUNICATIONS NATIONALES

1. Plantes médicinales, molécules et médicaments. Tlemcen, 18 Juin 2002.
2. Contribution à l'étude chimique d'une plante saharienne *Aristida pungens* L. Alger, 10-11 Décembre 2002.

COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

1. Etude phytochimique de deux plantes médicinales: *Oudneya Africana* R.Br. et *Aristida pungens* L. Meknes, 20-21 Septembre 2002.