

Mag/57h.10/02

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

**UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID TLEMCEN
Faculté des sciences
Département de Biologie**

**LABORATOIRE DE RECHERCHE :
Substances Naturelles Activités Biologiques et Synthèse**

Mémoire en vue l'obtention du Diplôme
de Magister en Biologie

THEME

11/129/04

**Détermination de la composition et de l'activité
Antimicrobienne (antiparasitaire et antibactérienne)
De quelques extraits d'*Aristida pungens* L. (Drinn)**

Présenté par :

Mr MALTI Nazim



Soutenu le 07-01-2007 devant le jury composé de :

Mr TABTI B.

Mme GAOUAR N.

Mr ABDELWAHED D.E.

Melle BOUHADJERA K.

Mme MALEK F.

Professeur Université de Tlemcen

MC Université de Tlemcen

MC. Université de Tlemcen

MC Université de Tlemcen

CC. Université de Tlemcen

Président

Examinatrice

Examinateur

Promotrice

Co-Promotrice

Année Universitaire 2006/2007

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé sous la direction de Docteur Bouhadjera K., Maître de conférences à la faculté des sciences de Tlemcen, j'exprime ma gratitude et ma sincère reconnaissance pour son inestimable aide, ses judicieux conseils, sa grande patience et sa confiance et sous la co-direction de Madame Malek F. chargée de cours au département de biologie, j'exprime mes remerciements.

A Monsieur Tabti B., Professeur et doyen de la faculté des sciences de Tlemcen, pour sa compréhension, pour toute son aide logistique et pour avoir voulu présider ce jury.

Je tiens à remercier Madame Gaouar F., Maître de conférences à la faculté des sciences de Tlemcen, ainsi que Monsieur Abdelwahed D. E., Maître de conférences à la faculté des sciences de Tlemcen, pour avoir bien voulu examiner et enrichir ce travail.

Je ne pourrai omettre de remercier Professeur Grellier P., Directeur de l'USM 0504 « laboratoire de biologie fonctionnelle des protozoaires », Muséum National d'Histoire Naturelle, Mademoiselle Susplugas S., Docteur à la faculté des sciences de Paris, et Madame Kohl L., Maître de conférences au Muséum National d'Histoire Naturelle, pour leur chaleureux accueil, leur disponibilité, et leur précieuse aide.

Je remercie aussi tous ceux qui ont contribué de près ou de loin avec leur aide à l'élaboration de ce travail.

Enfin, je remercie mes parents, qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude et toute ma reconnaissance, pour leur soutien et leur patience durant toute ma scolarité.

الملخص

مستخرجات أسيتات الإثيل والميثانول لثلاث أفرع مختلفة لأرستدة بنجنس ل، نبتة علاجية للصحراء الجزائرية اختبرت في بيئة مصطنعة لقياس تأثيرهم الموقف لنمو الأوليات التالية: بلسمديوم فلسبيروم وتريبانوزومة بروسى، وكذا لقياس قدرتهم ضد البكتيرية على أرومات قرام + وقرام- بطريقة القريصات المبللة، من ناحية أخرى، قمنا باختبارات على كيمياء النباتات للتعرف على عائلات المركبات الموجودة في أرستدة بنجنس ل، والمسئولة احتماليا على النشاط ضد البكتيري لهذه النبتة.

أرستدة بنجنس ل تحتوي على عائلات المركبات التالية:

فلافونويدات، دبوغ، مركبات محللة، استرلات واستيرويدات، وإمودولات أربعة من الستة المستخرجات المستخرجة تملك نشاطا جيدا ضد بلاسموديوم فلسبيروم حيث (IC50) للمستخرج (NM) تساوي 6,9 ميكروغرام/مل. المستخرجين (NM) و (NA) أوضحا في المجهر تأثيرا على التحرك والتوقيف لنمو التريبانوزومة بروسى. المستخرجات الستة تملك نشاطا ضد بكتيري مثير على الأرومات الاثنان القرام + المختبرة (سطاقيلوكوكيس أوريبس وميكروكوكيس ليطيس) أيضا قياس السمية الخلوية على خلايا الثدييات (MRC-5) بطريقة دمج الـ (MTT) يكشف سمية جد ضعيفة لمستخرجات أرستدة بنجنس ل.

ABSTRACT

The ethyl acetate and methanolic extracts of three different parts of *Aristida pungens* L., a saharian medicinal plant from Algeria had been tested *in vitro* for the assess of their inhibiting activity of the protozoal growth namely; *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma brucei*, as well as for the assess of their antibacterial power against Gram + and Gram – strains using the soaked discs method. Otherwise, photochemical tests had been leaded in order to know the compound's families present in *A. pungens* L. and possibly responsible of the antimicrobial activity of this plant. *A. pungens* L. contents the following compound's families: flavonoids, tannins, reducing compounds, sterols and steroids, saponosids and emodols. Four of the six extracts tested have a good activity against *P. falciparum* with an IC50 for the NM extract equalling 6.9 µg/ml. Two extracts NM and NA show at the microscope an influence on the mobility and a growing inhibition of *T. brucei*. The six extracts have an interesting antibacterial activity on the two Gram + tested strains (*Staphylococcus aureus* and *micrococcus luteus*). The assess of the cytotoxicity on the mammalian cells MRC-5 by the MTT incorporation method reveals a very low toxicity of the *A. pungens* L. extracts.

RESUME

Les extraits d'acétate d'éthyle et de méthanol de trois parties différentes d'*Aristida pungens* L., une plante médicinale saharienne algérienne, ont été testés *in vitro* pour la mesure de leur activité inhibitrice de la croissance des protozoaires à savoir ; *Plasmodium falciparum* et *Trypanosoma brucei*, ainsi que pour la mesure de leur pouvoir antibactérien sur des souches Gram + et Gram – par la méthode des disques imbibés. Par ailleurs, des tests phytochimiques ont été menés pour connaître les familles de composés présentes dans *A. pungens* L. et éventuellement responsables de l'activité antimicrobienne de cette plante. *A. pungens* L. contient les familles de composés suivantes : flavonoïdes, tanins, composés réducteurs, stérols et stéroïdes, saponosides et émouls. Quatre des six extraits testés possèdent une bonne activité contre *P. falciparum* avec une IC50 pour l'extrait NM égale à 6,9 µg/ml. Deux extraits NM et NA démontrent au microscope une influence sur la mobilité et une inhibition de la croissance des *T. brucei*. Les six extraits possèdent une activité antibactérienne intéressante sur les deux souches Gram + testées (*Staphylococcus aureus* et *Micrococcus luteus*). Aussi, la mesure de la cytotoxicité sur les cellules de mammifères MRC-5 par la méthode d'incorporation du MTT révèle une très faible toxicité des extraits d'*A. pungens* L.

Abréviations & Acronymes

ACD	Acide citrate dextrose
AcOEt	Acétate d'éthyle
ACTs	Artemisinin based combination therapies
ATB	Antibiotique
CPM	Coups par minute
DAPI	Di aminido phényl indol
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
D.O	Densité optique
EA	Extrait d'acétate d'éthyle de l'entre nœud
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétracétique
EM	Extrait de méthanol de l'entre nœud
FcB1	Falciparum chloroquine base 1
GA	Extrait d'acétate d'éthyle de la gaine
GM	Extrait de méthanol de la gaine
IC50	Concentration d'inhibition de 50 % des germes
IC90	Concentration d'inhibition de 90 % des germes
MeOH	Méthanol
ml	Millilitre
MRC-5	Mamalian stress response cells 5
MTT	3-(4,5-diméthylThiazol-2-yl)-2,5diphényl
NA	Extrait d'acétate d'éthyle des nœuds
NM	Extrait de méthanol des nœuds
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBS	Phosphate buffered saline
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH	Potentiel hydrogène
Rdt	Rendement
RPMI	Roswel Park Memorial Institute
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SI	Index de sélectivité
µg	Microgramme
USM	Unité Scientifique du Muséum

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Morphologie générale d'une espèce appartenant à la famille des Gramineae

Figure 2: Photo d'*Aristida pungens* L. en milieu naturel

Figure 3: Morphologie générale de la partie aérienne d'*Aristida pungens* L.

Figure 4: Quelques structures importantes de phénols et polyphénols.

Figure 5: Quelques structures importantes des flavonoïdes.

Figure 6: Structure de l'Emodine et de l'Acide Kermésique.

Figure 7: Structures de l'acide gallique et de l'acide ellagique.

Figure 8: Structure du Pyrocatechol.

Figure 9: Structure du Fucofuroeckol.

Figure 10: Structure de l'Hyoscyamine.

Figure 11: Structure de la Conine.

Figure 12: Structure de l'Ephédrine.

Figure 13: Structure de quelques alcaloïdes.

Figure 14: Structure de quelques saponosides.

Figure 15: Structure de base des saponosides stéroïdiques.

Figure 16: Structure des saponosides triterpéniques.

Figure 17: Structure de stérols et stéroïdes.

Figure 18: Structure de deux 3β -hydroxy stéroïdes.

Figure 19: Photo de l'anophèle ♀.

Figure 20: Photo du mérozoïte.

Figure 21: Photo du Trophozoïte.

Figure 22: Photo du Schizonte.

Figure 23: Cycle de *Plasmodium falciparum* chez l'homme et le moustique.

Figure 24 : Répartition de la malaria selon la résistance des souches de *P. falciparum* à la chloroquine CQ.

Figure 25 : cycle de vie de *Trypanosoma brucei*

Figure 26 : photos des étapes de séparations des différentes parties d'*A. pungens* L. et de leur broyage.

Figure 27 : photo d'un frottis

Figure 28 : Photo d'une plaque NUMC-ELISA 96 puits à fonds coniques.

Figure 29 : Estimation de l'activité de l'extrait GM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Figure 30 : Estimation de l'activité de l'extrait GA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Figure 31 : Estimation de l'activité de l'extrait EM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Figure 32 : Estimation de l'activité de l'extrait EA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Figure 33 : Estimation de l'activité de l'extrait NM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Figure 34 : Estimation de l'activité de l'extrait NA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Figure 35 : Estimation de l'activité de l'*Amodiaquine* sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Figure 36 : Photo de la plaque contenant les cellules de mammifères MRC-5 en présence (de gauche à droite) des concentrations décroissantes des extraits d'*A. pungens* L.

Figure 37 : Photos des *T. brucei* prises à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Figure 38 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches (Pa1, Pa2) en fonction des extraits T_M, T_A, F_M, F_A et des ATB.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 :** Usage d'*Aristida pungens* en médecine traditionnelle au Tafilalet (Région d'Errachidia, Maroc).
- Tableau 2 :** Les différentes familles de composés présents dans les tiges et les feuilles d'*Aristida pungens* L.
- Tableau 3 :** IC50 sur *P. falciparum* et sur cellules MRC-5.
- Tableau 4 :** Caractéristiques géographiques et bioclimatiques de Ouargla.
- Tableau 5 :** Résultat des tests phytochimiques sur les trois parties d'*A. pungens* L.
- Tableau 6 :** Familles de composés d'*Aristida pungens* L.
- Tableau 7 :** Rendements des extraits d'*Aristida pungens* L.
- Tableau 8 :** Activité antiplasmodique *in vitro* des 6 extraits d'*Aristida pungens* L. au méthanol et à l'acétate d'éthyle sur *Plasmodium falciparum* et cytotoxicité sur cellules MRC-5 (travail personnel).
- Tableau 9 :** Plan de la plaque 24 puits pour le test d'inhibition de la croissance des trypanosomes.
- Tableau 10 :** Observation au microscope de l'effet des six extraits d'*Aristida pungens* L. sur *Trypanosoma brucei* à trois concentrations différentes après 24 heures.
- Tableau 11 :** Observation au microscope de l'effet des six extraits d'*Aristida pungens* L. sur *Trypanosoma brucei* à trois concentrations différentes après 48 heures.
- Tableau 12 :** Pourcentage d'inhibition *in vitro* de la croissance des *Trypanosoma brucei* par les extraits d'*Aristida pungens* L par rapport à l'activité de la calyculine à 50nM.
- Tableau 13 :** Pouvoir antibactérien exprimé en diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches des extraits d'*Aristida pungens* L.

Tableau 14 : Résultats de l'ensemble des activités anti-microbiennes des extraits d'*A. pungens* L.

Tableau 15 : Estimation de l'activité de l'extrait GM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Tableau 16 : Estimation de l'activité de l'extrait GA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Tableau 17 : Estimation de l'activité de l'extrait EM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Tableau 18 : Estimation de l'activité de l'extrait EA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Tableau 19 : Estimation de l'activité de l'extrait NM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Tableau 20 : Estimation de l'activité de l'extrait NA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Tableau 21 : Estimation de l'activité de l'*Amodiaquine* sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Sommaire

	Page
INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Chapitre I : Etude botanique et phytochimique d'<i>Aristida pungens</i> L	3
I. Etude botanique	3
I.1. Classification	3
I.2. Famille des Gramineae ou Poaceae	3
I.2.1. Description	3
I.2.2. Caractéristiques botaniques générales	4
I.2.2.1. Feuilles et tiges	4
I.2.2.2. Fleurs et fruits	6
I.2.3. Caractère xérophyte des graminées	6
I.2.3.1. Adaptation à la sécheresse	6
I.2.3.2. Propriété de rétention d'eau	6
I.2.3.3. Réduction de la vitesse d'évaporation	7
I.3. L'espèce <i>Aristida pungens</i> L.	7
I.3.1 Répartition géographique	8
I.3.2. Caractéristiques botaniques	8
I.3.3. Intérêt économique	9
I.3.4. Usage traditionnel	10
I.3.5. Composition chimique d' <i>Aristida pungens</i> L.	11
II. Principaux groupes de composés présents dans les plantes	12
II.1. Eléments actifs des plantes	12
II.1.1. Glycosides	12
II.1.2. Phénols	13
II.1.3. Pigments	14
II.1.4. Flavonoïdes	14
II.1.4.1. Définition	14
II.1.4.2. Structures	14
II.1.4.3. Propriétés physico-chimiques	15
II.1.4.4. Propriétés pharmacologiques	15
II.1.5. Anthraquinones – Anthracénosides – Emodols	16
II.1.5.1. Définition	16
II.1.5.2. Propriétés physico-chimiques	17
II.1.5.3. Caractérisation	17
II.1.5.4. Rôles pharmacologiques	17
II.1.6. Tanins	17
II.1.6.1. Définition et structures	17
II.1.6.2. Propriétés physico-chimiques	19
II.1.6.3. Caractérisation	19
II.1.6.4. Propriétés biologiques et thérapeutiques des tanins	19
II.1.7. Polysaccharides	20
II.1.8. Vitamines	20
II.1.9. Les minéraux	20
II.1.10. Alcaloïdes	21
II.1.10.1. Définition	21
II.1.10.2. Structures	21
II.1.10.3. Propriétés physico-chimiques	22

II.1.10.4. Caractérisation.....	22
II.1.10.5. Actions pharmacologiques.....	23
II.1.11. Saponosides.....	23
II.1.11.1. Définition.....	23
II.1.11.2. Structures.....	24
II.1.11.3. Propriétés physico-chimiques.....	25
II.1.11.4. Propriétés pharmacologiques.....	25
II.1.12. Stéroïdes et stérols.....	26
II.1.12.1. Définition des stéroïdes.....	26
II.1.12.2. Biosynthèse.....	26
II.1.12.3. Propriétés physico-chimiques.....	26
II.1.12.4. Définition des stérols.....	26
II.1.12.5. Biosynthèse des stérols.....	26
II.1.12.6. Structures.....	27
II.1.12.7. Révélation et identification des Stéroïdes et stérols.....	27
II.1.12.8. Quelques exemples des stéroïdes hormonaux et leurs effets biologiques.....	28
Chapitre II : <i>Plasmodium falciparum</i>	29
I. Le parasite.....	29
I.1. Caractères généraux de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
I.2. Cycle des développement de <i>Plasmodium falciparum</i>	29
I.2.1. Chez l'homme.....	30
I.2.1.1. Développement préérythrocytaire.....	30
I.2.1.2. Phase sanguine, cycle érythrocytaire.....	30
I.2.2. Chez le moustique : cycle sexué sporogonique.....	31
II. La pathologie de <i>Plasmodium falciparum</i>	33
II.1. La malaria causée par <i>P. falciparum</i>	33
II.1.1. Description de la maladie.....	33
II.1.2. Epidémiologie.....	33
II.1.3. Signe cliniques.....	34
III. Quelques exemples de travaux sur les composés possédant une activité contre <i>P. falciparum</i>	35
III.1. Le CJ-15.801.....	35
III.2. Extrait de racines de <i>Scrophularia lepidota</i>	36
III.3. Étude de l'activité de 33 plantes africaines contre <i>Plasmodium falciparum</i>	36
Chapitre III : <i>Trypanosoma brucei</i>	38
I. Le parasite.....	38
I.1. Caractères généraux.....	38
I.2. Cycle de développement.....	38
I.2.1. Cycle de développement de <i>T. brucei</i> chez la mouche Tsé-tsé.....	38
I.2.1.1. Phase d'établissement.....	38
I.2.1.2. Phase de maturation.....	38
I.2.2. Le développement de <i>T. brucei</i> chez l'homme.....	39
II. La pathologie du <i>Trypanosoma brucei</i>	40
II.1. La trypanosomiase humaine africaine T.H.A.....	40
II.1.1. T.H.A causée par <i>T. b. gambiense</i>	40
II.1.2. T.H.A causée par <i>T. b. rhodesiense</i>	40
II.2. Epidémiologie.....	40
II.3. Signes cliniques.....	41
III. Disponibilité des traitements.....	42

III.1. Le CGP 40 215	42
III.2. L'atoxyl.....	43
III.3. Les chimiothérapies futures contre les trypanosomiasés humaines africaines	43
III.3.1. Diamidines	44
III.3.2. Composants nitrohétérocycliques	44
Chapitre IV : Lutte contre les bactéries pathogènes	45
I. Problématique de la lutte antibactérienne.....	45
II. Pouvoir antimicrobien des produits naturels: les huiles essentielles.....	45
II.1. Familles de composés responsables de l'activité antimicrobienne.....	45
III. Description de quelques pathogènes bactériens.....	46
III.1. <i>Escherichia coli</i>	46
III.1.1. Habitat.....	46
III.1.2. Pathogénicité.....	46
III.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
III.2.1. Habitat et rôle pathogène	47
III.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	47
III.3.1. Habitat et rôle pathogène	47
III.4. <i>Micrococcus luteus</i>	48
DEUXIEME PARTIE : EXPERIMENTATION ET RESULTATS.....	49
Chapitre I : Etude botanique et phytochimique d'<i>Aristida pungens</i> L.....	49
I. Matériel et méthodes	49
I.1. Matière végétale	49
I.1.1. Identification.....	49
I.1.2. Le choix de la plante.....	49
I.1.3. Origine géographique et période de récolte.....	49
I.1.4. Préparation et conservation du matériel végétal.....	49
I.1.5. Examen phytochimique	50
I.1.5.1. Introduction	50
I.1.5.2. Mise en évidence des flavonoïdes	51
I.1.5.3. Mise en évidence des Stérols stéroïdes	51
I.1.5.4. Mise en évidence des Tanins.....	52
I.1.5.5. Mise en évidence des Alcaloïdes.....	52
I.1.5.6. Mise en évidence des Composés réducteurs	52
I.1.5.7. Mise en évidence des Emodols.....	53
I.1.5.8. Mise en évidence des Saponosides.....	53
II. Résultats et discussions	53
Chapitre II : Etude du pouvoir d'inhibition sur <i>Plasmodium falciparum</i>.....	55
I. Matériel et méthodes	55
I.1. Extraction	55
I.2. Protocole général d'extraction.....	55
I.3. Solubilisation des produits	56
I.4. Tests sur <i>Plasmodium falciparum</i>	56
I.4.1 Culture <i>in vitro</i>	56
I.4.2. Estimation de la parasitémie par frottis	57
I.4.3. Définition de l'hématocrite.....	57
I.4.4. Préparation des plaques de microtitration	58
I.4.5. Marquage au [3H]hypoxanthine.....	58
I.5. Mesure de la cytotoxicité des extraits d' <i>A. pungens</i> L. sur les cellules de mammifères MRC-5	59
I.5.1. Principe.....	59

I.5.2. Manipulation.....	59
II. Résultats et discussion.....	60
II.1. Rendement d'extraction	60
II.2. Estimation de l'activité des extraits d' <i>A. pungens</i> L. sur le <i>P. falciparum</i>	61
II.2.1. Extrait GM	62
II.2.2. Extrait GA	62
II.2.3. Extrait EM.....	63
II.2.4. Extrait EA.....	63
II.2.5. Extrait NM	64
II.2.6. Extrait NA	64
II.2.7. Amodiaquine	65
II.3. Détermination de l'indice de sélectivité SI	65
II.4. Interprétation des résultats	67
II.5. Conclusion.....	69
Chapitre III : Etude du pouvoir d'inhibition sur <i>Trypanosoma brucei</i>	70
I. Matériel et méthodes	70
I.1. Effet inhibiteur des extraits d' <i>A. pungens</i> L. sur la croissance des trypanosomes.....	70
I.2. Incorporation du MTT aux cellules de <i>T. brucei</i> et mesure de l'absorbance	71
I.3. Fixation au méthanol des cellules de <i>T. brucei</i> et observation au microscope à fluorescence.....	72
I.3.1. Principe.....	72
I.3.2. Protocole expérimental.....	72
II. Résultats et discussion.....	73
II.1. Observation des trypanosomes sur plaque 24 puits	73
II.2. Etude de l'activité trypanocide des extraits par spectrophotométrie (MTT)	74
II.3. Résultats de l'observation au microscope à fluorescence des <i>T. brucei</i>	75
III. Interprétation des résultats et discussion	78
IV. Conclusion	79
Chapitre IV : Etude de l'inhibition de la croissance de souches bactériennes par les extraits d'<i>A. pungens</i> L.	80
I. Matériel et méthodes	80
I.1. Préparation des souches.....	80
I.2. Effets antibactériens des différents extraits.....	81
II. Résultats et discussion.....	81
II.1. Interprétation et discussion	82
II.2. Conclusion sur l'inhibition de la croissance des souches bactériennes... ..	84
II.3. Comparaison entre les différentes activités anti-microbiennes des extraits d' <i>Aristida pungens</i> L	85
CONCLUSION GENERALE	86
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	87
ANNEXES	99

INTRODUCTION

Les substances naturelles constituent toujours un gisement naturel pour la mise au point d'un nouveau médicament. Actuellement plus de 60 % des médicaments sont issus directement ou indirectement des substances naturelles.

Compte tenu de la panoplie limitée d'antimicrobiens existants, la recrudescence des médicaments chez les patients immunodéprimés et les nombreux cas de résistances de par le monde, il s'avère important de rechercher de nouvelles molécules actives.

En effet, le paludisme affecte entre 300 et 500 millions de personnes chaque année (Denis et Mouchet, 1991) entraînant plus de 1,5 à 2,7 millions de morts. Environ 90 % de ces morts surviennent en Afrique où la maladie est la cause principale de mortalité chez les moins de 5 ans (Waters et al., 2005).

Par ailleurs, la trypanosomiase humaine africaine (THA - maladie du sommeil) est une maladie mortelle en l'absence de traitement. L'OMS estime le nombre de nouveaux cas annuels entre 300 000 et 500 000 et un taux de mortalité annuel pouvant atteindre les 60 000.

L'ensemble de ces données bibliographiques représente une cible de choix pour un travail de recherche sur les plantes médicinales, notamment, une étude antimicrobienne sur les extraits d'*Aristida pungens* L.

Ainsi, la bonne activité antifongique et antibactérienne obtenue sur les extraits d'*Aristida pungens* L. respectivement contre *Candida albicans* et *Pseudomonas aeruginosa* lors des travaux de thèse de Dr Bouhadjera K. nous a amené à poursuivre l'investigation phytochimique et biologique de cette plante à partir des extraits bruts des différentes autres parties telles que la gaine, les entre-nœuds et les nœuds.

Notre présent travail consiste donc à évaluer diverses activités biologiques à savoir activité antipaludique, activité trypanocide et activité antibactérienne.

Dans une première partie, nous présentons une synthèse bibliographique. Puis, nous effectuons des tests phytochimiques pour détecter les différentes familles de

composés présents dans les différentes parties de la plante déjà citées (la gaine, le nœud et l'entre-nœud), suivi d'une extraction sélective de ces familles.

Puis, nous estimons l'activité de ces différents extraits contre le développement de *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme mortel pour l'homme.

Ensuite, nous étudions leur activité trypanocide sur *Trypanosoma brucei*, l'agent de la maladie du sommeil qui sévit en Afrique.

Enfin, nous testons leur activité antibactérienne sur quelques souches Gram + et Gram-.

CHAPITRE I : Etude botanique d'*Aristida pungens* L.

I. Etude botanique

I.1. Classification

L'espèce *Aristida pungens* L. est classée selon Chaudefaud et Emberger (1960), Quezel et Santa (1963) et Ozenda (1983) comme suit :

Embranchement : Spermaphytes.

Sous-embranchement : Angiospermes.

Classe : Monocotylédones.

Série : Monocotylédone hypogynes

Ordre : Glumiflorales.

Famille : Gramineae (Poaceae)

Sous famille : Epanicoïdées.

Tribu : Aristideae

Genre : *Aristida*.

Espèce : *Aristida pungens* L.

I.2. Famille des Gramineae ou Poaceae

I.2.1. Description

Les graminées comprennent plus de 9000 espèces décrites, groupées en 635 genres et 6 sous familles ; Festucoïdées, Panicidées, Chloridoïdées, Bambusoïdées, Oryzoïdées, Phragmite formes.

Les graminées constituent sur d'immenses étendues des peuplement homogènes : prairies des régions tempérées et froides, steppes des régions sèches, savanes, jungles à bambous des régions tropicales, marais à roseaux, etc. Leur existence a été la condition préalable de l'extension des mammifères herbivores et granivores marquant le début du tertiaire (Chevalier et al., 2001).

1.2.2. Caractéristiques botaniques générales

Le nom de la famille des Poaceae dérive de *Poa*, le genre qui inclut les pâturins. Le terme de Gramineae est une appellation plus ancienne qui désigne le même groupe de plantes et qui a été conservée comme alternative, suivant une décision prise sur le plan international par les taxonomistes. Les deux noms Gramineae et Poaceae sont corrects. Les Gramineae sont soit des plantes annuelles, soit des plantes vivaces.

Le terme de « graminées ornementales » comprend habituellement les herbes vraies (Poaceae) ainsi que des familles botaniques, à l'aspect d'herbes.

En dehors de leur feuillage typique, très étroit, qui les fait apparaître en tant qu'"herbes", ces familles végétales partagent une autre caractéristique : elles appartiennent toutes au sous groupe des monocotylédones. Les nervures des feuilles de monocotylédones sont typiquement parallèles, et les bords des feuilles assimilatrices sont en général droits, sans dents ni entailles notables. A part quelques exceptions, les bambous par exemple, la plupart des monocotylédones sont également des plantes herbacées, ne développant pas de tissus ligneux (Chevalier et al., 2001).

Les graminées ornementales dépassent de loin toutes les autres plantes cultivées par leurs qualités de transluminescence. Aussi bien les fleurs que les feuilles se distinguent par une forte transparence (Darke, 2003).

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 tiges sont habituellement creuses (chaumes, bambous). Il existe des tiges piquantes (maïs) et des tiges ligneuses (certains bambous) (Chevalier et al., 2001).

1.2.2.1 Feuilles et tiges

Les feuilles, issues des nœuds, forment deux rangs et sont constituées de deux parties : l'enveloppe et le pédoncule. L'enveloppe, caractéristique distinctive des graminées, entoure la tige et soutient la zone située juste au-dessus de chaque nœud, elle est 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 (Van der Beek et al., 1998).

Une autre caractéristique remarquable des graminées est la ligule (fig. 1), languette poilue ou membraneuse placée à l'endroit où l'enveloppe de la feuille rejoint le pédoncule. La fonction de la ligule est toujours inconnue, mais on pense qu'elle empêche l'humidité de s'accumuler entre tige et enveloppe (Roux et al., 1998).

Le pédoncule des feuilles est long et étroit, présentant des veines parallèles, de tailles et de formes 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 (Chevalier et al., 2001).

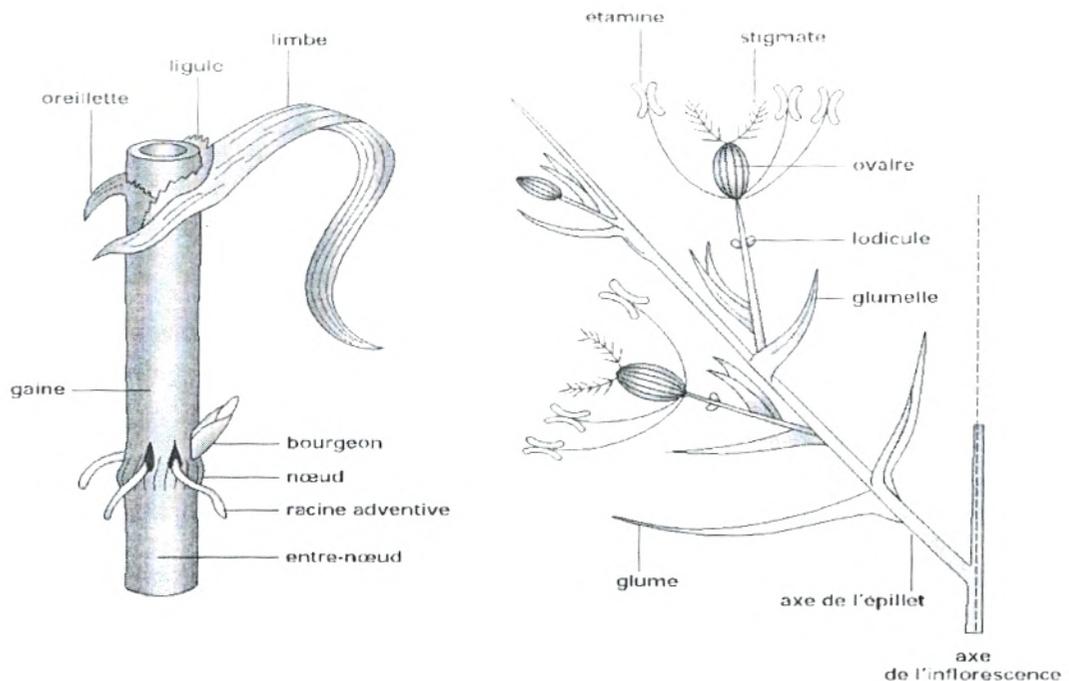


Figure 1 : Morphologie générale d'une espèce appartenant à la famille des Gramineae (Jovet et al., 1979).

L'utilisation des graminées comme pelouses est une application de ces caractéristiques, car elles continuent à pousser même après la tonte. En outre, les graminées supportent d'être brûlées, broutées et piétinées et deviennent dominantes après de tels accidents (Roux et al., 1998).

1.2.2.2 Fleurs et fruits

Les fleurs des graminées sont groupées en longues inflorescences appelées épis ou panicules. La majorité des graminées sont pollinisées par le vent, c'est pourquoi leurs fleurs sont très réduites et très simples (Delaveau, 1999).

Les fleurs sont disposées en deux rangs dans des épillets. Chacune possède deux bractées (feuilles situées à la base des fleurs), appelées glumelles (Fig. 1). Elles ne comportent ni pétales ni sépales mais généralement trois étamines et deux stigmates plumeux surmontant un ovaire supère (Delaveau, 1999).

1.2.3. Caractère xérophyte des Graminées

Au Sahara, le tapis végétal est discontinu et très irrégulier. La végétation tend à se concentrer dans des zones où se trouve le plus d'eau et où les conditions climatiques sont les plus favorables. Cette concentration est la règle au Sahara central, où une humidité résiduelle persiste dans le sol (Ozenda, 2004).

1.2.3.1 Adaptation à la sécheresse

Le problème de l'adaptation au climat désertique est donc celui de la subsistance pendant les longues périodes sèches. Cette adaptabilité est obtenue de différentes façons. Une partie des plantes raccourcit son cycle de développement de manière à supprimer toutes ses parties aériennes pendant la période de sécheresse, qu'elle traverse. Elles forment soit des graines soit des organes souterrains tels que des bulbes et des rhizomes. D'autres au contraire maintiennent leurs parties aériennes mais présentent un ensemble de dispositifs anatomiques qui ont pour effet de limiter la perte d'eau par évaporation (Lampard, 1994).

1.2.3.2 Propriété de rétention d'eau

Chez une plante normale, la paroi externe de l'épiderme est épaissie par une cuticule faite d'un dépôt de substances cireuses peu perméables, de sorte que seule une partie de la transpiration se fait à travers cette paroi. Une plus grande quantité de vapeur d'eau sort alors à travers des pores microscopiques (les stomates) qui interrompent la continuité de l'épiderme (Ozenda, 2004).

Ces stomates situés surtout sur la face intérieure des feuilles, sont des orifices bordés par deux cellules spécialisées qui règlent le degré d'ouverture du stomate. Il en résulte que l'intensité de la transpiration est d'autant plus grande que les stomates sont plus nombreux et la cuticule plus mince ; en outre, elle augmente avec la température, la sécheresse et l'agitation de l'air, suivant en cela les lois du phénomène physique de l'évaporation (Boiteau, 1995).

Les adaptations des plantes xérophytes sont dues à la réduction de la surface foliaire, qui diminue la vitesse d'évaporation et la constitution de réserves d'eau à l'intérieur des tissus (Ozenda, 2004).

Cette réduction foliaire consiste en une diminution de la grandeur et du nombre de feuilles. Ainsi, au Sahara certaines espèces du Sahara présentent des feuilles de petite taille, souvent même réduite à une sorte d'écaille (Lampard, 1994).

1.2.3.3 Réduction de la vitesse d'évaporation

L'économie que présente la diminution de la surface foliaire est rendue plus efficace encore par les mécanismes ayant pour effet de freiner la transpiration à travers les épidermes. Les graminées présentent une cuticule épaisse et surtout doublée sur leur face interne par des assises cellulaires sclérifiées, c'est-à-dire à parois épaissies. Chez diverses graminées les feuilles sont enroulées suivant une longueur en prenant la forme d'un cylindre creux et les stomates se trouvent localisées sur l'épiderme supérieur. Enfin la forme générale de la plante est modifiée de manière à réduire l'échauffement. Les feuilles disposent leurs limbes parallèlement aux rayons solaires et non perpendiculairement comme dans les autres régions (Ozenda, 2004).

1.3. L'espèce *Aristida pungens* L.

Aristida pungens L. (Fig. 2) est cette herbe que l'on rencontre un peu partout dans les ergs d'un bout à l'autre du Sahara. En arabe, on l'appelle le "**drinn**", le pâturage qui a permis aux dromadaires de s'installer au Sahara et aux



Figure 2: Photo d'*Aristida pungens* L. en milieu naturel

caravanes de jadis de sillonner le désert pour transporter les marchandises d'une "rive" à l'autre.

I.3.1. Répartition géographique

Aristida pungens L. est répandue au Sahara occidental et en Asie centrale. On la trouve dans la partie orientale macro came. (Bellakhdar, 1997). Schmell (1977) rapporte que dans le Sahara oriental, les sables mouvants présentent une végétation herbacée avec des *Aristida*.

Le genre *Aristida* est aussi présent dans l'Atlas saharien et les hauts plateaux (Quezel et Santa, 1962). Il a été signalé aux Etats-Unis (Vestal, 1971) et en Australie (Mott, 1972) mais aussi au Moyen Orient notamment en Egypte (Zohary, 1973) et au Sirai (Danin, 1991).

Ozenda (1983) a recensé dans le Sahara une vingtaine d'espèces qui se distinguent entre elles par la variation morphologique des arêtes et des glumelles.

I.3.2. Caractéristiques botaniques

Nous empruntons à Quezel et Santa (1962) la description du genre *Aristida* suivante :

Ce genre est voisin de *stipa*, panicule lâche (très rarement compacte). Les épillets sont indépendants et à fleurs fertiles, la lemme est convolutive autour de la paléole et très caractéristique puisqu'elle porte un callus plus ou moins barbu à la base et surmonté par l'arête de la lemme divisée en trois branches au dessus d'une partie basale appelée « colonne ». Les branches (Fig. 3) peuvent être toutes trois nues, ou la médiane seulement plumeuse (Quezel et Santa, 1962).

La germination du Drinn se fait à 25C°, température considérée comme optimale. Elle est caractérisée par deux périodes de vie : une vie ralentie (Août à mars) et une vie active (avril à juillet) (Bouzidi, 1988).



Figure 3 : Morphologie générale de la partie aérienne d'*Aristida pungens* L.
(Ozenda, 1983).

Légendes : a : arête ; c : caryopse ; en : entrenoeuds ; f : feuille ; g : gaine.

I.3.3. Intérêt économique

Outre l'utilisation de l'*Aristida pungens* L. comme brise-vent qui permet d'immobiliser les dunes de sable (Toutain, 1979), cette espèce sert d'aliment fourrager pour de nombreux animaux (Ozenda, 1983). Ses semences sont aussi comestibles (Diarbi, 1989).

Par ailleurs, la richesse en fibres fait de cette espèce une plante qui commence à susciter un intérêt particulier pour l'industrie papetière, en effet des tentatives d'obtention de papier d'*Aristida* ont été menées avec succès par Youcef (1991).

D'autre part, la présence de cellules riches en chloroplastes laisse penser que cette espèce est de type C_n (où $n = 4$; pendant la photosynthèse le premier produit formé est un acide à quatre carbones). Cette hypothèse est renforcée par son étendue dans des zones pauvres en eau. (Boukli-Hasane, 1990 ; Harche et al., 1991 ; Mekhaldi, 1994). *Aristida pungens* serait ainsi la deuxième plante en C_4 avec *Aristida latifolia* (Veno, 1992).

I.3.4. Usage Traditionnel

Les nomades utilisent les tiges d'*Aristida pungens* pour la cicatrisation des plaies et dans le tissage des cordes, alors que les pêcheurs des régions du Sahara occidental s'en servent pour fabriquer les filets de pêche. Sa décoction permet de soulager les douleurs rhumatismales (Bellakhdar, 1997). L'usage traditionnel d'*A. pungens* est reporté sur le tableau 1.

Les graines d'*Aristida pungens* sont utilisées pour faire une farine appelée Lûl au Sahara Algérien, que l'on utilise dans la préparation de galettes.

Tableau 1 : Usage d'*Aristida pungens* en médecine traditionnelle au Tafilalet (Région d'Errachidia, Maroc) (El Rhaffari et al., 2002 et 2003).

Partie utilisée	Préparation	Administration et usage populaires
Tige	Broyer	Appliquer localement : Cicatrisation des blessures, cataplasme, arthrite rhumatoïde.
	Poudre	Appliquer localement : Cicatrisation des blessures.
	Poudre dans l'huile	Onguent : Arthrite rhumatoïde, douleurs musculaires.

I.3.5. Composition chimique des tiges et des feuilles d'*Aristida pungens* L.

Les résultats obtenus de l'examen phytochimique des tiges et des feuilles d'*Aristida pungens* L. a déjà fait l'objet d'un travail de magister (Baba Ahmed, 2005) et les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les différentes familles de composés présents dans les tiges et les feuilles d'*Aristida pungens* L. (Baba Ahmed, 2005).

Famille de composés	Dans les tiges	Dans les feuilles
Flavonoïdes	+	+
Tanins	+	+
Stérols et stéroïdes	+	+
Coumarines	+	+
Alcaloïdes	-	-
Anthracénosides	-	-
Anthocyanosides	-	-
Amidon	+	+
Emodols	-	-
Anthraquinones	-	-
Composés réducteurs	+	+
Huiles volatiles	-	-
Saponosides	+	+

II. Principaux groupes de composés présents dans les plantes

Les substances chimiques qui constituent les plantes et qui interviennent dans leur métabolisme appartiennent à deux catégories. La première catégorie comprend les molécules relativement simples, qui sont des substances minérales (eau, métalloïdes, métaux). La seconde catégorie comporte des substances organiques constituées de molécules complexes. Dans cette dernière catégorie, trois familles sont particulièrement importantes, ce sont les glucides (sucres), les lipides (graisses) et les protides (acides aminés, peptides, protéines).

II.1. *Eléments actifs des plantes*

La camomille allemande, par exemple, est utilisée depuis des milliers d'années contre les troubles digestifs, ou encore l'alvès qui était déjà connu du temps de Cléopâtre pour adoucir la peau. Or, ce n'est que récemment que les éléments actifs à l'origine des actions thérapeutiques des plantes ont été isolés et étudiés. Il est indispensable de connaître la composition des plantes pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme (Larousse, 2001).

II.1.1. Glycosides

Les glycosides sont une classe de composés chimiques présente dans les plantes. Ils se dissocient en sucres, dont le glucose, et en d'autres substances en présence d'enzymes. Chaque glycoside est hydrolysé par une enzyme, en général une enzyme spécifique qui se trouve dans la plante même. Les enzymes et les glycosides sont stockés dans des cellules végétales séparées jusqu'à ce que les produits de réaction des glycosides soient requis et que les enzymes soient activées.

Ainsi le goût amer des glycosides peut empêcher les oiseaux et les insectes de manger les graines et les fruits avant leur pleine maturité : moment où les glycosides ont été transformés en sucres. Lorsqu'une plante est abîmée, les enzymes effectuent l'hydrolyse des glycosides en produits, tels que des composés phénolés et des acides, dont l'action antiseptique évite le pourrissement des parties abîmées.

Les glycosides sont solubles dans l'eau. Ils sont obtenus à partir des plantes par extraction en milieu aqueux. Ce sont pour la plupart des solides cristallins incolores au goût amer. Parmi les glycosides importants, l'indigotine (Indigotier) est utilisée en

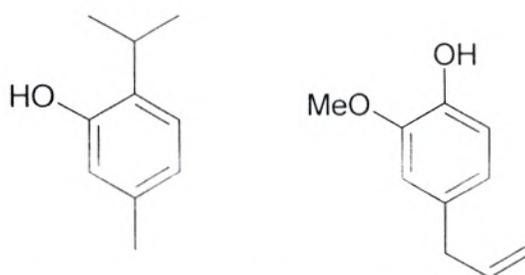
teinture et la digitaline (Digitale) employée en médecine pour ralentir le rythme cardiaque. De plus, les saponines, agents moussants, sont très utilisées dans l'industrie et en médecine. Notons aussi l'action directe et puissante de la digitoxine et de la digoxine sur le cœur (possède sensiblement le même effet que la digitaline). Ces derniers permettent de maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement. Ils sont également diurétiques (Bruneton, 1999 ; Larousse, 2001).

II.1.2. Phénols

Les polyphénols sont des pigments très abondants dans la nature. Ils sont responsables des arômes et des couleurs des végétaux. Il existe une très grande variété de phénols, des composés simples comme l'acide salicylique, molécule donnant par synthèse l'aspirine et des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides (Martin, 1991).

Les polyphénols sont pour la plupart solubles dans l'eau, ils ont un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 daltons et peuvent se complexer avec les protéines (Haslam, 1995). Ils sont anti-inflammatoires et antiseptiques. Le Thymol (fig. 4-1) qui fait partie de la famille des phénols est utilisé comme antiseptique contre les champignons, bactéries et autres parasites, l'Eugénol est une huile essentielle de la même famille caractérisée par un groupement hydroxyle greffé sur le noyau benzénique (fig. 4-2). Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales (Larousse, 2001).

Le plus grand intérêt de la plupart des phénols naturels ou des phénols synthétiques réside dans leur emploi comme intermédiaires de synthèse : parfums, colorants, produits pharmaceutiques et phytosanitaires (Martin, 1991).



1) Thymol (thym) 2) Eugénol (Clou de girofle)

Figure 4 : Quelques structures importantes de phénols et polyphénols (Paul, 1997).

II.1.3. Pigments

Une substance est un pigment si elle absorbe la lumière visible. De cette définition même ressort la grande hétérogénéité de ce groupe. Les fonctions chimiques responsables de l'absorption de la lumière sont appelées chromophores. Il s'agit en général soit de liaisons riches en électrons délocalisés, soit, mieux encore, de la conjugaison de ces liaisons. Il existe également des groupes appelés auxochromes qui sont des groupes, ou fonctions chimiques, susceptibles de modifier la coloration introduite par un chromophore (Bruneton, 1999).

II.1.4. Flavonoïdes

II.1.4.1. Définition

Les flavonoïdes sont des pigments polyphénoliques. On désigne sous le terme de flavonoïdes (*flavus*, jaune) plusieurs groupes de substances telles que les flavonols, les flavanones et les anthocyanidols, pouvant être rattachées par leur structure à la flavone (fig. 5-1) ou 2-phényl chromone (Goodwin, 1965).

Ils sont d'origine strictement végétale et ne sont pas présents chez les micro-organismes, les champignons et les lichens. Les flavonoïdes sont responsables de la coloration de nombreuses fleurs et de leurs fruits, et parfois des feuilles, jeunes ou sénescents (Harborne, 1993).

Les flavonoïdes (fig. 5) existent le plus souvent sous forme de glycosides tels que le rutinoside 3-quercétol rutinoside du sarrasin. Le premier flavonoïde obtenu à l'état pur est le morin (fig. 5-3), isolé par E. Chevreul en 1814 de *Morus tinctoria* (Brouillard, 1988).

II.1.4.2. Structures

À l'exception des chalcones, ces pigments sont toujours tricycliques. Leur squelette carboné C6-C3-C6 est caractérisé par la présence de deux cycles benzéniques A et B et d'un hétérocycle oxygéné. L'ouverture du cycle oxygéné caractérise les chalcones (fig. 5-3) (Harborne, 1993).

Les flavonoïdes sont formés de la condensation de trois unités acétate et d'un acide cinnamique provenant de la phénylalanine ou de la tyrosine. Cette condensation conduit d'abord aux chalcones, intermédiaires vers les flavones et les anthocyanines d'une part, et vers les isoflavones (fig.5-5) et les auronnes d'autre part (Brouillard, 1988).

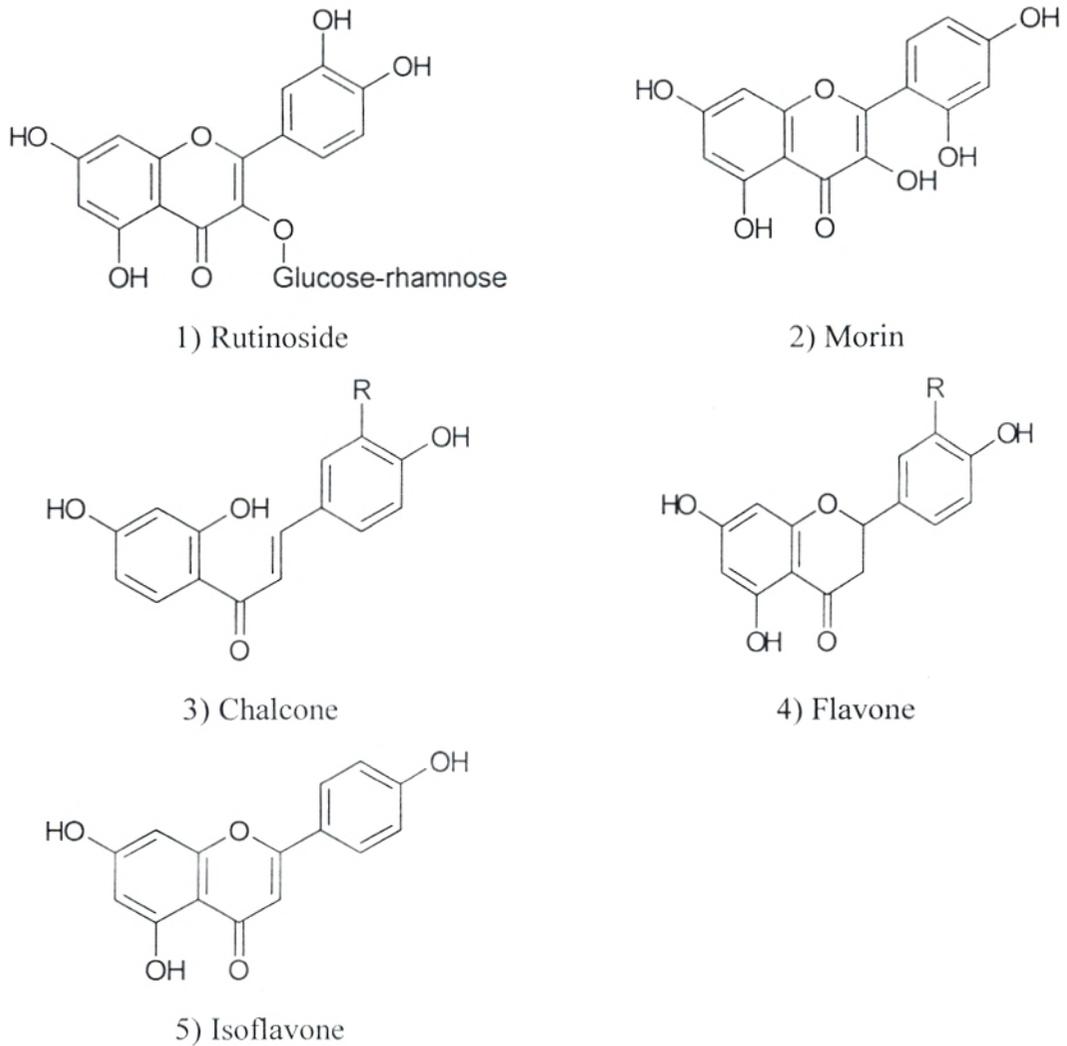


Figure 5 : Quelques structures importantes des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

II.1.4.3. Propriétés physico-chimiques

Les hétérosides sont hydrosolubles et solubles dans les alcools et les solutions d'hydroxyde alcalin (Bruneton, 1999).

II.1.4.4. Propriétés pharmacologiques

Antioxydants, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation.

Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, et des effets protecteurs sur le foie. Des flavonoïdes comme l'héspéridine et la rutine, présentes dans plusieurs plantes, dont le sarrasin (*Fagopyrum exulentum*), renforcent les parois des capillaires et préviennent l'infiltration dans les tissus voisins. Les isoflavones, que l'on trouve par exemple dans le trèfle rouge (*Trifolium pratense*), à effets

oestrogéniques, sont efficaces dans le traitement des troubles liés à la ménopause (Brouillard, 1988).

Les flavonoïdes semblent être étroitement liés à leur exceptionnelle capacité à piéger et à neutraliser les radicaux libres (Sato et al., 2001). Certains possèdent une activité hypoglycémiant comme l'épicatchine isolé de l'épicarpe de *Pterocarpus marsupium* Roxb (Robin et al., 1987).

II.1.5. Anthraquinones – Anthracénosides – Emodols

II.1.5.1. Définition

Les quinones sont des pigments possédant des couleurs pouvant aller du jaune au rouge-violet que l'on rencontre dans les règnes animal et végétal. Leur existence est cependant souvent masquée par d'autres pigments, ou bien encore par leur situation à l'intérieur des organismes. Les quinones sont classées, selon le nombre de noyaux aromatiques, en benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones et phénanthraquinones (Tsutomu et Hisashi, 1971).

Les anthracènes forment un groupe important. Beaucoup montrent une répartition des oxygènes caractéristique d'une origine polyacétique. Ils existent fréquemment sous forme de glucosides, en particulier chez les Rubiacées. L'émodyne (fig. 6-1) est trouvée chez les champignons, les lichens et les plantes supérieures. Le couplage oxydatif peut conduire à des dimères comme l'hypéricine isolée du millepertuis (*Hypericum hirsutum*) (Timberlake et Henry, 1988).

Des anthraquinones, identifiées chez les insectes, ont été utilisées pour teindre les vêtements comme l'acide carminique des *Coccidae* mexicaines, l'acide kermésique (fig. 6-2) de la « punaise » femelle du chêne kermès et l'acide laccaïque de *Laccifer lacca*. Les rhodocomatuline, rubrocomatuline, rhodoptométrine et leurs dérivés sont des anthraquinones d'invertébrés marins appartenant à la famille des Crinoïdes (Thomson, 1987 ; Assoc, 1991).

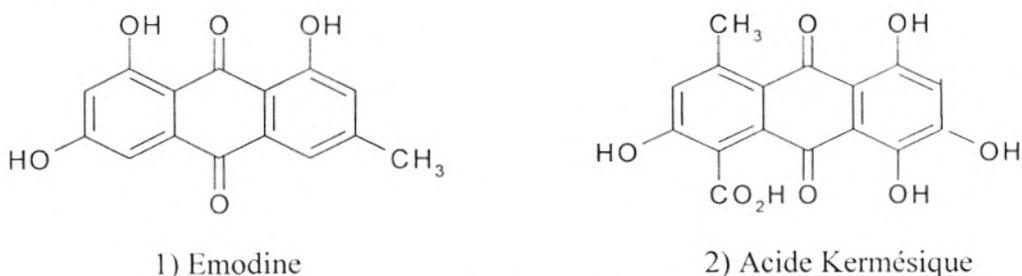


Figure 6: Structure de l'Emodyne et de l'Acide Kermésique (Bruneton, 1999).

II.1.5.2. Propriétés physico-chimiques

Les anthraquinones sont des composés colorés en orange rouge, très peu solubles dans l'eau froide (sauf en milieu alcalin), solubles dans les solvants organiques et les alcools (Tsutomu et Hisashi, 1971).

II.1.5.3. Caractérisation

Elles sont mises en évidence par la réaction de *Bornträger* qui n'est positive qu'avec les formes oxydées libres. En présence de l'acétate de magnésium en milieu méthanolique, la coloration rouge obtenue est plus intense et plus stable à la lumière que celle qui résulte de la simple réaction avec KOH.

II.1.5.4. Rôles pharmacologiques

Le séné (*Cassia senna*) et la rhubarbe de chine (*Rheum palmatum*) sont riches en anthraquinones. Elles ont, toutes deux, une action contre la constipation par leurs effets irritant et laxatif sur le gros intestin. En effet, elles provoquent des contractions des parois intestinales et stimulent les évacuations dix heures après la prise. Elles rendent les selles plus liquides, facilitant ainsi le transit intestinal (Timberlake et Henry, 1988).

II.1.6. Tanins

II.1.6.1. Définition et structures

Les tanins sont des composants polyphénoliques d'origine végétale. Ils possèdent la propriété de tanner la peau, c'est-à-dire de la rendre imputrescible en se fixant sur les protéines. Les tanins sont très répandus dans les arbres, les rosacées, les éricacées et les sterculiacées. Ils se localisent dans les vacuoles des cellules végétales, souvent associées à des protéines, à des alcaloïdes ou à des oses, sous forme de tanoïde (Larousse, 2001). Deux classes de tanins sont connues : les tanins hydrolysables et les tanins condensés.

- Les tanins hydrolysables (fig. 7-1) donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique (fig. 7-3) soit de l'acide éllagique (fig. 7-4) (Bruneton, 1999). Ce sont des esters d'un sucre et d'un nombre variable de molécules d'acide phénolique. Le sucre est généralement le glucose et l'acide phénolique est l'acide gallique dans le cas des tanins galliques.

- Les tanins condensés donnent après hydrolyse de l'acide éllagique, non hydrolysable, qui conduit, par oxydation, au pyrocatechol (fig. 8) de couleur rouge (Bruneton, 1999).

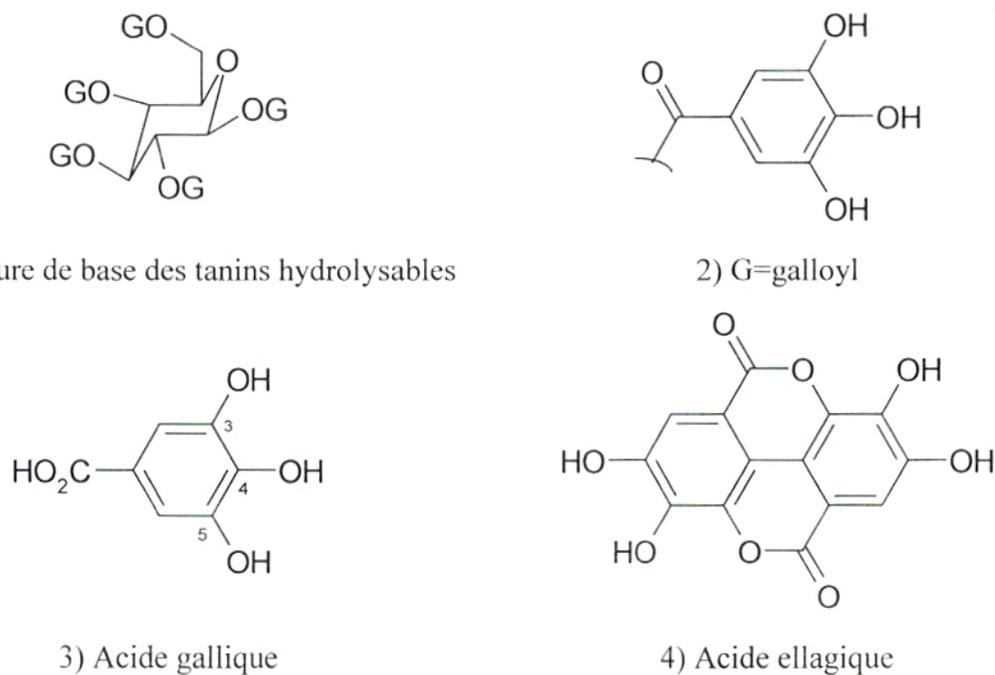


Figure 7: Structures de l'acide gallique et de l'acide ellagique (Bruneton, 1999).

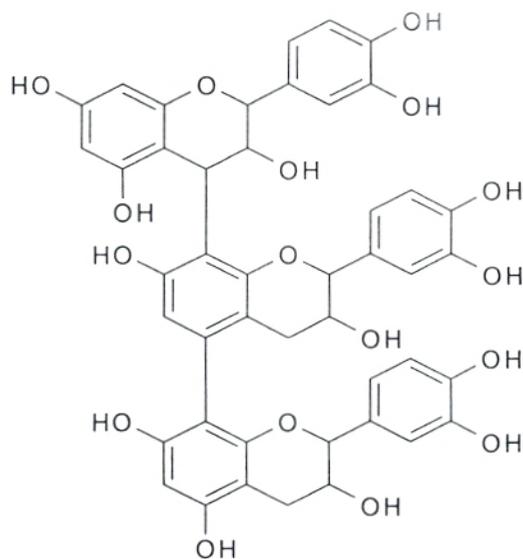


Figure 8 : Structure du Pyrocatechol (Bruneton, 1999).

Plus récemment, un troisième groupe (phloratanin) a été isolé à partir de diverses algues (*Eisenia*, *Fucus* etc.). Il est constitué exclusivement d'unités phloroglucinol liées de manière oxydative par des liaisons C-C et/ou C-O (Glombitza et al., 1985 ; Porter, 1989). Le fucofuroeckol (fig. 9) en est un exemple typique.

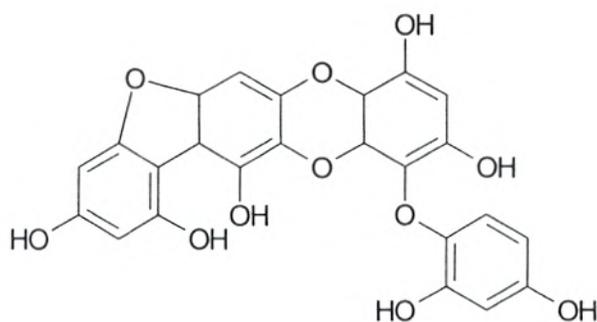


Figure 9 : Structure du Fucofuroeckol (Bruneton, 1999).

II.1.6.2. Propriétés physico-chimiques

Les tanins ont des couleurs qui vont du blanc jaunâtre au brun et foncent à la lumière. Ils possèdent une légère odeur caractéristique, un goût amer, et sont astringents.

Ils se dissolvent dans l'eau, l'acétone, l'alcool et dans les solutions d'hydroxyde de sodium et de carbonate de sodium. D'autre part, ils sont insolubles dans le benzène, l'éther et le chloroforme. Chauffés à 210°C, ils se décomposent pour former notamment du pyrogallol et du dioxyde de carbone. La plupart des tanins précipitent en présence d'aluminium, de gélatine et des sels alcaloïdes et métalliques (Porter, 1989).

II.1.6.3. Caractérisation

Avec les sels ferriques, les tanins galliques et éllagiques donnent des précipités bleu-noirs et les tanins condensés des précipités brun-verdâtres. Les tanins galliques donnent une coloration rose avec KIO_3 . Les tanins éllagiques sont colorés en rose par HNO_2 en milieu acétique ensuite la coloration vire au pourpre puis au bleu. Les tanins condensés sont colorés en rouge par la vanilline chlorhydrique (Mugedo et Watermann, 1992).

II.1.6.4. Propriétés biologiques et thérapeutiques des tanins

Les tanins exercent une action anti-oxygène sur les tissus où ils sont localisés, ce qui explique la bonne conservation de certains bois. Ils exercent également, vis-à-vis de certains champignons, de bactéries et de virus, une action antibiotique, tandis que d'autres micro-organismes (*Aspergillus*, *Penicillium*) sont au contraire capables de les hydrolyser en sécrétant une tannase. Les tanins sont responsables du noircissement rapide des feuilles de certains végétaux (comme le poirier) après la cueillette, ou de la couleur de certains fruits ou de certains organes après la récolte (café, thé, tabac) (Quezel et Santa, 1962).

Ils sont utilisés en thérapeutique pour leurs propriétés antiseptiques et bactéricides, comme agents antidiarrhéiques (tanin du ratanhia ou de la salicaire), comme agents astringents et vasoconstricteurs qui assurent une protection de la peau et des muqueuses en imperméabilisant partiellement les couches superficielles. Mais leur principale utilisation réside dans l'industrie de la préparation du cuir (Mugedo et Watermann, 1992).

II.1.7. Polysaccharides

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées ensemble que l'on trouve dans toutes les plantes. Les plus importants sont les mucilages visqueux et les gommes, présents dans les racines, les feuilles et les graines. Le mucilage et la gomme absorbent de grandes quantités d'eau, produisant une masse gélatineuse qui peut être utilisée pour calmer et protéger les tissus enflammés. C'est le cas quand la peau est sèche et irritée ou quand la paroi des intestins est enflammée et douloureuse. La meilleure façon de préparer les herbes mucilagineuses comme l'orme rouge (*Ulmus rubra*) est de le macérer dans de l'eau froide (Larousse, 2001).

II.1.8. Vitamines

De nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines. Le citronnier (*citrus limon*) contient des doses élevées de vitamine C et la carotte (*Daucus carota*) est riche en β -carotène (provitamine A).

Le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*) contient des doses élevées de vitamines B1, B2, C et E et de β -carotène (Larousse, 2001).

II.1.9. Les minéraux

Les plantes notamment celles issues de l'agriculture biologique, tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure aisément assimilable par l'organisme. Le pissenlit (*Taraxacum officinale*) est un puissant diurétique, effet dû à sa concentration en potassium alors que la prêle (*Equisetum arveuse*), grâce à sa forte teneur en silice, est efficace contre l'arthrite, contribuant à réparer le tissu conjonctif (Larousse, 2001).

II.1.10. Alcaloïdes

II.1.10.1. Définition

Les alcaloïdes représentent un ensemble de molécules d'origine naturelle, renfermant du carbone, de l'hydrogène et, plus spécialement, de l'azote. Leur dénomination – de l'arabe *al kali* (qui a donné « alcali ») et du grec *eidov* (forme) – fait référence à leur caractère alcalin ou basique. C'est au début du XIX^e siècle que les chimistes se sont aperçus que les plantes renferment des substances à réaction alcaline (jusque-là, seuls des produits acides ou neutres avaient été caractérisés), mises en évidence à l'aide de colorants naturels. Le premier alcali végétal isolé fut la morphine de l'opium, décrite en 1817 par F. W. Sertürner. La même année apparurent la narcotine ou noscapine (opium), l'émétine (ipéca) et la strychnine (noix vomique). Les alcaloïdes sont issus des plantes supérieures (Cordell, 1981).

II.1.10.2. Structures

Ils possèdent un squelette hétérocyclique azoté, à l'exception de quelques substances où l'azote est extra cyclique (colchicine, éphédrine) (Delpine, 1954). On distingue trois classes d'alcaloïdes :

- Alcaloïdes vrais

Ils existent à l'état de sels et sont biosynthétiquement formés à partir des acides aminés comme l'Hyoscyamine (Brossi et Suffness, 1990) (fig. 10).

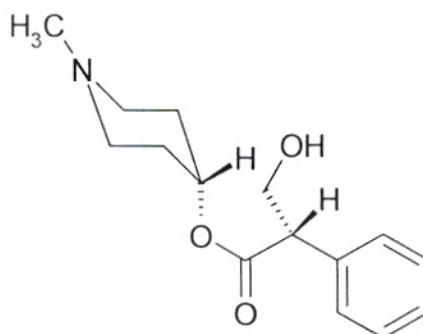


Figure 10: Structure de l'Hyoscyamine (Bruneton, 1999).

- Pseudo-Alcaloïdes

Des traces d'alcaloïdes typiquement végétaux ont été mises en évidence dans les tissus animaux, en particulier au niveau du système nerveux. Ces substances comme la conine (fig. 11) résulteraient de la condensation entre les amines biologiques présentes

dans les neurones et des aldéhydes formés *in situ*, comme l'acétaldéhyde, métabolite de l'éthanol. De tels dérivés sont appelés « pseudo-alcaloïdes » (Brossi, 1988).

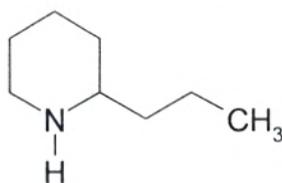


Figure 11: Structure de la Conine (Bruneton, 1999).

- Proto-alcaloïdes

Ce sont des amines simples (l'éphédrine fig. 12) dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont un caractère basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés (Brossi et Suffness, 1990)

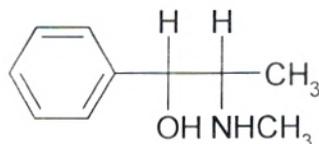


Figure 12 : Structure de l'Ephédrine (Bruneton, 1999).

II.1.10.3. Propriétés physico-chimique

La masse moléculaire des alcaloïdes est faible et dépasse rarement 1000 g/mol. La plupart sont des solides cristallisés. Quelques-uns se présentent sous forme de liquides volatils à la température ordinaire (nicotine, mescaline), mais leurs sels sont cristallisés (Mothes et al., 1985).

Les alcaloïdes sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques (alcools, acétone, chloroforme, oxyde d'éthyle etc.). Leurs sels ont des caractères de solubilité inverses. La plupart des alcaloïdes sont basiques (Dalton, 1979).

II.1.10.4. Caractérisation

La méthode de détection consiste, dans le cas le plus général, en une précipitation des alcaloïdes par des réactifs d'une assez grande spécificité tel que le réactif de Mayer, de Wagner et de Drangendorff etc (Mothes et al., 1985).

II.1.10.5. Actions pharmacologiques

Ils ont souvent servi de modèle pour imaginer de nouvelles molécules de synthèse. L'atropine présente dans la belladone (*Atropa belladonna*) a servi de modèle à une série de médicaments destinés au traitement des spasmes viscéraux. La morphine reste le produit de référence des analgésiques (Pelletier, 1988). Le dérivé de la pervenche de Madagascar (*Vinca rosea syn catharanthus roseus*) a été employé pour traiter certains types de cancer.

De plus, il est à noter que l'atropine possède une activité sédatrice, notamment dans le cas des troubles nerveux (maladie de *Parkinson*) (Larousse, 2001). La colchicine du colchique est un remède anti-inflammatoire spécifique des accès douloureux de la goutte (Pelletier, 1988). Le groupe des alcaloïdes de l'ergot de seigle conserve une place privilégiée avec l'ergotamine, dépressif du système nerveux. Son dérivé dihydrogène, vasodilatateur cérébral, est indiqué dans le traitement des migraines (Brossi et Suffness, 1990).

La quinine (fig. 13) appartient à l'un des dix groupes de la famille des alcaloïdes. elle est utilisée pour le traitement de la malaria (WHO, 2006).

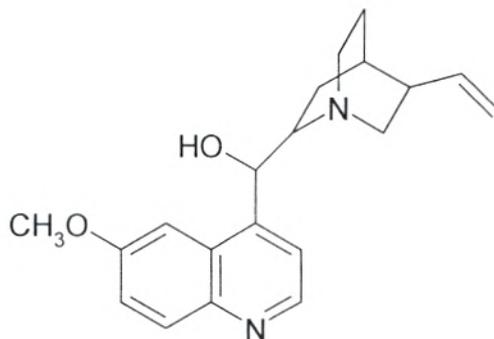


Figure 13: Structure de quelques alcaloïdes (Bruneton, 1999).

II.1.11. Saponosides

II.1.11.1. Définition

Les saponosides doivent leur nom au fait que, comme le savon, elles produisent de la mousse quand on les plonge dans l'eau. Ce sont des substances hétérosidiques comme la Convallamarogénine, la Digitogénine et la (S)-Spirostane (fig. 14) existant chez de nombreux végétaux (Pinkas et al., 1992).

II.1.11.2. Structure

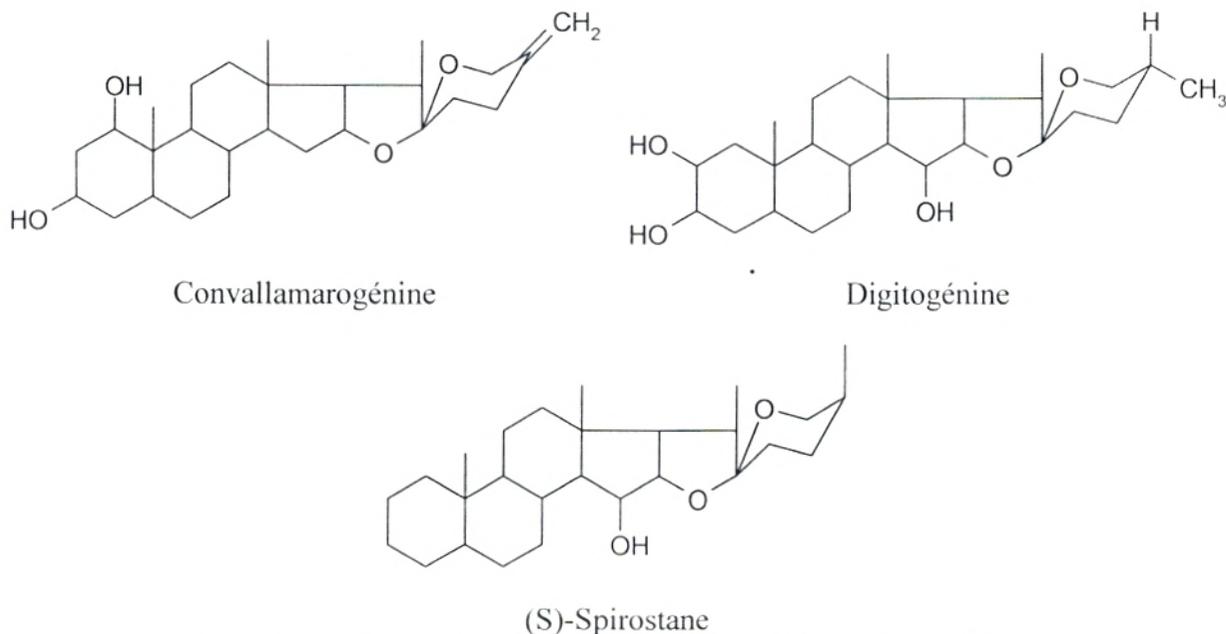


Figure 14: Structure de quelques saponosides (Pinkas et al., 1992).

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de la génine :

- Saponosides à génines stéroïdiques (fig. 15) : ils sont presque exclusivement présents chez les angiospermes monocotylédones. Ils possèdent le squelette de la cholane comme les stérols végétaux ou animaux et sont utilisés pour l'hémisynthèse des corticoïdes (Mahato et al., 1992).

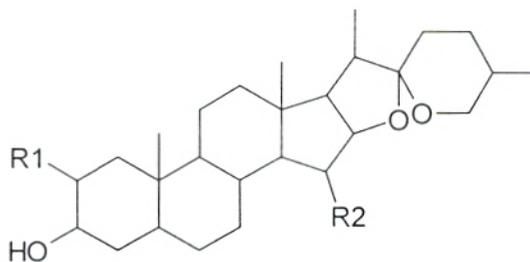
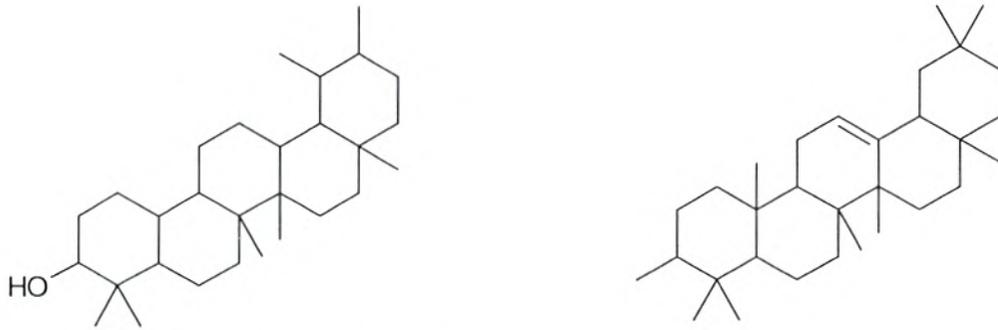


Figure 15 : Structure de base des saponosides stéroïdiques (Mahato et al., 1992)

- Saponosides à génines triterpéniques (fig. 16-1) : ils constituent la majorité des sapogénines des dicotylédones (l' α -amyrine (fig. 16-2), le β -amyrine et le lupéol) (Mahato et al., 1992).

Dans les saponosides, les oses les plus divers (D-glucose, D-galactose, D-xylose, L-arabinose et L-fructose etc.) sont rencontrés. Il y figure aussi les acides D-glycuronique et D-galacturonique. Les chaînes sucrées peuvent être simples ou ramifiées. L'ose terminal est souvent un pentose (Mahato et al., 1992).



1) Structure de base des saponosides triterpéniques

2) β -amyrine

Figure 16: Structure des saponosides triterpéniques (Mahato et al., 1992).

II.1.11.3. Propriétés physico-chimiques

Ils possèdent un ensemble de propriétés physico-chimiques parmi lesquelles :

- Pouvoir aphrogène (faculté de mousser fortement en solution aqueuse après agitation).
- Ils se présentent, le plus souvent, sous forme amorphe.
- Ils sont solubles dans l'eau, les alcools dilués. Ils agissent sur la lumière polarisée et leurs points de fusion sont toujours élevés, compris entre 200 et 300°C.
- Les saponosides donnent un certain nombre de réactions colorées, non spécifiques, mais fort utilisées pour leur mise en évidence (réaction de *Liebermann-Burchardt*) (Mahato et al., 1992).

II.1.11.4. Propriétés pharmacologiques

Beaucoup de saponosides sont de puissants antifongiques. Cette propriété serait due à leur pouvoir complexant qui s'exercerait sur les stéroïdes de la membrane des champignons. Ils présentent aussi des activités antisiphilitique, antirhumatisme, dépurative, diurétique, anti-inflammatoire, analgésique, antidiabétique, antitussive etc (Hostettman et Marston, 1995). La saponine du commerce est utilisée pour la préparation de savons liquides et de produits d'hygiène (pâtes, dentifrices, shampoings, sels de bain). Ces derniers lui doivent leurs propriétés détergentes et dégraissantes. L'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdes à partir desquels on synthétisa la pilule contraceptive. D'autre part, les saponines triterpénoïdes, contenues dans la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*) et la primevère (*Primula oeris*) ont une activité hormonale moindre. Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments (Hostettman et Marston, 1995).

II.1.12. Stéroïdes et stérols

II.1.12.1. Définition des stéroïdes

Les stéroïdes forment une vaste famille chimique qui regroupe toutes les molécules naturelles dont le squelette carboné polycyclique s'apparente au gonane (1,2-perhydro cyclopenténophénanthrène) (fig. 17-1). Ils se rencontrent dans la nature à tous les échelons du règne végétal et du règne animal (Abubakirov, 1981).

II.1.12.2. Biosynthèse

La biosynthèse des stéroïdes comporte une ou deux étapes principales. La première, par l'intermédiaire de l'acide mévalonique et du squalène, conduit aux stérols (17-alkyl-3 hydroxy stéroïdes). Au cours d'une seconde étape, une partie de ceux-ci subit des transformations métaboliques fournissant des stéroïdes (Gagnault et al., 1997).

II.1.12.3. Propriétés physico-chimiques

Le terme générique stéroïde rend compte des caractéristiques physico-chimiques des premiers représentants de cette famille, isolés de la fraction insaponifiable d'extraits lipidiques animaux. Il s'agissait, en effet, d'alcools secondaires se singularisant par leur état solide cristallisé et fondant à des températures supérieures à 100°C (Gagnault et al., 1997).

II.1.12.4. Définition des stérols

Le nom stérol (du grec *stéréos* : solide et de la désinence : ol, spécifique des alcools), traduit ces propriétés. Le premier de ces composés fut isolé, vers 1770, de calculs biliaires, par *Poullétier de la Salle*, puis trouvé également, en 1815, dans les graisses animales, par *M. E. Chevreul*. Il fut nommé cholestérol (du grec *kholé* : bile et *stéréos* : solide). Les stérols, très largement répandus dans le monde vivant, se rencontrent aussi bien chez les bactéries, les champignons, les plantes supérieures, les protozoaires que chez les métazoaires (Gagnault et al., 1997).

II.1.12.5. Biosynthèse des stérols

Les stérols dérivent tous d'une molécule relativement simple, l'*acide mévalonique*, bioprécurseur d'un intermédiaire clef, le *squalène*. Des réactions enzymatiques interviennent ensuite, différentes d'un règne à l'autre, avec des variantes suivant les

espèces. Dans le monde végétal, elles conduisent aux phytostérols, comme le β -sitostérol et le stigmastérol (Gagnault et al., 1997).

II.1.12.6. Structures

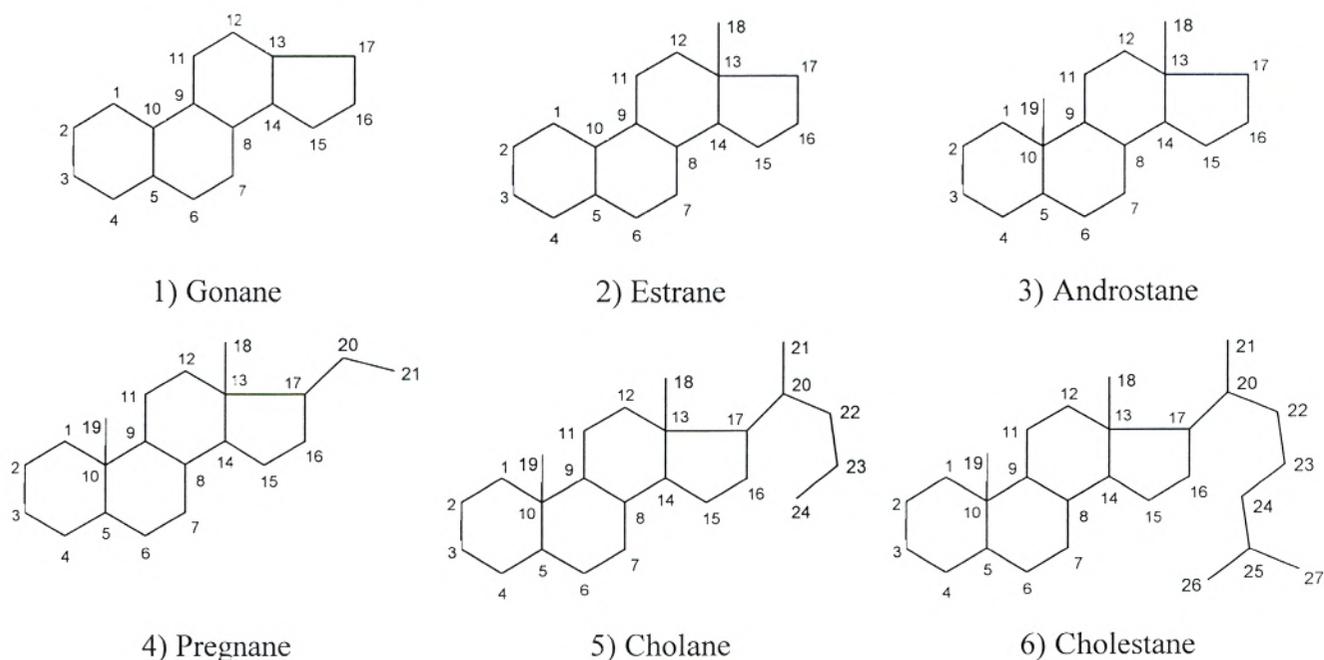


Figure 17: Structure de stérols et stéroïdes (Gagnault et al., 1997).

À partir de 1936, le terme générique stéroïde est donné à tous les corps chimiques qui possèdent un noyau (*gonane*) identique. La dénomination du stérol est réservée aux seuls 3β -hydroxy stéroïdes (Gagnault et al., 1997) (fig. 18).

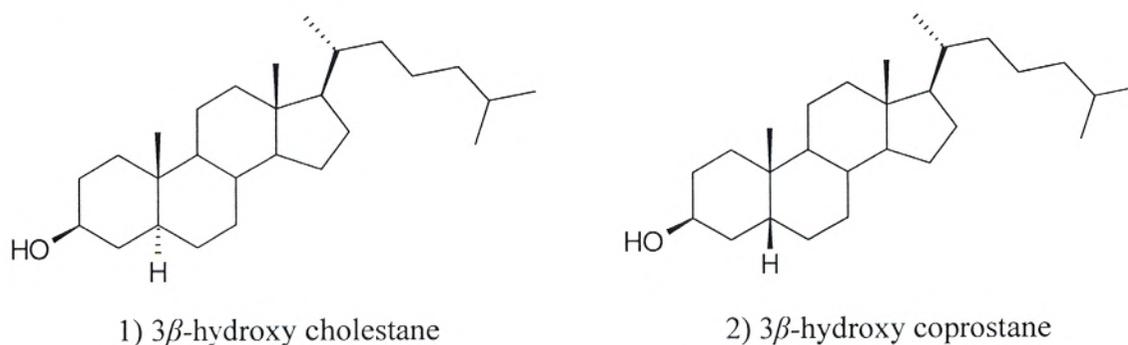


Figure 18: Structure de deux 3β -hydroxy stéroïdes (Gagnault et al., 1997).

II.1.12.7. Révélation et identification des stéroïdes et des stérols

Comme les stéroïdes et les stérols séparés sur une couche mince sont incolores, ils doivent être révélés. Cette révélation peut être effectuée par différents procédés, qui peuvent être utilisés en séquence :

- Fluorescence et/ou phosphorescence : Certaines substances absorbent les rayons ultraviolets de $\lambda=200$ à 350 nm et réémettent des rayons de longueurs d'onde visible de $\lambda=350$ à 700 nm.

- Le piégeage de fluorescence : Cette méthode nécessite un indicateur fluorescent incorporé dans la couche mince qui lui procure une fluorescence lorsqu'elle est soumise à des rayons ultraviolets de $\lambda=254$ nm.

- Les réactifs utilisés pour la révélation des stérols et stéroïdes : le réactif acide sulfurique (réactifs universels de détection), le réactif de *Liebermann* et *Burchardt* et le réactif de molybdate d'ammonium.

II.1.12.8. Quelques exemples des stéroïdes hormonaux et leurs effets biologiques

- Les glucocorticoïdes (cortisone \rightleftharpoons cortisol)

Ils exercent des effets cataboliques importants sur les protéines et les lipides. Ils interviennent dans la régulation immunologique et ont un effet permissif sur l'action de plusieurs hormones (insuline, adrénaline, vitamine D3, etc.)

- Les androgènes (testostérones)

Chez l'homme adulte, ils maintiennent la persistance des caractères sexuels, la spermatogenèse, et influencent le comportement émotionnel. Enfin, chez la femme, ils interviennent dans la pilosité pubienne et axillaire. Ils ont une action anabolisante et stimulent la croissance osseuse.

- La progestérone (lutéine) sécrétée par le corps jaune de l'ovaire et par le placenta, favorise le développement de l'endomètre et le rend apte à la nidation et à la nutrition de l'embryon. Elle supprime l'ovulation, stimule la croissance mammaire mais inhibe la lactogenèse pendant la grossesse (Gagnault et al., 1997).

CHAPITRE II : *Plasmodium falciparum*

I. Le parasite

Les plasmodies sont des protozoaires appartenant à l'embranchement des sporozoaires et à l'ordre des Hemosporideae (Denis et Mouchet, 1991). Il existe quatre espèces ; *Plasmodium vivax* (agent de la tierce bénigne), *Plasmodium falciparum* (agent de la tierce maligne), *Plasmodium malariae* (agent de la tierce quarte) et *Plasmodium ovale* qui est beaucoup plus rare (Lapierre, 1973).

I.1. Caractères généraux de *Plasmodium falciparum*

P. falciparum possède un corps nu, un siège intracellulaire, un mode de nutrition par osmose et une reproduction s'effectuant selon deux modalités : schizogonie (cycle asexué) et sporogonie (cycle sexué) (Lapierre, 1973).

P. falciparum s'accumule dans les capillaires d'organes vitaux comme les poumons, le cœur, le foie et le cerveau et engage un processus de séquestration qui lui permet d'échapper à la réponse immunitaire de son hôte et se développe ainsi dans un environnement favorable à sa survie (Zirihi et al., 2005).

Des quatre types de Malaria humaine, celle causée par *P. falciparum* est la seule mortelle, cela est dû, au moins en partie, à la capacité des globules rouges parasités par ce protozoaire à s'agglutiner dans les capillaires d'organes vitaux tels que le cerveau, les poumons et le placenta. L'adhésion des parasites aux cellules endothéliales de l'hôte et à d'autres cellules sanguines, qui peut conduire au blocage de la circulation micro vasculaire, est considérée comme un important facteur de virulence de cette espèce (Freitas-Junior et al., 2000).

I.2. Cycle de développement de *Plasmodium falciparum*

Le cycle de *P. falciparum* nécessite deux hôtes :

- Chez l'homme la multiplication du parasite est asexuée ou schizogonique et comprend deux phases ; la phase tissulaire (exoérythrocytaire) et la phase sanguine (endoérythrocytaire) (Denis et Mouchet, 1991).

- Chez le moustique femelle (Anophèle) (Fig. 19) la multiplication est sexuée ou sporogonique (Denis et Mouchet, 1991).

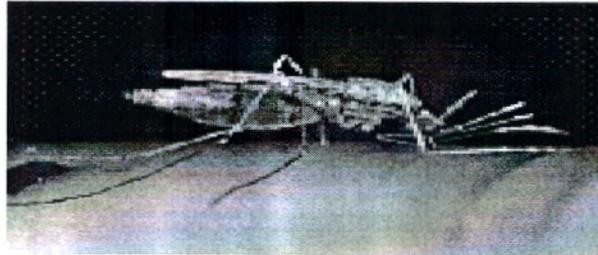


Figure 19: Photo de l'anophèle ♀ (Denis et Mouchet, 1991)

I.2.1. Chez l'homme

I.2.1.1. Développement préérythrocytaire

Le sporozoïte (élément unicellulaire allongé de $10 \mu \times 1 \mu$) contenu dans les glandes salivaires de l'anophèle femelle et inoculé lors de la piqûre infestante, ne demeure alors qu'une demi-heure dans la circulation générale. A partir du 4^e jour, on le retrouve sous forme d'Hépatozoïte dans la cellule hépatique (fig. 23-2) où il se développe pour former le schizonte. A maturité (30μ à 40μ) ce schizonte éclate et libère les mérozoïtes qui vont être lancés dans la circulation générale et parasiter les hématies (Krishna, 2004).

I.2.1.2. Phase sanguine, cycle érythrocytaire

➤ Mérozoïte

Une fois le mérozoïte dans le sang, il pénètre l'hématie par endocytose (Nuchhi R., 2006), car c'est là qu'il va puiser les ressources énergétiques pour poursuivre son cycle (fig. 23-3).



Figure 20: Photo du stade anneau du trophozoïte (Denis et Mouchet, 1991)

➤ Trophozoïte

Le mérozoïte se transforme en trophozoïte (stade où le parasite s'alimente à partir de l'hémoglobine) (fig. 21). Cette phase du cycle comporte le stade anneau (Fig. 20), qui est une forme immature des trophozoïtes (Denis et Mouchet, 1991).



Figure 21 : Photo du Trophozoïte (Denis et Mouchet, 1991)

Le parasite connaît d'importantes activités métaboliques (richesse en ribosomes) (Nuchhi R., 2006), on peut observer une vacuole nutritive volumineuse (Fig. 21).

➤ Schizonte

Le schizonte procède à une réplication de l'ADN, l'observation au microscope révèle un corps en rosace (Fig. 22) qui donne lieu à la maturité du parasite. Ce dernier éclate en libérant les mérozoïtes qui envahissent d'autres hématies.

La durée du cycle est de 48 heures pour *P.falciparum* (Denis et Mouchet, 1991).

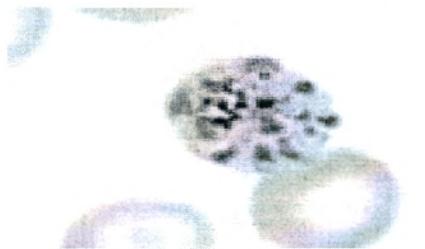


Figure 22: Photo du Schizonte (Denis et Mouchet, 1991)

Chez le moustique : cycle sexué sporogonique

Lorsqu'une piqûre pendant le repas sanguin du moustique femelle intervient après plusieurs cycles asexués schizogoniques endoérythrocytaires, les gamétocytes mâles et femelles uninucléés (résultat de la division du schizonte) se retrouvent absorbés (fig. 23-1) et vont ainsi poursuivre leur cycle dans l'estomac du moustique (Krishna, 2004).

Au terme d'une évolution complexe (fécondation, zygote, oocyste, sporozoïtes) les sporozoïtes libérés vont se localiser massivement dans les glandes salivaires du moustique (Krishna, 2004).

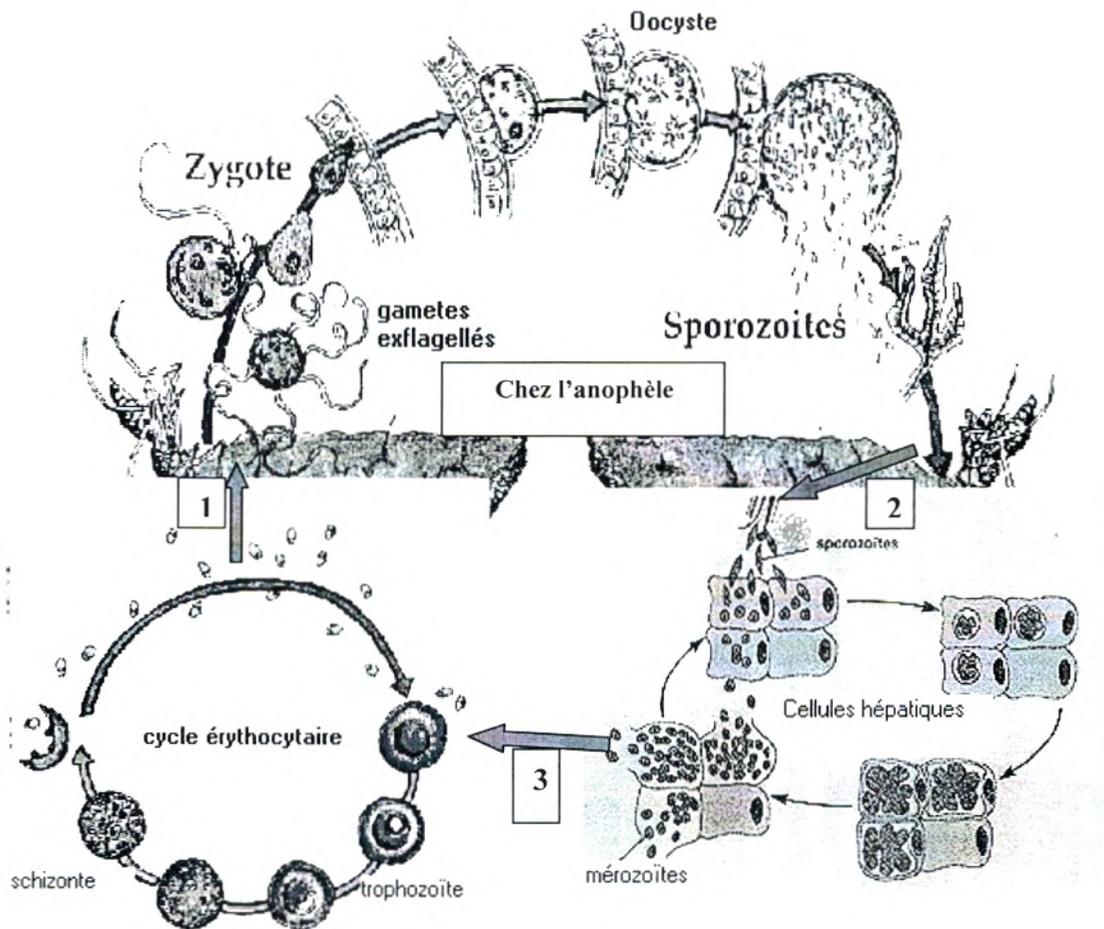


Figure 23 : Cycle de *Plasmodium falciparum* chez l'homme et le moustique (Denis et Mouchet, 1991 ; Geld et al., 2002).

Légende : 1) Les gamétocytes absorbés par le moustique lors du repas sanguin se retrouvent sous forme de zygote dans l'estomac de l'anophèle puis sous forme de sporozoïtes dans ses glandes salivaires. 2) Lors de la piqûre le moustique infeste l'homme avec les sporozoïtes qui passent dans le foie pour le cycle exo-érythrocytaire. 3) Les mérozoïtes libérés par l'éclatement de l'hépatocyte pénètrent dans le globule rouge pour le cycle érythrocytaire.

II. La pathologie de *Plasmodium falciparum*

P. falciparum ayant une périodicité des recrudescences fébriles de 3 jours cause une forme maligne du paludisme, ou fièvre tierce maligne.

II.1. La malaria causée par *P. falciparum*

La malaria est une importante cause de décès et de maladie chez les enfants et les adultes des pays tropicaux. La mortalité, couramment estimée à plus d'un million de personnes par an, a récemment augmenté à cause de l'augmentation des résistances aux médicaments antipaludiques (WHO 2006).

La malaria sévit en Afrique pour différentes raisons. La plupart des infections de malaria dans les régions sud du Sahara en Afrique est causée par *P. falciparum*, la plus redoutable forme de la maladie. Aussi, la prolifération des moustiques dans cette région révèle un foyer de transmission de l'épidémie (Nuchhi R., 2006).

II.1.1. Description de la maladie

Les premiers symptômes de la malaria ne sont pas spécifiques à la maladie mais similaires à ceux d'une infection virale mineure. Ce sont des maux de tête, une lassitude, une fatigue, un inconfort abdominal et des douleurs musculaires et ligamentaires. Suivent alors ; fièvre, frissons, transpiration, anorexie, vomissements et malaise empirant chaque jour. La population des régions endémiques est familière à cette combinaison de symptômes et se diagnostique souvent elle-même (WHO 2006).

II.1.2. Epidémiologie

La malaria est endémique dans plus de 90 pays, 40 % de la population mondiale est exposée, 300 à 500 millions de cas cliniques (fig. 24) sont diagnostiqués par an et on estime entre 1,5 et 2,7 millions le nombre de décès annuels (Geld et al., 2002).

De plus, la malaria congénitale frappe dans les régions endémiques, 30 % des femmes enceintes ont le placenta infecté. Si la mère est non-immune la probabilité de transmission au bébé est de 10 %. Si la mère est semi-immune, la probabilité que le bébé soit infecté est de 3 % (SOM 208, 2006).

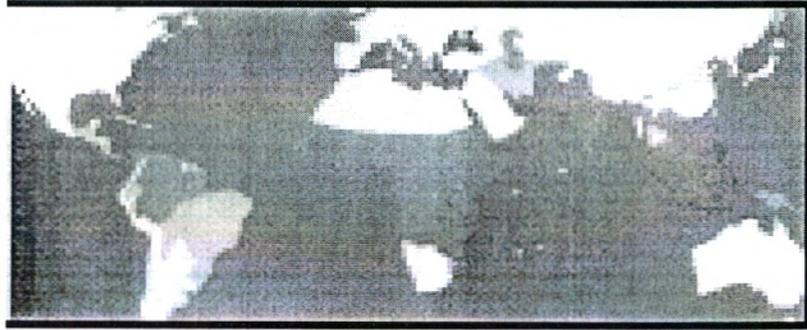


Figure 24 : Répartition de la malaria selon la résistance des souches de *P. falciparum* à la chloroquine CQ (Geld et al., 2002).

Légendes : *P. falciparum* absent ou CQ sensible, *P. falciparum* CQ résistant, *P. falciparum* multirésistant.

II.1.3. Signes cliniques

Les manifestations cliniques essentielles sont :

- Des périodes de fièvre, souvent intermittentes avec une tendance spontanée aux rechutes précoces ou tardives.
- Un syndrome splénomégalique d'intensité variable (Nuchhi R., 2006).

Le paludisme évolue en deux périodes :

- 1) Une phase d'invasion caractérisée par une fièvre de type et d'importance très variables (Krishna, 2004).
- 2) Une période ultérieure de rechutes plus ou moins nombreuses et pouvant s'étendre sur des semaines, des mois ou même des années (Krishna, 2004).

Les symptômes cliniques sont dus à la forme asexuée du parasite, qui vit dans les globules rouges de l'hôte. Après un stade initial dans le foie, le cycle érythrocytaire se poursuit par des infections répétées des globules rouges. Au sein des cellules sanguines, les parasites passent par trois stades de développement :

Stade anneau, stade trophozoïte et stade schizonte.

Les trois stades cités ci-dessus sont à la base du diagnostic. Cela est nécessaire à la qualité du test d'inhibition *in vitro* des souches de *P. falciparum* par les différents extraits de plantes.

Une fois matures, les schizontes font éclater les globules rouges et des mérozoïtes sont libérés dans le flux sanguin, commençant un nouveau stade d'infection. Chez l'homme, le cycle érythrocytaire se déroule en 48 heures et les pics de fièvre caractéristiques de la maladie coïncident avec les ruptures des globules rouges parasités (Freitas-Junior et al., 2000).

La malaria cérébrale se manifeste habituellement en un état de conscience altéré. Cela peut rapidement progresser vers le coma puis la mort. Généralement sans traitement, 15 % des enfants et 20 % des adultes meurent. Plus de 10 % de ceux qui survivent ont des anomalies neurologiques persistantes. Cela conduit à 20 à 30 % de morts (SOM 208, 2006).

III. Quelques exemples de travaux sur les composés possédant une activité contre *P. falciparum*

La résistance progressive de *P. falciparum* aux médicaments déjà existants met les chercheurs devant la nécessité de trouver de nouveaux remèdes efficaces contre *P. falciparum* et moins toxiques pour l'homme.

En effet, les travaux effectués récemment (Kevin et al., 2005 ; Tasdemir et al., 2005 ; Zihiri et al., 2005) ont donné un certain nombre de produits naturels et de dérivés de produits naturels obtenus par héli-synthèse.

III.1. Le CJ-15,801

Il s'agit d'un produit naturel sécrété par un champignon (*Seimatosporium* sp., CL28611) et possédant un pouvoir antibactérien à l'égard des souches multi-résistantes de *Staphylococcus aureus*. Il a été testé *in vitro* sur des souches de *P. falciparum* (Kevin et al., 2005).

La structure de ce produit est analogue à celle de l'acide pantothénique, la seule différence entre les deux composés est la présence d'un acide carboxylique insaturé dans le CJ-15,801 (Kevin et al., 2005).

En présence d'une concentration physiologique de l'acide pantothénique (1 μM), les tests *in vitro* sur des souches de *P. falciparum* en phase érythrocytaire avec incorporation de [^3H]hypoxanthine donnent une $\text{IC}_{50} = 39 \pm 3 \mu\text{M}$. l'inhibition complète est obtenue à des concentrations de CJ-15,801 supérieures à 250 μM . D'autre part les mêmes concentrations de CJ-15,801 sont sans effet toxique sur des lignées de cellules mammifères du rat.

III.2. Extrait de racines des *Scrophularia lepidota*

L'extrait éthanolique de racines de *S. lepidota* (une plante endémique de la flore turque) est testé *in vitro* sur des souches de *P. falciparum* (K1) multi-résistantes aux médicaments. Le résultat trouvé est une concentration d'inhibition à 50 % $\text{IC}_{50} = 17,5 \mu\text{g/ml}$ (Tasdemir et al., 2005).

III.3. Extraits de 33 plantes africaines contre *P. falciparum*

Les extraits éthanoliques de 33 plantes ont été testés *in vitro* sur des souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine FcB1 et leur cytotoxicité sur cellules mammifères MRC-5 sont reportés sur le tableau 3.

Tableau 3 : IC50 sur *P. falciparum* et sur cellules MRC-5 (Zihiri et al., 2005).

Plantes	<i>Plasmodium falciparum</i> , IC50 (µg/ml)	MRC-5, IC50 (µg/ml)	SI, MRC-5/Pf
<i>Acanthosporum hispidum</i>	13,7 ± 1,8	10,4 ± 1,6	0,8
<i>Albizia ferruginea</i>	>50	ND	ND
<i>Alchornea cordifolia</i>	>50	ND	ND
<i>Alstonia boonei</i>	>50	ND	ND
<i>Althernanthera pungens</i>	>50	ND	ND
<i>Anthocleista djalonensis</i>	>50	ND	ND
<i>Anthonotha macrophylla</i>	42,3 ± 8,7	49,7 ± 1,5	1
<i>Bersama abyssinica</i>	23,9 ± 5,7	5,3 ± 0,8	0,5
<i>Cassia alata</i>	>50	ND	ND
<i>Cassia occidentalis</i>	36,9 ± 5,6	32,8 ± 3,4	1
<i>Eriogeron</i>	36,9 ± 5,8	>50	>1
<i>Euphorbia hirta</i>	4,7 ± 14,7	>50	>1
<i>Fagara macrophylla</i>	2,3 ± 1,0	20,8 ± 3,2	9
<i>Ficus capensis</i>	45,3 ± 5,1	>50	>1
<i>Funtumia elastica</i>	3,3 ± 0,9	>50	>15,2
<i>Irvingia gabonensis</i>	21,6 ± 7,4	46,6 ± 2,0	2,2
<i>Mangifera indica</i>	>50	ND	ND
<i>Mareya micrantha</i>	27,6 ± 1,9	7,0 ± 0,2	0,25
<i>Melanthera scandens</i>	>50	ND	ND
<i>Microdesmis Keanya</i>	>50	ND	ND
<i>Microglossa pyrifolia</i>	33,1 ± 4,1	>50	>1
<i>Millettia zeshiana</i>	16,1 ± 2,6	34,4 ± 3,0	2,1
<i>Morinda morindoides</i>	11,6 ± 3,7	42,2 ± 3,2	3,6
<i>Nauclea latifolia</i>	8,9 ± 2,5	>50	>5,6
<i>Parquetina nigrescens</i>	21,2 ± 3,0	27,5 ± 4,8	1
<i>Phyllanthus muellarianus</i>	9,4 ± 2,9	>50	>5,3
<i>Physalis angulata</i>	7,9 ± 0,7	27,9 ± 1,4	3,5
<i>Pycanthus angolensis</i>	18,2 ± 2,7	>50	>2,7
<i>Rauvolfia vomitoria</i>	2,5 ± 1,0	22,6 ± 1,4	9
<i>Rhigiocarya racemifera</i>	>50	ND	ND
<i>Solanum indicum</i>	41,3 ± 7,0	>50	>1
<i>Solanum nigrum</i>	>50	ND	ND
<i>Strychnos spinosa</i>	21,8 ± 6,7	>50	>2,3

IC50 : concentration d'inhibition à 50 % ; IC90 : concentration d'inhibition à 90 % ;
 ± : écart type entre trois expérimentations différentes ; SI : index de sélectivité.

CHAPITRE III : *Trypanosoma brucei*

I. Le parasite

I.1. Caractères généraux

Trypanosoma gambiense et *Trypanosoma rhodésiense* sont des protozoaires flagellés sanguicoles appartenant avec les leishmanias à la famille des trypanosomidés. Leur corps est fusiforme et allongé. La coloration permet de distinguer un gros noyau arrondi et central et un petit élément postérieur ou kinétoplaste d'où grandit le flagelle caractéristique. Les trypanosomes agents de la maladie du sommeil vivent dans le sang (ils ne sont jamais intracellulaires), les ganglions et le liquide céphalo-rachidien où ils se divisent par scissiparité (Lapierre, 1973).

I.2. Cycle de développement

Les trypanosomes responsables de la maladie du sommeil ne sévissent qu'en Afrique (*Trypanosoma brucei rhodésiense* et *Trypanosoma brucei gambiense*) ils possèdent un vecteur qui est la mouche Tsé-tsé.

I.2.1. Cycle de développement de *T. brucei* chez la mouche Tsé-tsé

Le cycle du trypanosome chez la mouche peut se diviser en deux phases distinctes :

I.2.1.1. Phase d'établissement

Lorsque la mouche Tsé-tsé pique une personne infestée, le trypanosome procède à des divisions de population procycliques dans l'estomac de la mouche (Welburn et Maudin, 1999).

I.2.1.2. Phase de maturation

Le Trypanosome quitte l'estomac de la mouche en se dirigeant vers les glandes salivaires sous forme métacyclique dans le cas des trypanosomes infectant l'homme (Welburn et Maudin, 1999).

1.2.2. Le développement de *T. brucei* chez l'homme

Une fois transmis à l'homme par piqûre ; le parasite entame une période d'invasion successive à une incubation de 10 à 15 jours. C'est le premier stade de la maladie (Welburn et Maudin, 1999).

Quelques semaines après, les formes métacycliques (fig. 25) du trypanosome envahissent les méninges en traversant la barrière sanguine du cerveau (blood brain barrier) et le liquide céphalo-rachidien. C'est le deuxième stade de la maladie (Enanga et al., 2002).

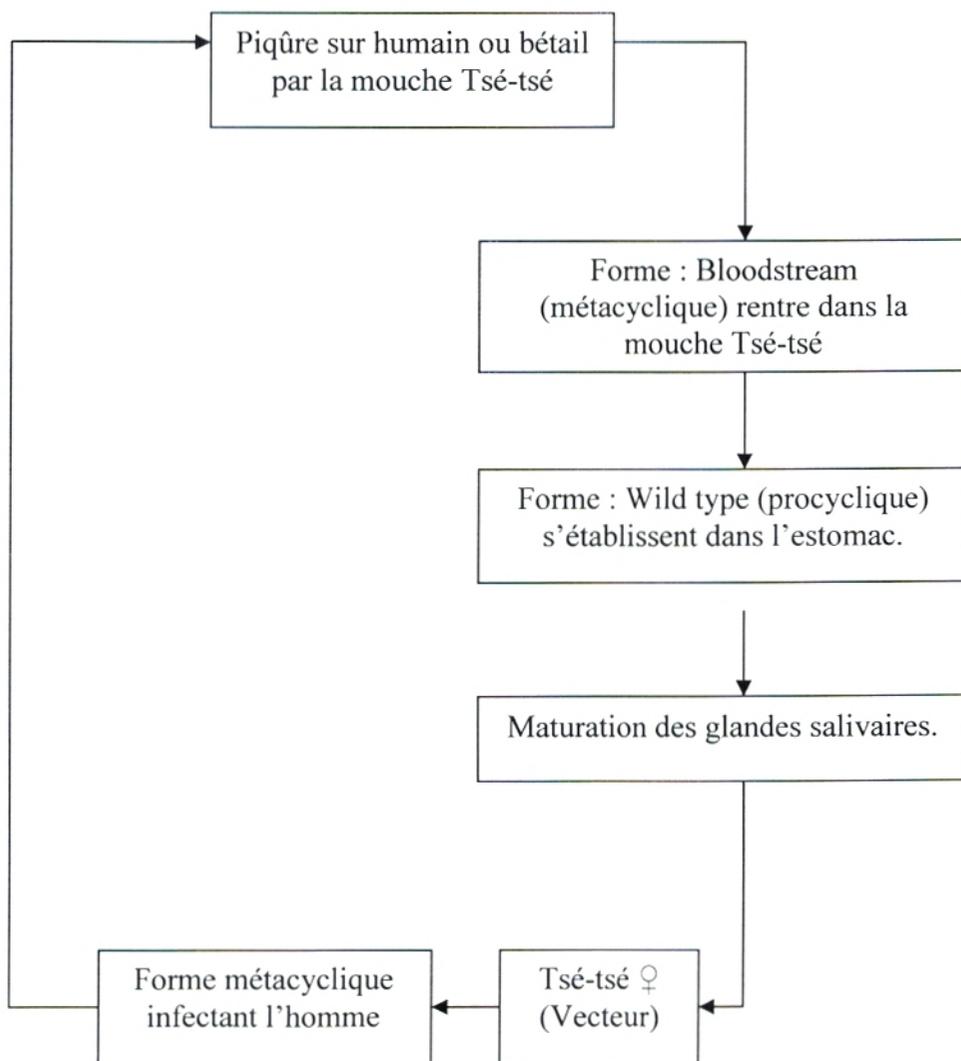


Figure 25 : Cycle de vie de *Trypanosoma brucei* (Welburn et Maudin, 1999)

II. La pathologie du *Trypanosoma brucei*

II.1. *La trypanosomiase humaine africaine (T.H.A)*

La maladie du sommeil est une maladie due à un parasite flagellé sanguicole, le Trypanosome. Il s'agit d'une affection strictement africaine. Si elle n'est pas traitée, la maladie se termine par une méningo-encéphalite mortelle (Lapierre, 1973).

Il existe deux formes de T.H.A et chacune est causée par un parasite différent :

II.1.1. T.H.A causée par *T. b. gambiense*

T. b. gambiense cause une infection chronique durant des années et sévissant dans les pays de l'Ouest de l'Afrique et de l'Afrique centrale, le réservoir est principalement l'homme (Gastellu et al., 2001).

II.1.2. T.H.A causée par *T. b. rhodesiense*

T. b. rhodesiense cause la forme aiguë de la maladie, celle-ci est rapide car elle ne dure que quelques semaines ou mois et sévit dans les pays ouest et sud de l'Afrique. Elle est caractérisée par un large réservoir animal (Gastellu et al., 2001). Cette forme aiguë de la maladie est dans 80 % des cas mortelle durant les six premiers mois (Hutchinson et al., 2003).

II.2. *Epidémiologie*

Les premiers cas de la maladie du sommeil ont été rapportés à partir du 18^{ème} siècle sur la côte africaine par des missionnaires, des marins et des médecins militaires qui en décrivent les symptômes.

Les programmes de lutte, mis en place dès le début du siècle, s'adapteront à l'évolution de la situation épidémiologique de la maladie et à l'efficacité de l'arsenal thérapeutique disponible tout au long du 20^{ème} siècle. Jusqu'au début des années 20, les patients souffrant de trypanosomiase étaient isolés et traités par les premiers dérivés arsenicaux pentavalents (ex : l'atoxyl). Les premiers cas d'arséno-résistance ont été rapportés au début des années 30. L'aggravation du phénomène au cours des années 40 accéléra la mise au point de nouveaux dérivés arsenicaux, dont le mélarsoprol, encore utilisé de nos jours, mais qui s'avère être très toxique. L'apparition des diamidines en 1937, et notamment de la pentamidine, a permis le développement des campagnes de

chimioprophylaxie de masse après la seconde guerre mondiale. Cette stratégie, combinée à l'utilisation du mélarsoprol, permettait à l'époque d'envisager l'éradication de la maladie. L'éflornithine a ensuite été admise dans les années 90 comme traitement de la maladie. Anciennement utilisé comme anticancéreux, il a démontré une activité trypanocide efficace et s'est avéré moins toxique que le mélarsoprol. Il reste cependant assez coûteux (Ollivier et Legros, 2001)..

A la fin de l'année 1998, des cas de la maladie du sommeil causée par *T. b. rhodesiense* ont émergé à Soroti à l'ouest de l'Uganda. Une épidémie grandissante car plus de 200 cas signalés alors que cette région était extérieure au secteur endémique avec 1 seul cas reporté dans les années 60 (Hutchinson et al., 2003).

A la République Démocratique du Congo (RDC) où des stratégies de surveillance de l'extension de la maladie existent, la situation empire : plus de 100 000 nouveaux cas ont été détectés dans les 6 dernières années dont le quart seulement en 1997. Cela est dû à la mise en défaut du système de surveillance par les guerres civiles et les mouvements de population. La situation empire également en Angola, au Soudan et en Uganda (Welburn et al., 1999).

Enfin l'organisation mondiale de la santé (OMS) estime à 55 millions le nombre de personnes à risque quant à la maladie du sommeil en Afrique (25 000 cas reportés en 1995 mais sur seulement 4 millions de personnes sous surveillance, le nombre réel serait entre 300 000 et 500 000 cas par an si la surveillance est adéquate) (Welburn et Maudlin, 1999).

II.3. *Signes cliniques*

Les signes cliniques de la T.H.A sont multiples (Bertrand et al., 1973 ; Dumas et al., 1976). Au premier stade de la maladie, défini comme la période précédant l'évolution dans le système nerveux central, dominant les signes généraux d'une infection (fièvre irrégulière et modérée, œdème facial, atteintes oculaires et fréquemment des aménorrhées et des impuissances). Le deuxième stade (méningo-encéphalique) est caractérisé par un sévère et complexe syndrome neuropsychiatrique, menant à la mort s'il n'est pas traité.

La plus part des patients du deuxième stade montrent des atteintes de la conscience et du sommeil, représentées typiquement par une somnolence diurne et des insomnies nocturnes (Kristenssen, 1995 ; Buguet, 1997). Le modèle des altérations du sommeil et la léthargie prononcée du deuxième stade ont conféré son nom à la maladie. Des atteintes sensorielles incluant hyperpathie et symptômes extrapyramidaux sont communs. Les symptômes psychologiques sont aussi caractéristiques de la maladie avec perte de la mémoire, démence, dépression, agitation, manies, irritabilités et indifférence qui sont des signes communs de la maladie. Les patients peuvent souffrir d'hallucinations et de nombre d'autres désordres neurologiques (Dumas 1995). La grande majorité des patients de la maladie du sommeil ignorent le fait d'être malade avant les manifestations du deuxième stade de l'infection.

III. Disponibilité des traitements

Sur le terrain, les traitements se basent sur les anciens médicaments découverts entre 1922 et 1949 qui sont très toxiques et difficiles à administrer ainsi que l'eflornithine découverte en 1990. De plus, le traitement standard du deuxième stade de la trypanosomiase, le mélarsoprol, perd de son efficacité pour cause de résistances et, par conséquent, de rechutes, spécialement en Angola, Sud Soudan, Congo et au Nord de l'Ouganda. Cela implique à court terme une possible transmission de souches résistantes et leur extension vers d'autres régions à long terme (Gastellu et al., 2001).

Étant donné, la réémergence de la maladie, la recherche de médicaments de lutte contre la trypanosomiase africaine humaine, s'avère être encore une priorité.

III.1. Le CGP 40 215

Le CGP 40 215 est un produit de synthèse, une diamidine synthétisée par Novartis. Elle bloque la biosynthèse de la polyamine du trypanosome ; un inhibiteur de l'enzyme S-adenosylméthionine décarboxylase (SAM-DC).

Des tests ont été effectués sur huit singes infectés par intraveineuse avec 10^4 de *T. b. rhodesiense* (formes métacycliques). Au quatorzième jour de l'infection, une dose de 2 mg/kg fut administrée aux singes en intraveineuse pendant 5 jours.

Six des huit singes ont été guéris. Pour les deux autres ; au 222^{ème} jour, un animal a rechuté et l'autre est mort pour des raisons inconnues (Brun et al., 2001).

III.2. L'Atoxyl

L'atoxyl (acide arsénique) découvert en 1863 par Béchamp et commercialisé en 1905 par les industries Bayer fut assez vite utilisé dans un but prophylactique pour éliminer le portage de trypanosomes dans le système lymphatico-sanguin afin de réduire la transmission de la maladie. Une série de 4 à 5 injections était suffisante pour obtenir une durée moyenne de stérilisation de 8 à 10 mois (Ollivier et Legros, 2001).

Des associations thérapeutiques étaient utilisées afin de traiter les malades combinant l'émétique (tartre d'antimoine) avec de bons résultats (Martin & Leboeuf, 1908 in Ollivier et Legros, 2001).

L'historique des traitements utilisés contre la trypanosomiase humaine africaine est la suivante :

- Médicaments arsenicaux : Atoxyl 1905 (stade 1), Tryparsamide 1921 (stade 1 & 2), Orsanine 1925 (stade 2), Melarsen 1939 (stade 1 & 2), Melarsen-oxyde 1941 (stade 1 & 2), Melarsoprol 1949 (stade 2).
- Médicaments non-arsenicaux : Suramin sodium eu début des années 20 (stade 1), Pentanidine isethionante 1940 (stade 1), Nifurtimox 1977 (stade 2), eflornithine 1981 (stade 2) (Ollivier et Legros, 2001).

III.3. Les chimiothérapies futures contre les trypanosomiasés humaines africaines

Selon le programme de l'OMS, dans le projet concernant la lutte contre la maladie du sommeil, les médicaments qui représentent l'avenir des traitements sont la pentamidine, le mélarsoprol et l'éflornithine (Enanga et al., 2002).

III.3.1. Diamidines

- Pentamidine

Diamidine aromatique utilisée avec succès pour le traitement de l'infection de *T. b. gambiense* pendant plus de 60 ans, elle est actuellement utilisée contre *T. brucei* ; 7 à 10 injections de 4 mg/kg tous les jours ou un jour sur deux (Enanga et al., 2002).

- DB289

C'est un médicament analogue de la pentamidine, 2,5-bis-(4-amidinophenyl)furan bis-D-méthyl amidoximine, est administré par voie orale (Enanga et al., 2002).

III.3.2. Composants nitroheterocycliques

- Nifurtimox

Récemment utilisé en combinaison avec le melarsoprol (1,2 mg/kg par jour pendant 8 jours) et nifurtimox (15 mg/kg par jour pendant plus de 8 jours) avec succès (Enanga et al., 2002).

- Megazol

Utilisé en association avec le suramine (administré 24 heures avant) pour augmenter sa distribution dans le sang. Les doses de megazol utilisées habituellement lors du premier stade de la maladie sont de 80 à 100mg/kg (Enanga et al., 2002).

CHAPITRE IV : Lutte contre les bactéries pathogènes

I. Problématique de la lutte antibactérienne

De nombreuses bactéries pathogènes pour l'homme (*Salmonella*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) continuent à menacer la santé publique malgré le développement de l'antibiothérapie. En effet la propagation du phénomène de résistance aux antibiotiques au sein de ces pathogènes, pose un sérieux problème et incite à la recherche de nouveaux remèdes. La recherche de nouvelles molécules à activité antimicrobienne constitue une stratégie efficace dans la lutte contre les bactéries pathogènes. Les antimicrobiens naturels sous formes d'huile essentielles ou d'extraits végétaux s'avèrent une alternative qui ne cesse de faire ses preuves, comme en témoignent les nombreux travaux dans ce domaine (Filippi et al., 2006 ; Furnari et al., 2006 ; Ozcan et al., 2006).

II. Pouvoir antimicrobien des produits naturels: les huiles essentielles

Le champ d'action des huiles essentielles est très vaste, le plus étudié est celui ayant trait à leurs propriétés bactéricides (Larivee, 2002). Les Huiles essentielles inhibent le développement de nombreuses bactéries pathogènes, y compris celles qui résistent aux antibiotiques (Abrassart, 2001).

Outre leur pouvoir antibactérien, les huiles essentielles offrent plusieurs moyens pour inhiber la prolifération des champignons et des levures telles que le *Trichophytes* et les *aspergillus* (Onwumming, 1989). Il a été démontré que les phénols, certains monoterpénols et des aldéhydes sont des puissants fongicides pouvant lutter de façon très efficace contre le *Candida albicans* (Larondo et Calvo, 1991).

II.1. Familles de composés responsables de l'activité antimicrobienne

Un certain nombre de composés chimiques contenus dans les essences étaient responsables de l'activité bactéricides et principalement les phénols (thymol et carvacrol) (Fisher et Phillips, 2006), les familles sont :

Les hydrocarbures aromatiques, Les alcools, Les phénols, Les aldéhydes, Les cétones, Les oxydes et les terpènes.

III. Description de quelques pathogènes bactériens

III.1. *Escherichia coli*

Cette espèce appartient à la famille des entérobactéries et au groupe des coliformes fécaux. Ce sont des bacilles Gram -, mobiles à ciliature pérित्रiche et aérobies facultatifs (Cunha et al., 2001).

III.1.1. Habitat

E.coli, hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux souvent retrouvé en petit nombre dans les urines saines. C'est une bactérie largement répandue dans le milieu extérieur, elle ne semble cependant pas pouvoir y mener une vie saprophyte authentique. Sa présence en quantité importante témoigne d'une contamination fécale récente (Mohammedi et al., 2003).

III.1.2. Pathogénicité

Le pouvoir de pathogénicité est étendu, on retrouve cette bactérie surtout dans des affections génito-urinaires (mérites, cystites, pyélites, pyélonéphrites, orchites), mais aussi dans des syndromes digestifs (appendicites, péritonites, lithiases biliaires infectées), circulatoires (endocardites, septicémies), pulmonaires (broncho-pneumonies, pleurésies purulentes, etc.). Ces affections sont dues à des colibacilles commensaux, acquérant occasionnellement un pouvoir pathogène à l'occasion d'une modification de terrain (Brunetti et al., 2001).

La situation est différente par contre chez les colibacilles entéro-pathogènes agents de gastro-entérites redoutables chez le jeune enfant : très contagieuses (par contamination directe : aliments souillés, mais aussi indirecte : linge, personnel soignant...). elles surviennent par petites épidémies de collectivités (crèches, maternités, etc.). Non traitées, leur pronostic chez l'enfant est très grave, souvent mortel : chez le nourrisson, en l'absence d'une thérapeutique énergique et très

rapidement instaurée, ces gastro-entérites entraînent fréquemment un tableau de toxicose (déshydratation aiguë) fatale en quelques heures (Thei Dame et al., 2001).

III.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont essentiellement saprophytes ou commensales. Certaines espèces peuvent acquérir un pouvoir pathogène, généralement favorisé par un terrain débilisé (tel *Ps. aeruginosa*) qui tient un rôle important en médecine humaine. Ce sont des bacilles habituellement fins, rectilignes ou plus rarement incurvés. Les *Pseudomonas* sont mobiles grâce à une ciliature polaire, Gram - et aérobies stricts (Demirayak, 2005).

III.2.1. Habitat et rôle pathogène

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique est une bactérie saprophyte de l'air, de l'eau et du sol (Lazdunski, 2003). Commensale des téguments et des muqueuses de l'homme et des animaux, elle possède un pouvoir pathogène étendu ; le bacille pyocyanique est essentiellement une bactérie pyogène qui provoque chez l'homme et chez l'animal des suppurations diverses, particulièrement fréquentes en milieu hospitalier (Auboyer, 2003). Ces infections se développent généralement sur des terrains débilisés. Cependant les septicémies, primitives ou secondaires, ne sont pas rares (Lepape, 2003).

III.3. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des coques Gram +, catalase +, immobiles, non capsulés, aérobies facultatifs, en général groupés en amas sur milieux solides (Jarraud et al., 2002).

III.3.1. Habitat et rôle pathogène

Ce sont des bactéries très répandues dans la nature, aussi bien dans l'air que dans le sol ou dans l'eau (Chautard, 2006).

Commensaux, extrêmement fréquents de la peau et des cavités naturelles de l'homme et des animaux (avec une prédominance pour les fosses nasales et le périnée).

La plupart des espèces rencontrées sont opportunistes (*St. epidermis*, *St saprophyticus*) ; d'autres peuvent être occasionnellement pathogènes (*St. aureus*) (Truffault et al., 2000).

Chez l'homme, les infections staphylococciques provoquent :

- Des suppurations : furoncle, abcès superficiels ou profonds (périnéphrétiques ou pulmonaires), phlegmons, pleurésies, péritonites, arthrites, infections osseuses (ostéomyélites), etc. certaines de ces lésions suppurées ont un aspect nécrotique (Leclercq, 2002).
- De septicémies (thrombo-emboliques ou vasculaires) : elles peuvent avoir pour origine une affection cutanée mais également être la conséquence d'une contamination hospitalière (cathéter, prothèses vasculaires) ; dans ce cas, tout staphylocoque peut se montrer agressif, qu'il soit opportuniste ou pathogène occasionnel (Leclercq, 2002).
- D'atteintes intestinales d'origine alimentaire (toxi-infections d'évolution aiguë), ou survenant après antibiothérapie (entérocolites d'évolution chronique). Seuls les staphylocoques capables d'élaborer une toxine protéique peuvent déclencher les toxi-infections (Leclercq, 2002).

III.4. *Micrococcus luteus*

Les *Micrococcus luteus* appartiennent au genre *Micrococcus*, ce sont des coques Gram +, aérobies stricts et catalase + (Lorand et al., 2001).

Commensaux ou saprophytes (Mongean Lin et al., 2000), ils ne sont qu'exceptionnellement pathogènes (opportunistes) (Bansz, 2006). Ce sont des opportunistes pathogènes qui peuvent provoquer un choc septique, une arthrite septique, des endocardites, des méningites, des suppurations intracrâniennes et des pneumonies chez les immunodépressifs (Shuhna Yang et al., 2001).

CHAPITRE I : Etude botanique et phytochimique d'*Aristida pungens* L.

I. Matériel et méthodes

I.1. Matière végétale

I.1.1. Identification de la plante

L'identification botanique est faite en s'aidant de la flore d'Ozenda confirmée par les travaux de A. Beloued et A. Chehma (2001).

Un échantillon de la plante est déposé au niveau de l'herbarium de l'INA (Alger).

I.1.2. Le choix de la plante

Le choix de notre plante est basé sur :

- Une étude ethnopharmacologique faite à Ouargla,
- La flore du Sahara non exploitée.

I.1.3. Origine géographique et période de récolte

Le matériel végétal est constitué de feuilles et de tiges d'*Aristida pungens* L. Cette dernière est récoltée au mois de mai 2001 à Oued N'ssa (Transect, Ouargla-Touggourt). Les caractéristiques géographiques et bioclimatiques de Ouargla sont résumées dans le tableau 4.

I.1.4. Préparation et conservation du matériel végétal

Après la récolte, le matériel végétal est débarrassé des débris. Pour s'assurer de la bonne conservation de notre plante, un lavage à l'eau distillée suivi d'un séchage à l'air libre et à l'obscurité pendant une dizaine de jours ont été réalisés. Elle est, ensuite, conservée dans des flacons à l'abri de la lumière. Toutes ces opérations permettent de pallier la dégradation de certains constituants et contribuent à l'inhibition de toutes activités enzymatiques responsables de leur dénaturation.

Tableau 4 : Caractéristiques géographiques et bioclimatiques de Ouargla (ONM, 2001).

Station	Ouargla
Etage bioclimatique	Semi-aride
Altitude en (m)	150
Latitude nord	31-55°
Longitude est	5-24°
Pluviométrie (mm)	150

L'étude bibliographique révèle très peu d'études sur *Aristida pungens* L., celle de Baba Ahmed (2005) apporte une information concrète sur l'espèce quant à la composition chimique des feuilles et tiges de *Aristida pungens* L. Dans notre présent travail nous effectuons les mêmes tests phytochimiques sur les autres parties de la plante à savoir la gaine, les nœuds et les entre nœuds.

I.1.5. Examen phytochimique

Les trois parties d'*Aristida pungens* L., à savoir, les nœuds (fig. 26-1), les entre nœuds (fig. 26-2) et la gaine (fig. 26-3) ont été séparées, broyées puis soumises aux tests phytochimiques. Trois solvants d'extraction de polarités différents (eau, éther diéthylique et l'éthanol) sont employés. La méthode d'extraction consiste à porter l'échantillon de la plante au reflux dans l'un des solvants cités ci-dessus pendant 1h. Cette technique permet d'extraire la plupart des familles de composés chimiques présentes dans la plante étudiée.

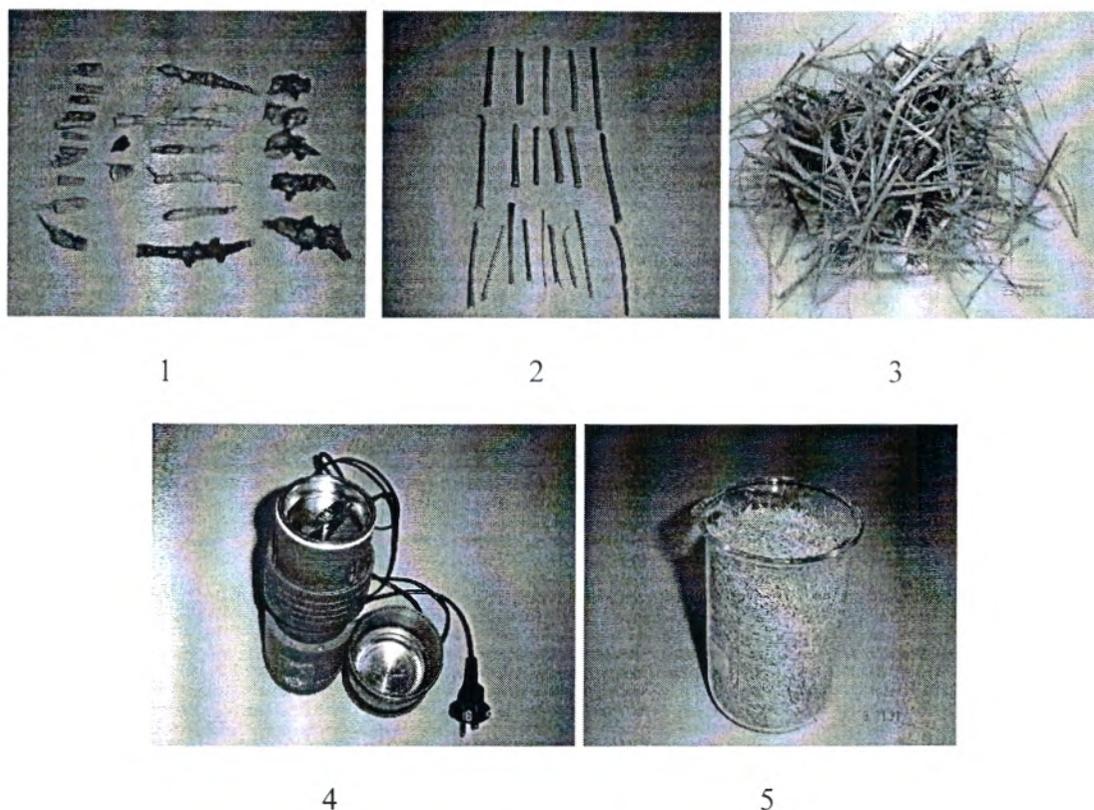


Fig. 26 : Photos des étapes de séparation des différentes parties d'*A. pungens* L. et de leur broyage

Légendes : 1 = Nœuds ; 2 = Entre nœuds ; 3 = Gaine ; 4 = Broyeur ; 5 = Broyat

1.1.5.1. Mise en évidence des flavonoïdes

- 5 ml d'extrait éthanolique sont traités avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium.
- La présence de flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de quelques minutes.

1.1.5.2. Mise en évidence des sterols et stéroïdes

- L'extrait éthanolique correspondant à 10 ml est évaporé puis le résidu obtenu est dissout dans 0,5 ml d'anhydride acétique et 0,5 ml de chloroforme. Le filtrat est traité avec le réactif de Liebermann Burchard (voir annexe), l'apparition d'une coloration bleu-vert indique la présence des hétérosides stéroïdiques.

- La solution étherique insaponifiable est concentrée à sec, le résidu obtenu avec la réaction de Liebermann Burchard est traité, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration verte-bleue.

1.1.5.3. Mise en évidence des tanins

- A 1 ml de solution éthanolique, 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée sont ajoutés, un test positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu-noire et un précipité.
- 1 ml de solution aqueuse est traité avec 1 ml d'eau et 1 à 2 gouttes de solution diluée de FeCl_3 , l'apparition d'une coloration verte foncée ou bleue-verte indique la présence des tanins.

1.1.5.4. Mise en évidence des alcaloïdes

- 25 ml de l'extrait éthanolique sont évaporés à sec, ajouter 5 ml d'HCl 2 N 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 (voir annexe) et la seconde avec le réactif de Wagner (voir annexe). Observation : la présence de turbidité ou précipitation.
- Evaporer 10 ml de solution étherique, le résidu obtenu est dissout dans 1,5 ml d'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.

1.1.5.5. Mise en évidence des composés réducteurs

- A 1 ml de l'extrait éthanolique sont additionnés 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling (voir annexe) puis chauffer, un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.
- A 1 ml de la solution aqueuse sont ajoutés 5 à 8 gouttes de la liqueur de Fehling, la solution est chauffée, un précipité rouge-brique marque la présence des hydrates de carbones.

I.1.5.6. Mise en évidence des emodols

3 ml de l'extrait éthérique sont évaporés, le résidu est dissout dans 1 ml de NH₄OH, ensuite la solution est traitée avec la réaction de Borntäger (voir annexe), un test positif est révélé par l'apparition d'une teinte vive variant de l'orange-rouge au violet pourpre.

I.1.5.7. Mise en évidence des saponosides

A 1 ml de la solution aqueuse est additionné un peu d'eau, ensuite agiter fortement :

- Pas de mousse = test négatif.
- Mousse moins de 1-2 cm = test positif.
- Mousse de plus de 2 cm = très très positif.

II. Résultats et discussion

Les résultats des examens phytochimiques que nous avons effectués sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Résultat des tests phytochimiques sur les trois parties d'*A. pungens* L.

	Gaine	Noeuds	Entre-nœuds
Flavonoïdes	+	+	-
Tanins	+	-	+
Composés réducteurs	+	+	+
Stérols et stéroïdes	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-
Saponosides	+	+	+
Emodols	+	-	-

On remarque que les nœuds et les entre nœuds possèdent sensiblement les mêmes familles de composés sauf pour les tanins et les flavonoïdes.

Par contre la gaine a pour spécificité de receler l'ensemble des composés mis à part les alcaloïdes.

En tenant compte des résultats de Baba Ahmed (2005) (concernant les feuilles et les tiges), nous avons établi un tableau comparatif (tableau 6) où nous avons rassemblé l'ensemble des résultats obtenus.

Tableau 6 : Familles de composés présents dans *Aristida pungens* L.

	Feuilles*	Tiges*	Gaine	Noeuds	Entre noeuds
Flavonoïdes	+	+	+	+	+
Tanins	+	+	+	-	+
Composés réducteurs	+	+	+	+	+
Stérols stéroïdes	+	+	+	+	+
Alcaloïdes	-	-	-	-	-
Saponosides	+	+	+	+	+
Emodols	-	-	+	-	-

Légendes : * : Les résultats de Baba Ahmed (2005)

D'après ce tableau, nous remarquons que les flavonoïdes, les composés réducteurs, les stérols, les stéroïdes et les saponosides sont présents dans toutes les parties de la plante.

Les tanins sont absents uniquement dans les nœuds et les émodols sont présents seulement dans la gaine. La présence des émodols dans la gaine peut expliquer sa coloration en jaune.

Alors que, nous avons remarqué l'absence totale des alcaloïdes.

CHAPITRE II : Etude du pouvoir d'inhibition des extraits d'*Aristida pungens* L. sur *Plasmodium falciparum*.

I. Matériel et méthodes

Les trois parties de la plante, à savoir, gaine, nœuds et entre-nœuds d'*Aristida pungens* L. sont soumises à l'extraction à l'acétate (AcOEt) et au méthanol (MeOH), ce qui nous donne six extraits à tester. Ces six extraits sont testés *in vitro* sur des souches de *Plasmodium falciparum* résistantes à la chloroquine FcB1 à des concentrations croissantes dont la plus forte est de 100 µg/ml afin de déterminer la concentration d'inhibition à 50 % (IC50).

I.1. Extraction

Les tanins, les terpénoides, les saponosides et les flavonoïdes sont extraits par une solution aqueuse, mais ils sont le plus souvent obtenus par un solvant moins polaire. Il a été prouvé que l'acétate d'éthyle (AcOEt) et le méthanol (MeOH) sont de bons solvants d'extraction (Guintzburger C., 1986). Ainsi nous avons utilisé l'AcOEt pour extraire les stérols et les stéroïdes à partir des différentes parties d'*Aristida pungens* L. Les autres composés trouvés tels que les flavonoïdes, les saponosides et les tanins ont été extraits par le MeOH.

I.1.1. Protocole général d'extraction à partir d'*A. pungens* L.

A 50 g de la matière végétale (gaine, entre-nœuds, nœuds) séchée et broyée sont ajoutés 300 ml d'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 d'AcOEt sont réunies, séchées puis évaporées pour donner l'extrait d'AcOEt. Les extraits obtenus sont notés respectivement GA (extrait d'AcOEt de la gaine), EA (extrait d'AcOEt de l'entre nœuds), NA (extrait d'AcOEt du nœuds). Les mêmes opérations d'extraction par le MeOH ont été utilisées au marc récupéré précédemment, et les phases organiques de MeOH sont réunies, séchées puis évaporées pour donner l'extrait du MeOH. Les extraits obtenus sont notés respectivement GM

(extrait de MeOH de la gaine), EM (extrait de MeOH de l'entre nœuds), NM (extrait de MeOH du nœuds).

I.2. Solubilisation des produits

Les extraits secs d'AcOEt et de MeOH sont pesés (20 mg) avec une balance de précision, et solubilisés dans 1 ml de DMSO (diméthyl sulfoxyde) dans des eppendorfs. La solution est mélangée avec un vortex et passée au sonificateur pour une meilleure solubilisation.

I.3. Effet des extraits d'*Aristida pungens* L. sur *Plasmodium falciparum*

I.3.1. Culture in vitro

La culture de *P. falciparum* est réalisée selon Trager et Jensen, (1976).

P. falciparum est maintenu en culture sur hématies humaines, à un hématoците de 2 à 5 % (v/v), sous une atmosphère de 91 % de N₂, 3 % de CO₂, 6 % d'O₂, à 37°C.

Le milieu de culture utilisé est le RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (voir annexe) contenant 25 mM d'Hepes (voir annexe) ajusté à pH 7,5 et 27,5 mM d'NaHCO₃, 11 mM de glucose, 100 UI/ml de Pénicilline, 100 µg/ml de Streptomycine et 5 à 10 % (v/v) de sérum humain décomplémenté (40 min à 56°C).

Les globules rouges sont de préférence de groupe O (selon la disponibilité) et recueillis sur plasma ACD (acid-citrate-dextrose anticoagulant) ou équivalent. Ils doivent être utilisés dans les 3 semaines consécutives au prélèvement. Les hématies sont lavées deux fois (800 g, 5 min à température ambiante) dans un milieu de culture sans sérum juste avant leur utilisation.

Les globules rouges parasités sont dilués à la parasitémie désirée, avec des hématies non parasitées fraîchement lavées. Un faible hématoците est conseillé et des fortes parasitémies sont nécessaires (8 – 15 %), pour des faibles parasitémies (1 – 3 %), on peut utiliser un hématoците jusqu'à 5 %.

D'une façon générale, il faut mettre :

- 200 μ l de culot globulaire pour une boîte de 25 cm^2 .
- 1 ml de culot globulaire pour une boîte de 80 cm^2 .
- 2 ml de culot globulaire pour une boîte de 175 cm^2 .

Pour les faibles parasitémies (utilisés dans notre travail), le milieu est changé quotidiennement par aspiration. Les cultures à parasitémies élevées (plus de 5 %) sont à diluer systématiquement avec de nouvelles hématies si l'on désire maintenir la culture en bon état.

Il est indispensable de gazer les boîtes avec le mélange gazeux pendant 30 secondes avant fermeture des flacons.

I.3.2. Estimation de la parasitémie par frottis

La parasitémie correspond au pourcentage d'hématies parasitées par rapport aux hématies non-parasitées. Elle est estimée sur frottis sanguin colorés au Diff Quick (voir annexe) (Fig. 27) par comptage au microscope d'au moins 1000 hématies.

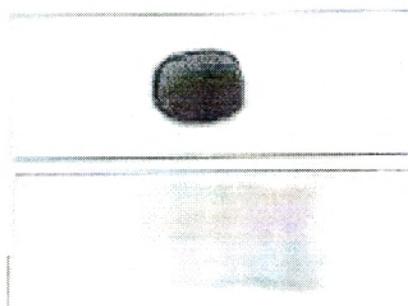


Figure 27: Photo d'un frottis (Denis et Mouchet, 1991)

I.3.3. Définition de l'hématocrite

Le pourcentage d'hématocrite est le volume de sang parasité calculé par rapport au volume total de la solution préparée et ajouté dans les puits de la plaque de microtitration. Ainsi pour une culture de 25 ml l'hématocrite à 2 % sera de 500 μ l.

I.3.4. Préparation des plaques de microtitration

Les techniques de microtitration sont utilisées pour mesurer efficacement un grand nombre de composés. La plaque utilisée (fig. 28) (Cook, Laboratory Products, Alexandria, Va) comporte 96 puits répartis en 8 rangées et 12 colonnes.

Les plaques sont manipulées dans des conditions de stérilité sous une hotte de type L2 (Desjardins, 1979).

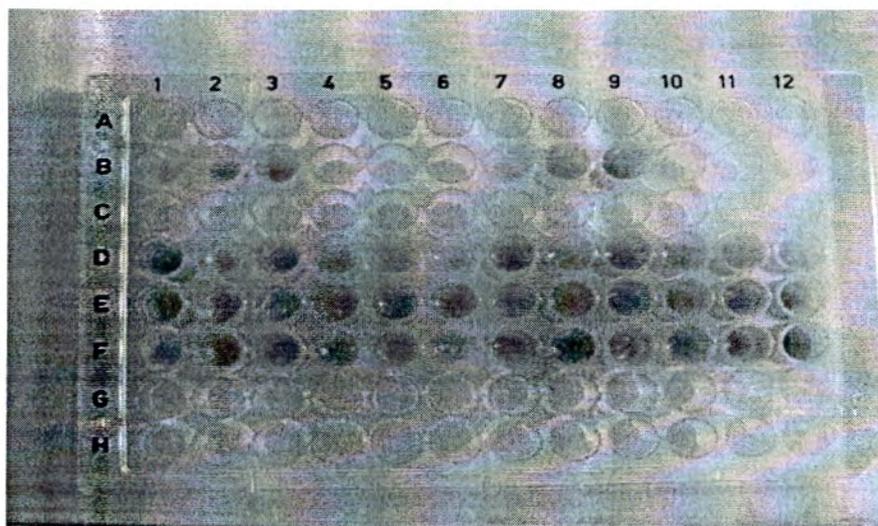


Figure 28 : Photo d'une plaque NUMC-ELISA 96 puits à fonds coniques

Une micropipette multicanaux est utilisée pour mettre 100 μ l de milieu RPMI dans l'ensemble des puits. 2 μ l de solutions d'extraits sont déposées dans la première colonne dans laquelle sont encore rajoutées 100 μ l de milieu RPMI. La solution obtenue est mélangée et diluée au un demi en passant les différentes colonnes avec la plus forte concentration pour la colonne 1 et la plus basse en colonne 12. A cela sont ajoutées 100 μ l de solution préparée à 1 % de parasitémie et 2 % d'hématocrite.

Une fois notre plaque prête, elle est placée dans l'incubateur à bougie (pour appauvrir le milieu en oxygène) réglé à 37 °C pendant 24 heures.

I.3.5. Marquage au [3 H]hypoxanthine

Après 24 heures, intervient l'étape de dépôt, dans chacun des puits, de [3 H]hypoxanthine (qui est utilisée par le parasite pour la synthèse de l'ADN) en vue de déterminer le niveau d'inhibition de la croissance de *Plasmodium falciparum*. Une autre

incubation est alors nécessaire avant l'étape de congélation et celle de la mesure de la radioactivité.

Pour la mesure de la radioactivité les plaques sont passées au récupérateur MASH II, un appareil qui aspire et dépose le contenu en particules de chaque puit sur les petits disques de papier filtre qui sont lavés abondamment à l'eau distillée (Fidock et al., 2004). Les disques de papier filtre sont traités au Liquid Scintillation and Luminescence Counter « Trilux 1450 microbeta ». Les résultats sont convertis par équations standards en coups par minute « CPM » et reportés sur un tableau à 12 colonnes et 8 lignes. Les concentrations des extraits sont exprimées en $\mu\text{g/ml}$ et la concentration de l'amodiaquine en nano mol/ml.

1.4. Mesure de la cytotoxicité des extraits d'*A. pungens* L. sur les cellules de mammifères MRC-5

Des cellules diploïdes embryonnaires du poumon MRC-5 sont utilisées pour déterminer quelles sont les concentrations des extraits d'*A. pungens* L. cytotoxiques. Ceci afin de comparer les IC50 sur *P. falciparum* et les IC50 sur les cellules MRC-5 et d'établir un rapport MRC-5/Pf qui est l'index de sélectivité SI.

1.4.1. Principe

Le test détermine la réduction du 3-(4,5-diméthylThiazol-2-yl)-2,5diphényl Tétrazolium bromide (ou MTT ou sel de Tétrazolium) jaune au bleu formazan par l'activité de la succinate deshydrogénase mitochondriale des cellules intactes (Doucet et al., 2005). Le MTT passe à travers la membrane mitochondriale des cellules vivantes. Là l'enzyme deshydrogénase clive le tétrazolium en donnant des cristaux de formazan qui de part leur taille se retrouvent emprisonnés par les membrane cellulaires, s'accumulant ainsi dans les cellules en bon état (Mosmann, 1983).

1.4.2. Manipulation

Les cellules diploïdes embryonnaires du poumon MRC-5 sont maintenues dans les flacons à bouchons ouverts (perméables à l'air) dans un incubateur à CO₂ sous une

atmosphère de 5 % CO₂ et à 37°C. Il faut aspirer le milieu de culture pour ne laisser que les cellules adhérentes au fond du falcon, puis ajouter la solution de trypsine (5 g/l Trypsine, 2 g/l EDTA, 8,5 g/l NaCl) et mettre à l'incubateur à CO₂ pendant 5 minutes. Une fois les cellules décollées, il faut les récupérer et centrifuger à 3000 t/min pendant 5 minutes. Enfin, retirer le surnageant et laver au phosphate buffered saline (PBS). Le comptage de cellules se fait sur cellules de MALSSEZ (voir annexe) en vue d'avoir une solution de 5 x 10⁴ cellules/ml.

Il convient d'utiliser une plaque à 96 puits et de mettre les différents extraits d'*A. pungens* L. à concentrations décroissantes dont la plus forte concentration est de 100 µg/ml.

Après 5 jours d'incubation, il faut ajouter le MTT afin de mesurer l'absorbance à 540 nm dans l'appareil (microplate fluorescence reader FL 600) (Ryckebusch et al., 2003).

II. Résultats et discussion

II.1. Rendement d'extraction

Les rendements des extraits de MeOH comme le montre le tableau 7 sont plus élevés que ceux de l'AcOEt. Par ailleurs, les extraits de la gaine sont plus élevés que ceux des nœuds et des entre-nœuds.

Tableau 7 : Rendements des extraits d'*Aristida pungens* L.

Extraits	Rdt (%)
GA	1,8
GM	3,9
EA	1
EM	3,1
NA	1,21
NM	4

Légendes: **GM** (extrait de MeOH de la gaine) ; **GA** (extrait d'AcOEt de la gaine) ; **EM** (extrait de MeOH des entre nœuds) ; **EA** (extrait d'AcOEt des entre nœuds); **NM** (extrait de MeOH des nœuds); **NA** (extrait d'AcOEt des nœuds).

II.2. Estimation de l'activité des extraits d'*A. pungens* L. sur le *P. falciparum*

Les figures (fig. 29-34) représentent les courbes de croissance (représentée en coups par minute « CPM ») des souches FCB1 de *P.falciparum* marquées au [³H]hypoxanthine en fonction des concentrations décroissantes des six extraits de la plante *Aristida pungens* L.

Pour l'extrait GM, la pente d'inhibition (fig. 29) se situe entre les concentrations 1,56 et 25 µg/ml. Les CPM sont représentatifs de l'intégration de L' [³H]hypoxanthine par les cellules pendant leur croissance. La moyenne d'IC50 est de 10,99 µg/ml, la moyenne d'IC90 est égale à 21,38 µg/ml.

Pour l'extrait GA, la pente d'inhibition (fig. 30) se situe entre les concentrations 1,56 et 25 µg/ml. La moyenne d'IC50 est de 15,58 µg/ml, la moyenne d'IC90 est égale à 32,56 µg/ml.

Pour l'extrait EM, la pente d'inhibition (fig. 31) se situe entre les concentrations 1,56 et 25 µg/ml. La moyenne d'IC50 est de 6,88 µg/ml, la moyenne d'IC90 est égale à 22,70 µg/ml.

Pour l'extrait EA, la pente d'inhibition (fig. 32) se situe entre les concentrations 1,56 et 25 µg/ml. La moyenne d'IC50 est de 12,45 µg/ml, la moyenne d'IC90 est égale à 29,60 µg/ml.

Pour l'extrait NM, la pente d'inhibition (fig. 33) se situe entre les concentrations 1,56 et 25 µg/ml. La moyenne d'IC50 est de 10,75 µg/ml, la moyenne d'IC90 est égale à 25,99 µg/ml.

Pour l'extrait NA, la pente d'inhibition (fig. 34) se situe entre les concentrations 1,56 et 25 µg/ml. La moyenne d'IC50 est de 21,06 µg/ml, la moyenne d'IC90 est égale à 42,37 µg/ml.

Pour l'amodiaquine (témoin positif), la pente d'inhibition représentative d'un produit actif (Fig. 35) se situe entre les concentrations 15,6 et 125 nanomolaire. La moyenne d'IC50 est de 5,17 nanomol/ml, la moyenne d'IC90 est égale à 9,52 nanomol/ml.

II.2.1. Extrait GM

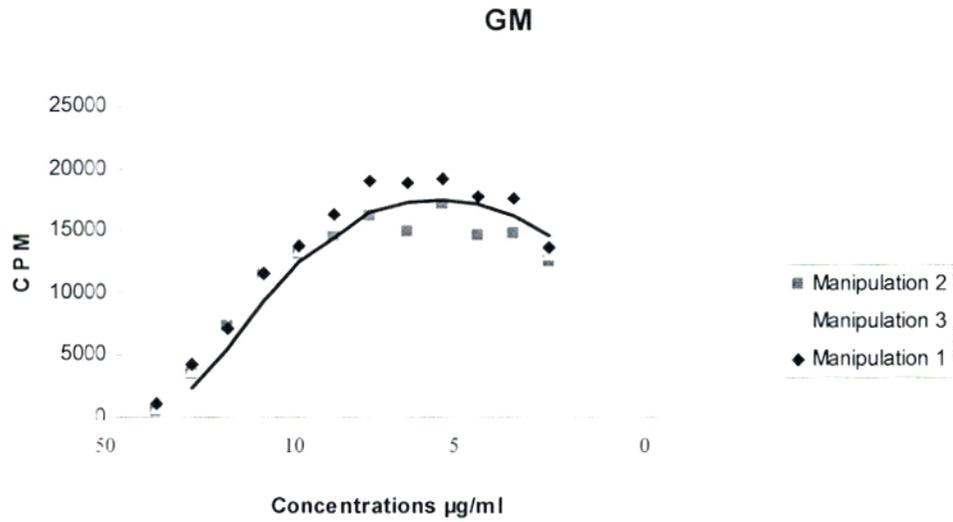


Figure 29 : Estimation de l'activité de l'extrait GM sur la souche de *P. falciparum* en culture *in vitro*.

II.2.2. Extrait GA

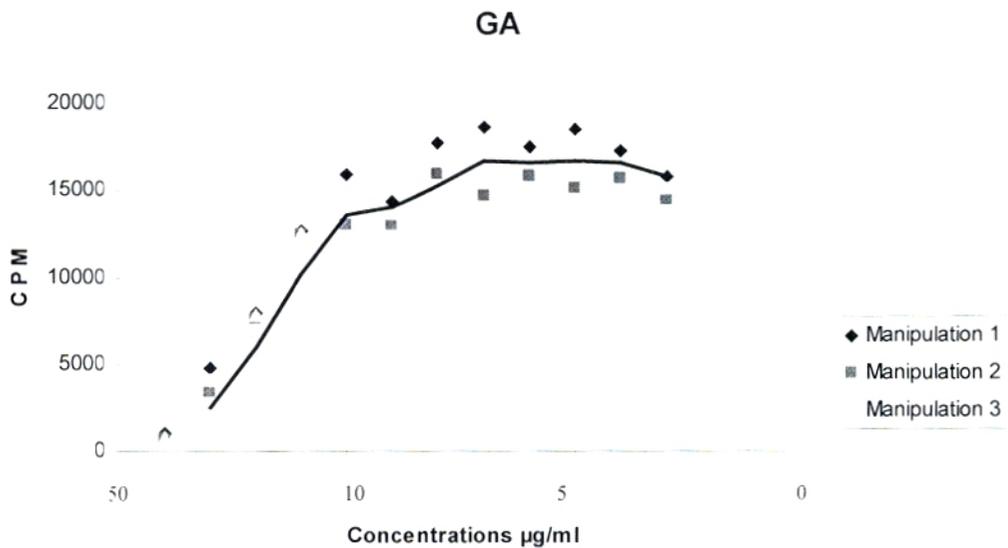


Figure 30 : Estimation de l'activité de l'extrait GA sur la souche de *P. falciparum* en culture *in vitro*.

II.2.3. Extrait EM

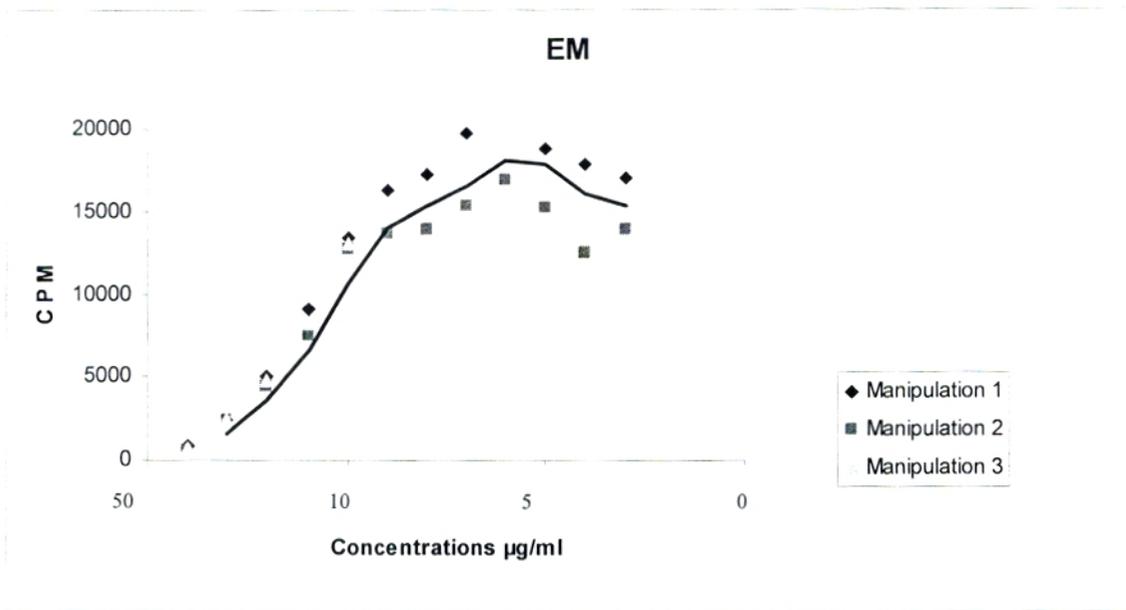


Figure 31 : Estimation de l'activité de l'extrait EM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

II.2.4. Extraits EA

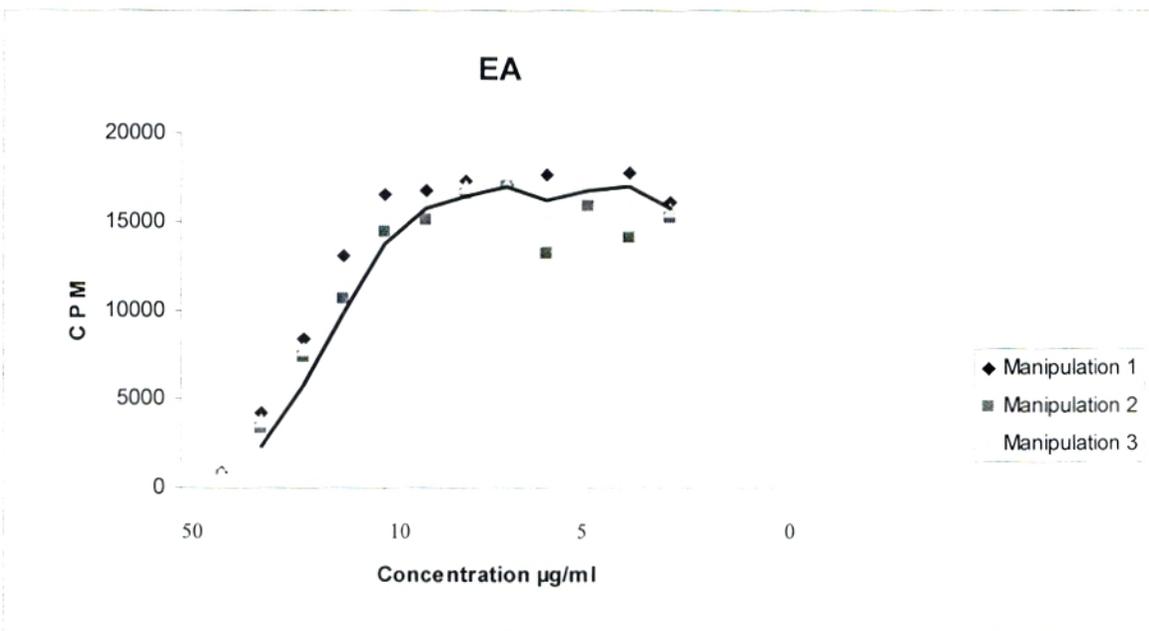


Figure 32 : Estimation de l'activité de l'extrait EA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

II.2.5. Extrait NM

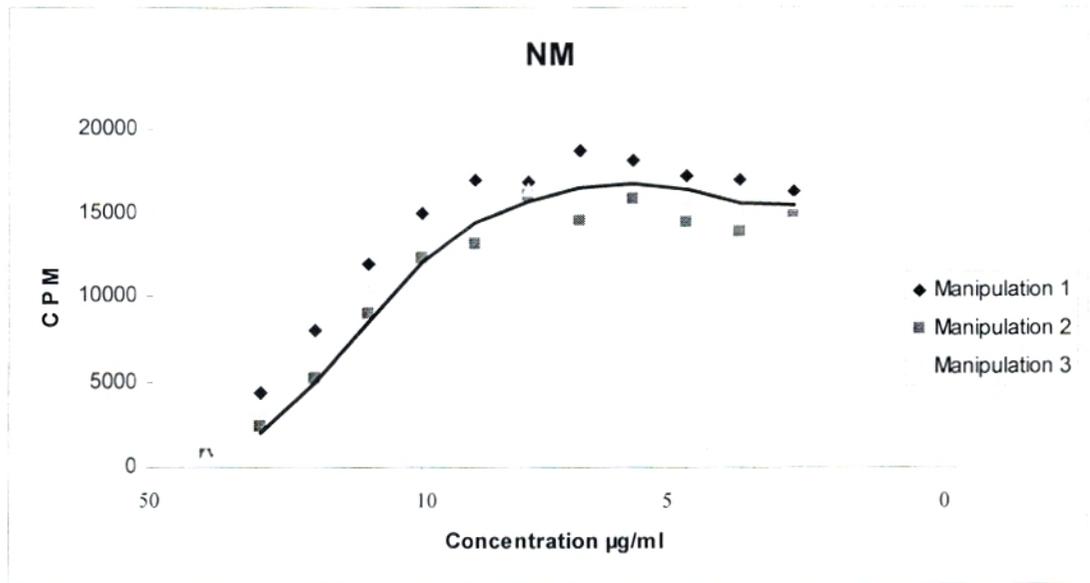


Figure 33 : Estimation de l'activité de l'extrait NM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

II.2.6. Extrait NA

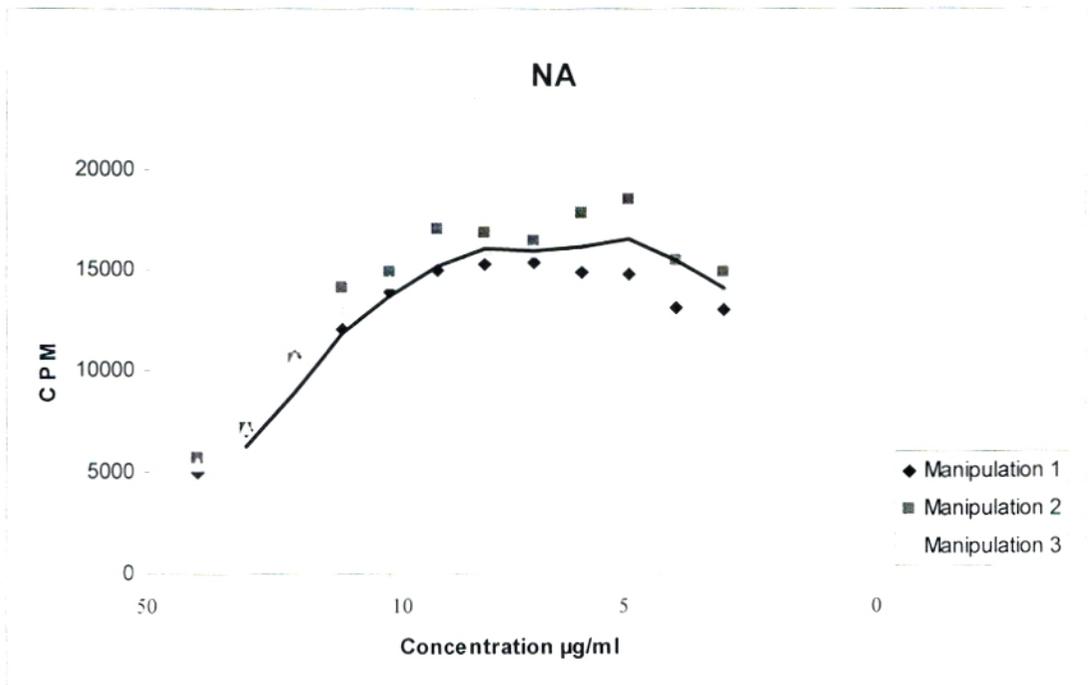


Figure 34 : Estimation de l'activité de l'extrait NA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

II.2.7. Amodiaquine

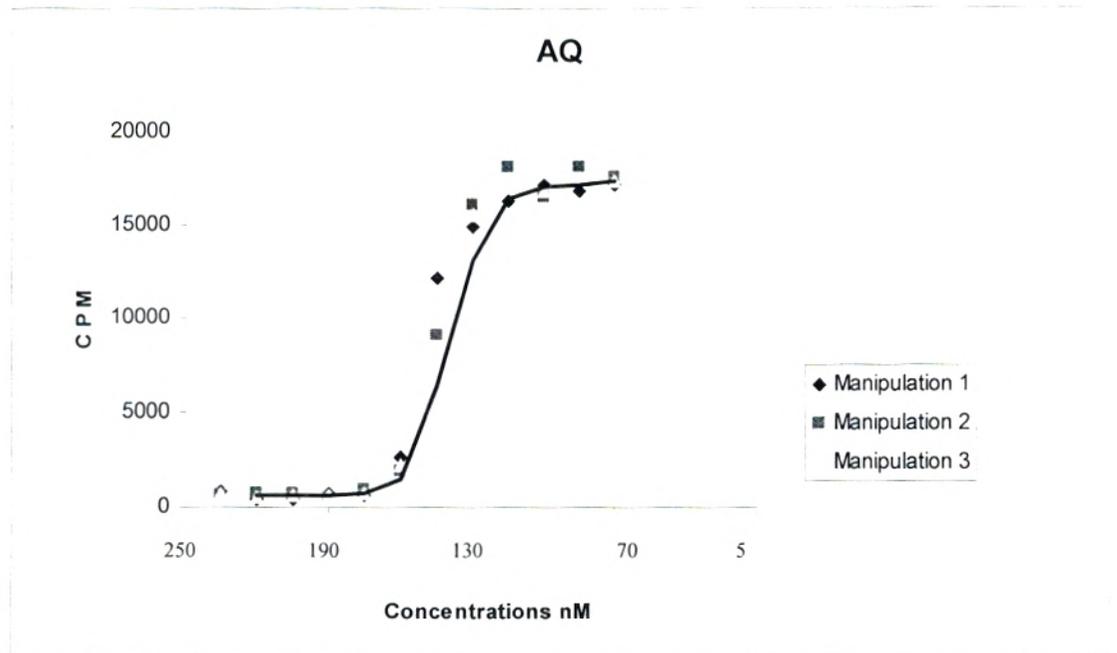


Figure 35 : Estimation de l'activité de l'Amodiaquine sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Les chiffres cités ci-dessus sont des moyennes de résultats de manipulations indépendantes effectuées dans les mêmes conditions pour vérifier la reproductibilité des tests. Ces graphes représentent ainsi la courbe tendance de la moyenne d'inhibition des différentes expérimentations.

L'extrait le plus actif s'avère être le EM avec une moyenne d'IC₅₀ (concentration d'inhibition de 50 % de parasites) de 6,88 µg/ml et une moyenne d'IC₉₀ de 22,7 µg/ml. Les extraits NM et GM sont là aussi représentatifs d'une activité sur le *P. falciparum* avec respectivement 10,75 et 10,99 µg/ml d'IC₅₀.

II.3. Détermination de l'indice de sélectivité SI

L'indice de sélectivité SI est défini comme le rapport de l'IC₅₀ de la cytotoxicité sur l'IC₅₀ d'inhibition de *P.falciparum*. Les extraits présentant une haute sélectivité (SI élevé) devraient offrir un potentiel thérapeutique intéressant.

Les six extraits (GA, GM, EA, EM, NA, NM) ont été testés sur les souches FcB1 de *Plasmodium falciparum* et sur les cellules de mammifères MRC-5. Les IC₅₀ des

tests *in vitro* d'inhibition de la croissance sur les souches FcB1 et les IC50 de la cytotoxicité sur les cellules MRC-5 sont reportées dans le tableau 8. L'index de sélectivité (SI) des six extractions est également représenté dans ce tableau.

Des six extraits testés, deux extraits (GA et NA) ont présenté une légère activité antiplasmodique avec des IC50 de plus de 15 $\mu\text{g/ml}$, quatre par contre ont une bonne activité *in vitro* avec des IC50 allant de 6,2 à 14,8 $\mu\text{g/ml}$.

Nos six extraits des trois parties de la plante étudiée montrent des IC50 sur cellules de mammifères MRC-5 supérieures à 50 $\mu\text{g/ml}$ (qui est la concentration maximale testée sur le *P.falciparum*), l'observation de la plaque à l'œil nu (fig. 36) nous donne une idée sur la faible toxicité des extraits d'*A. pungens* L. Les quatre extraits GM, EM, EA et NM sont particulièrement intéressants, associant une bonne activité antiplasmodique et une faible cytotoxicité.

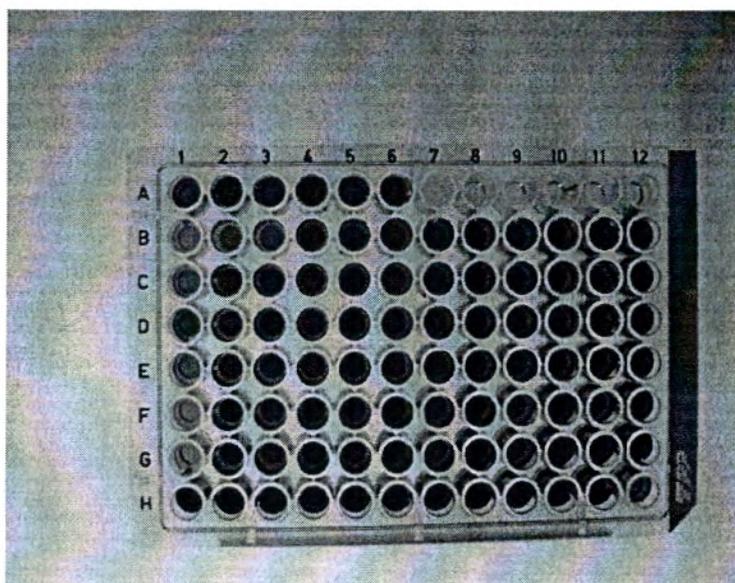


Figure 36 : Photo de la plaque contenant les cellules de mammifères MRC-5 en présence (de gauche à droite) des concentrations décroissantes des extraits d'*A. pungens*

Légendes: A7-A12 (jaune): témoin négatif (pas de cellules); **Ligne B:** GM;

Ligne C: GA; **Ligne D:** EM; **Ligne E:** EA; **Ligne F:** NM; **Ligne G :**NA.

Colonne 1: concentration 100 $\mu\text{g/ml}$

Tableau 8 : Activité antiplasmodique *in vitro* des 6 extraits d'*Aristida pungens* L au méthanol et à l'acétate d'éthyle sur *Plasmodium falciparum* et cytotoxicité sur cellules MRC-5.

Extraits	<i>Plasmodium falciparum</i> , IC50 (µg/ml)	MRC-5, IC50 (µg/ml)	SI, MRC-5/Pf	<i>Plasmodium falciparum</i> , IC90 (µg/ml)
GM	11,0 ± 1,8	64,4 ± 17,3	5,9	21,4 ± 7
GA	15,6 ± 3,5	120,5 ± 9,9	7,7	32,6 ± 11,6
EM	6,9 ± 1,1	126,7 ± 1,4	18,4	22,7 ± 6
EA	12,5 ± 2,1	117,9 ± 15,8	9,5	29,6 ± 2,1
NM	10,8 ± 1,4	98,4 ± 5	9,2	26,0 ± 5,3
NA	21,1 ± 3,9	98,9 ± 11,6	4,7	42,4 ± 2,1

Légendes: **IC50:** concentration d'inhibition à 50 %; **IC90:** concentration d'inhibition à 90 %; **± :** écart type (formule= $n[\sum x^2 - (\sum x)^2] / n(n-1)$) entre trois expérimentations différentes; **SI:** indice de sélectivité.

II.4. Interprétation des résultats et discussion

L'extrait GM (IC50 = 11 ± 1,8 µg/ml, SI = 5,9), l'extrait EA (IC50 = 12,5 ± 2,1 µg/ml, SI = 9,5) et l'extrait NM (IC50 = 10,8 ± 1,4 µg/ml, SI = 9,2). Toutefois l'extrait le plus intéressant reste le EM (IC50 = 6,9 ± 1,1 µg/ml, SI = 18,4). De plus, et pour l'ensemble des extraits, les IC90 ne sont pas très éloignées des IC50 des cellules de *P. falciparum*.

La comparaison des résultats obtenus (en se basant sur le principe de comparaison que plus l'IC50 de *P. falciparum* est petite et plus l'extrait est considéré actif) sur les extraits bruts d'*A. pungens* L. par des tests *in vitro* sur des souches FcB1 de *P. falciparum* avec les études menées sur d'autres extraits de produits naturels cités dans la littérature est plutôt prometteuse :

En effet l'étude de Tasdemir et al. (2004) sur l'extrait brut de racines de *Scophularia lepidota* présente un résultat d'inhibition à 50 % ; IC50 = 17,5 µg/ml supérieur à cinq des extraits d'*A. pungens* L. (tab. 8). Ces 5 extraits (GA, GM, EA, EM, NA, NM) sont par conséquent plus actifs que l'extrait de racines de *S. lepidota*. Seul l'IC50 de l'extrait NA est supérieure à celle de l'extrait de *S. lepidota* avec une IC50

égale à $21,1 \pm 3,9$ $\mu\text{g/ml}$ et donc l'extrait NA est moins actif que l'extrait brut de racines de *S. lepitoda*.

Dans le travail de Zihiri et al. (2005) où 33 plantes de l'ouest de l'Afrique ont été testées in vitro sur *P. falciparum* et dans les mêmes conditions que notre étude, il a été trouvé que 14 plantes présentaient une faible activité contre *P. falciparum* ($15 < \text{IC}_{50} < 50$ $\mu\text{g/ml}$) et huit seulement possèdent une bonne activité avec ($2,3 < \text{IC}_{50} < 13$ $\mu\text{g/ml}$). Cela nous permet de classer nos extraits d'*A. pungens* L à savoir EM ($\text{IC}_{50} = 6,9 \pm 1,1$), NM ($\text{IC}_{50} = 10,8 \pm 1,4$), GM ($\text{IC}_{50} = 11,0 \pm 1,8$) et EA ($\text{IC}_{50} = 12,5 \pm 2,1$) parmi les extraits à bonne activité.

Dans le travail de Waako et al. (2005) les extraits aqueux de deux plantes ; *Cardiospermum halicacabun* L. et *Momordica foetida* Schumch. Et Thon, traditionnellement utilisées pour traiter les symptômes de la malaria en Afrique de l'est et Afrique centrale ont montré une faible activité contre *P. falciparum* avec des IC_{50} supérieures à 28 $\mu\text{g/ml}$, ce qui représente une inhibition inférieure à tous nos extraits d'*A. pungens* L.

L'étude de Philippe et al. (2005) concernant l'activité antiplasmodique d'extraits au MeOH et à l'AcOET de 19 espèces du genre *Strychnos* sur des souches sensibles à la chloroquine de *P. falciparum* a démontré que *Strychnos variabilis* De Wild. présente une $\text{IC}_{50} = 5$ $\mu\text{g/ml}$. Par ailleurs, trois autres espèces de ce genre possèdent une $\text{IC}_{50} < 15$ $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats (obtenus à partir de souches de *P. falciparum* sensibles à la chloroquine) démontrent et confirment la bonne activité de nos extraits d'*A. pungens* L. testés sur des souches de *P. falciparum* résistantes à la chloroquine.

Une étude de Mbatchi et al. (2006) sur 18 plantes utilisées pour traiter la malaria au Congo démontre que 7 extraits ($10 < \text{IC}_{50} < 50$ $\mu\text{g/ml}$) ont des activités modérées. Il est mentionné que les extraits dont les IC_{50} sont inférieures à 10 $\mu\text{g/ml}$ sont d'une bonne activité.

De plus, les rapports SI de nos extraits d'*A. pungens* L. obtenus sont meilleurs que ceux trouvés dans une étude de Wube et al. (2005). Dans cette étude le rapport entre la cytotoxicité et l'activité antiplasmodique de *Kniphofia foliosa* Hochst. est exposée, et une forte activité représente une $\text{IC}_{50} = 3,8$ $\mu\text{g/ml}$ accompagnée d'une cytotoxicité dont l' IC_{50} est égale à 35,2 $\mu\text{g/ml}$. Ainsi, les rapports SI de nos extraits d'*A. pungens* L. sont ici comparables sinon meilleurs.

D'autres résultats sont optimisés grâce au fractionnement :

- Dans l'étude de Otshudi et al. (2005) une fraction à partir de l'extrait méthanolique des racines de *Epinetrum villosum* présente une IC50 = 0,1 µg/ml, une cytotoxicité sur cellules humaines du colon HCT-116 égale à 17 µg/ml et ainsi un indice SI = 175.
- Dans une étude (Tasdemir et al., 2005) sur 16 espèces de plantes turques, l'activité antiplasmodique la plus importante est obtenue par une fraction de *Phlomis kurdica* avec une IC50 = 1,5 µg/ml.

Ainsi, le fractionnement des extraits notamment les plus actifs se révèle être une bonne perspective de travail pour donner de meilleurs résultats.

II.5. Conclusion

Quatre (04) extraits d'*Aristida pungens* L., à savoir, GM, NM, EM et EA présentent une bonne activité concernant l'inhibition de la croissance *in vitro* de souches résistantes à la chloroquine FcB1 de *P. falciparum*.

Les six extraits d'*A. pungens* L. étudiés possèdent une concentration cytotoxique sur des cellules diploïdes de mammifères supérieure aux concentrations maximums affligées à *P. falciparum*. Cette donnée permet de conforter la place de ce travail en pharmacologie.

La comparaison avec des travaux récents démontre qu'*A. pungens* L. peut être considérée comme une plante possédant une bonne activité contre le *Plasmodium falciparum* et confirme l'utilisation ancienne de cette plante dans la médecine traditionnelle.

CHAPITRE III : Etude du pouvoir d'inhibition sur *Trypanosoma brucei*

I. Matériel et méthodes

I.1. Effet inhibiteur des extraits d'*A. pungens* L. sur les trypanosomes

Le parasite utilisé est le *Trypanosoma brucei* procycliques dont la densité dans les cultures est de 2×10^6 cells/ml. Les extraits d'*A. pungens* L. sont testés à 3 concentrations différentes : 50, 5 et 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Les solutions mères seront donc de 10, 1 et 0,1 mg/ml dans le DMSO. La quantité de solution mère déposée dans les puits sera de 5 μl , soit 0,5 % de DMSO. Le contrôle solvant est du DMSO à 0,5 % dans le milieu. Le contrôle positif (la Calyculine*) est de 50 nM. Le contrôle négatif est un puit avec le milieu seul. La boîte de 24 puits (tableau 9) en duplicate contient:

5 μl de solution mère, 500 μl de milieu et 500 μl de la solution de parasites.

Tableau 9 : Plan de la plaque 24 puits pour le test d'inhibition de la croissance des trypanosomes.

Contrôle + 50 nM 10^6 cells	Contrôle - None 10^6 cells	Contrôle DMSO 0.25% 10^6 cells			
GM 50 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	GA 50 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	EM 50 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	EA 50 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	NM 50 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	NA 50 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells
GM 5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	GA 5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	EM 5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	EA 5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	NM 5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	NA 5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells
GM 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	GA 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	EM 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	EA 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	NM 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells	NA 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 10^6 cells

Une fois la plaque préparée, il faut entourer la boîte de parafilm et incuber à 27°C. L'observation des cultures au microscope se fait après 24h d'incubations. Ensuite c'est l'étape de l'incorporation du MTT, la quantification se fait au compteur électronique.

La calyculine A est un inhibiteur de phosphatase.

Cette technique d'étude de l'inhibition des trypanosomes est préliminaire et a été effectuée selon le protocole mentionné. Cela nous permet d'avoir une notion sur l'effet trypanocide et aussi, et grâce à l'observation au microscope, nous pouvons déterminer l'effet sur la mobilité des *T. brucei*. Cette technique a été mise au point au laboratoire de « Biologie Fonctionnelle des Protozoaires » USM 0504, Paris, par Docteur Kohl L., Docteur Susplugas S. et Professeur Grellier P.

1.2. Incorporation du MTT aux cellules de T. brucei et mesure de l'absorbance

Selon Mosmann (1983), la technique de coloration par le MTT (comme décrite dans le chapitre 2) est basée sur le clivage du sel de tétrazolium MTT jaune, en cristaux de formazan violets par diverses enzymes cellulaires actives principalement des déshydrogénases. Cette conversion se produit uniquement dans les cellules vivantes. Les cristaux de formazan sont solubilisés dans du DMSO et la solution colorée résultante est quantifiée au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance (Abs) à 540 nm. La quantité de formazan formée est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. La technique consiste en quelques étapes qui sont les suivantes :

Prendre une solution stock de MTT et la déposer dans une plaque 96 puits. Il faut mettre 100 µl de cellules et 10 µl de MTT. La plaque est incubée pendant 3 heures à température ambiante. L'apparition des cristaux bleus dans le fond des puits indique l'incorporation dans les protozoaires vivants. La solubilisation des cristaux se fait par l'addition de 100 µl de SDS (solution stock 10 %). Puis mettre la plaque à incuber durant une nuit à température ambiante. Enfin, la lecture s'effectue au spectrophotomètre à 540 nm.

1.3. Fixation au méthanol des cellules de *T. brucei* et observation au microscope à fluorescence

1.3.1. Principe

La forme procyclique des cellules de *T. brucei* est maintenue en culture. Les cellules sont entourées d'un "manteau" composé d'une protéine, la procycline. Elles sont chargées négativement. Le principe est de recouvrir les lames de poly-lysine pour les charger positivement et de fixer au méthanol pour observer les cellules immobiles.

1.3.2. Protocole expérimental

Le nom de la lignée, la date, et l'anticorps utilisé sont notés au crayon sur une lame à son extrémité opaque. Les lames utilisées pour effectuer les observations par immunofluorescence sont recouvertes de poly-lysine ce qui leur donne la charge positive. La concentration de la solution stock des extraits d'*A. pungens* L. est de 20 mg/ml dont il faut utiliser 100 µg/ml diluée dans l'eau distillée. 30 à 50 µl de *T. brucei* sont déposés par lame et étales avec une pointe de tips jaune. Ensuite les lames sont séchées à température ambiante.

La préparation des cellules de *T. brucei* se fait comme suit :

Les trypanosomes sont Prélevés stérilement (180 µl de culture), il sont centrifugés à 6000 rpm pendant 10 minutes. Il faut resuspendre dans 150 µl de PBS et étaler 30 µl (en utilisant les tips jaunes). Une observation au microscope nous permet de savoir s'il y a un nombre intéressant de cellules. Ensuite laisser sécher à l'air libre puis fixer les cellules au moins 20 minutes dans du méthanol à - 20°C. Pour réhydrater, les cellules sont mises pendant 10 min dans le PBS et enfin 2 µg/ml de Di Aminido Phenyl Indol (DAPI) sont ajoutés avant d'étaler. L'incubation dure 30 secs à 1 min, ensuite il faut Laver pendant 5 min avec le PBS, une goutte de Vectashield est ajoutée (cela permet d'éviter la perte de fluorescence pendant l'observation au microscope, retarde l'extinction de la fluorescence ("fading") et permet de garder les lames pendant plusieurs semaines à 4°C). Il faut mettre un couvre-objet pour couvrir les lames et les garder dans la chambre froide.

II. Résultats et discussion

II.1. Observation des trypanosomes sur plaques 24 puits

Dans cette étude, les extraits d'AcOET et de MeOH d'*A. pungens* L. ont été testés sur le *Trypanosoma brucei*. L'observation des plaques 24 puits après 24h et 48h de mise en présence des parasites avec les extraits permet de noter l'effet des extraits sur la croissance et sur la mobilité des trypanosomes. Pour cela l'évaluation de leur densité dans les puits, ainsi que leur mobilité se fait au microscope (Tab. 10 et 11).

Tableau 10 : Observation au microscope de l'effet des six extraits d'*Aristida pungens* L. sur *Trypanosoma brucei* à trois concentrations différentes après 24 heures.

Contrôle positif -	Contrôle négatif ++	DMSO ++			
GM 50 ++	GA 50 ++	EM 50 ++	EA 50 ++	NM 50 --	NA 50 +
GM 5 +	GA 5 -	EM 5 +	EA 5 +	NM 5 +	NA 5 -
GM 0,5 -	GA 0,5 -	EM 0,5 -	EA 0,5 -	NM 0,5 -	NA 0,5 +

DMSO: diméthyle sulfoxyde; **Contrôle positif :** Calyculine; + : Puit dense en cellule; ++ : Puit dense et cellules mobiles; - : Puit peu dense en cellules; -- : Puit à faible densité et cellules peu ou pas mobiles.

Tableau 11 : Observation au microscope de l'effet des six extraits d'*Aristida pungens* L. sur *Trypanosoma brucei* à trois concentrations différentes après 48 heures.

Contrôle positif --	Contrôle négatif ++	DMSO ++			
GM 50 ++	GA50 ++	EM50 ++	EA50 ++	NM50 --	NA50 --
GM 5 ++	GA5 ++	EM5 ++	EA5 ++	NM5 --	NA5 -
GM 0.5 ++	GA0.5 ++	EM0.5 ++	EA0.5 ++	NM0.5 -	NA0.5 ++

DMSO: diméthyle sulfoxyde; **Contrôle positif:** Calyculine; + : Puit dense; ++ : Puit dense et cellules mobiles; - : Puit peu dense en cellules; -- : Puit à faible densité et cellules peu ou pas mobiles.

La plupart des extraits d'*A. pungens* L. ne sont pas actifs sur *Trypanosoma brucei*, à l'exception des extraits NM et NA qui révèlent au microscope une inhibition de la croissance des parasites.

Le NM 50 (extrait méthanolique des nœuds à 50 µg/ml) semble présenter une inhibition de la mobilité des trypanosomes, car les parasites (d'après l'observation au microscope) bougent très peu. Cette influence sur la mobilité de l'extrait méthanolique des nœuds d'*Aristida pungens* L. à la concentration de 50 µg/ml est néanmoins très intéressante car la mobilité d'un protozoaire est une fonction vitale nécessaire au besoin de s'alimenter d'un parasite. L'observation au microscope d'un trypanosome en culture *in vitro* dans le puit du contrôle négatif (milieu seul) démontre une mobilité remarquable des parasites qui se déplacent dans le milieu de culture en quête d'éléments nutritifs.

Le résultat de cette expérimentation permet d'affirmer que l'extrait méthanolique des nœuds propose une activité contre *T. brucei* et possède une influence sur la mobilité de ce dernier qui mérite d'être étudiée plus amplement.

II.2. Étude de l'activité trypanocide des extraits par spectrophotométrie (MTT)

Les six extraits d'*A. pungens* L. ont été solubilisés dans du DMSO (0,5 %) à deux concentrations différentes : 5 et 50 µg/ml.

Les différents produits ont été déposés en duplicate dans une même plaque à 96 puits. Par ailleurs, deux contrôles de solvant DMSO à 0,5 %, deux contrôles négatifs (puits contenant les cellules uniquement) et deux contrôles positifs (calyculine 50nM) ont été disposés dans la plaque 96 puits. Le pourcentage d'inhibition sera déterminé par rapport au témoin positif qui lui, constitue 100 % d'inhibition lors de ce test.

La lecture de la plaque s'effectue au spectrophotomètre et les résultats calculés et convertis en pourcentages d'inhibition sont reportés sur le Tableau 12.

Tableau 12 : Pourcentage d'inhibition *in vitro* de la croissance des *Trypanosoma brucei* par les extraits d'*Aristida pungens* L par rapport à l'activité de la calyculine à 50 nM.

	Plaque 1	Plaque 2	MOYENNE
GM50	< min	< min	< min
GA50	25	1	13
EM50	< min	< min	< min
EA50	53	21	37
NM50	79	52	65,5
NA50	> max	65	85,5
GM5	< min	< min	< min
GA5	< min	< min	< min
EM5	15	< min	< min
EA5	< min	< min	< min
NM5	< min	< min	< min
NA5	< min	< min	< min

50 : Concentration à 50 µg/ml; **5:** Concentration à 5 µg/ml.

Min: 0 % d'inhibition, calculé à partir du puit témoin négatif.

Max: 100 % d'inhibition, calculé à partir du puit témoin positif (calyculine).

Les chiffres représentés sur le tableau sont en %.

Parmi les douze extraits d'*A. pungens* L. testés sur les cellules en culture seuls les extraits NM, le NA et le EA à 50 µg/ml présentent une bonne activité *in vitro* sur le parasite et l'extrait NA à 50 µg/ml présente une très bonne activité d'inhibition de 85.5 % qui avoisine donc celle de la Calyculine.

Les six extraits à 5 µg/ml présentent tous un pourcentage d'inhibition inférieur à la minimale (résultat du puit témoin). Il y a quelques résultats que l'on n'explique pas, tels que les valeurs de certaines activités qui sont inférieures à celles obtenues avec le DMSO, cela peut être attribué à la technique récemment mise au point et qui nécessiterait probablement quelques améliorations en vue des bons résultats obtenus sur les deux extraits NA et NM d'*A. pungens* L.

II.3. Résultats de l'observation au microscope à fluorescence des *T. brucei*

Les *T. brucei* sont observés au microscope à fluorescence en présence des 6 extraits d'*A. pungens* L. à une concentration de 50 µg/ml, du DMSO à 0,5 %, de la Calyculine à 50 nM et du milieu de culture seul. Les photos réalisées sont traitées à l'ordinateur et les résultats sont représentés dans la figure 37.

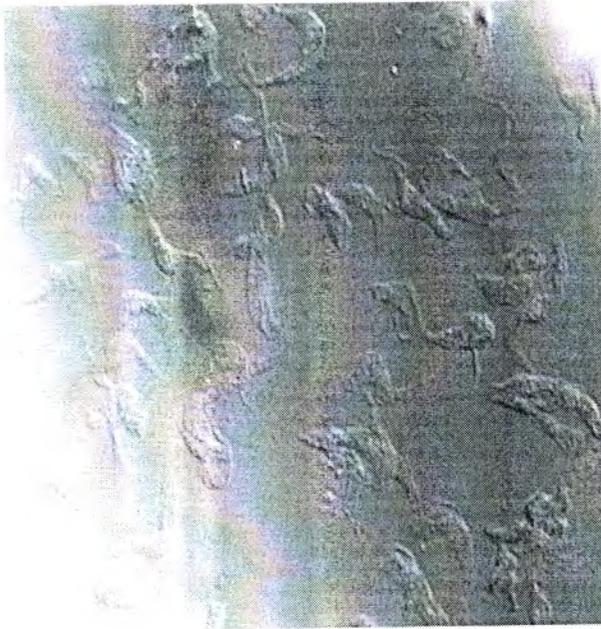


Photo 5

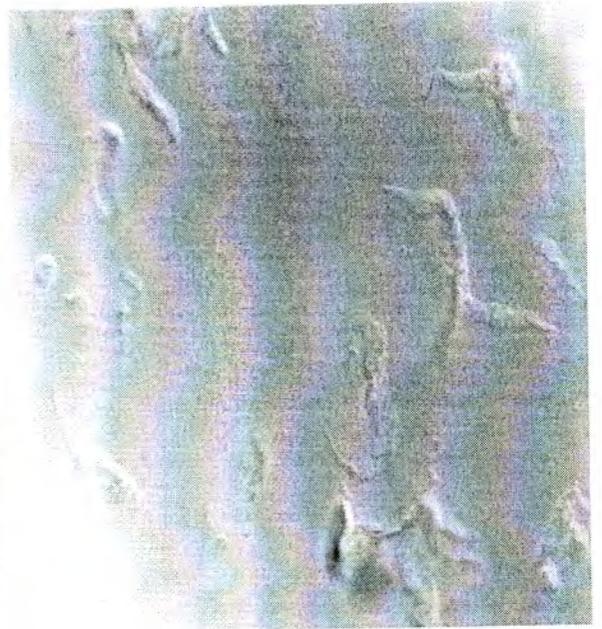


Photo 6



Photo 7

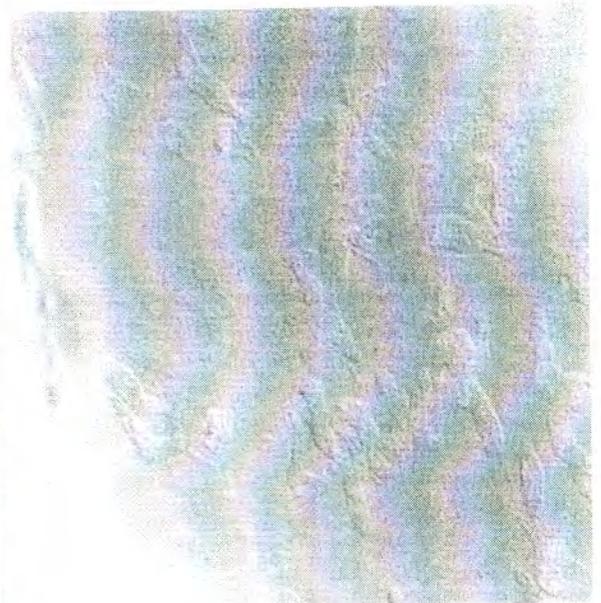


Photo 8

Figure 37 : Photos des *T. brucei* prises à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Légendes: Photo 1: *T. b.* + Calyculine; Photo 2 : *T. b.* + DMSO; Photo 3: *T. b.* + NM;
Photo 4 : *T. b.* + NA; Photo 5: *T. b.* + EM; Photo 6: *T. b.* + EA; Photo 7: *T. b.* + GM;
Photo 8: *T. b.* + GA.

III. Interprétation des résultats et discussion

Les résultats de l'activité des extraits d'*A. pungens* L. contre *T. brucei* peuvent se révéler très intéressantes comparativement avec celles trouvées dans la littérature.

En effet, dans l'étude de Mekonnen et al. (1999), les extraits des feuilles et des racines de *Moringa stenopetala* testées sur *T. brucei* présentent respectivement des IC50 égales à 9,2 et 10 µg/ml. Les travaux de Moideen et al., (1999) sur les formes métacycliques de *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* montrent *in vitro* des IC50 inférieures à 1 µg/ml, ce qui reste moins actif que le traitement standard par la pentamidine.

Bringmann et al. (2002) travaillent sur la détermination structurale d'un alcaloïde d'une liane de l'Afrique de l'ouest. L'alcaloïde (Dioncophylline E) présente une activité modérée contre *T. brucei* et une bonne activité contre des souches résistantes à la chloroquine de *P. falciparum*.

Une autre étude de Del Rayo Camacho et al. (2002) concerne les composés dérivés de produits naturels et possédants une activité anti-protazoaire. Des alcaloïdes présentent une activité contre les trypanosomes aussi bonne que la pentamidine.

Une étude de l'activité *in vitro* de 101 extraits méthanoliques dérivés de 88 plantes médicinales de Côte d'Ivoire (Kamanzi Atindehon et al., 2004) sur les *T. b. rhodesiense* indique que 8 extraits ont une bonne activité avec des IC50 inférieures ou égales à 8 µg/ml.

Hoet et al., 2004 travaillent sur l'activité *in vitro* contre *T. brucei* de quelques plantes du Bénin. Les IC50 sur *T. brucei* se situaient entre 1,5 et 39 µg/ml. Les IC50 de cytotoxicité sur cellules de mammifères étaient toutes supérieures aux valeurs d'inhibition sur parasites.

Neuf (9) plantes médicinales utilisées en Uganda pour le traitement de la THA furent extraites et testées *in vitro* sur des *T. b. rhodesiense* donnant des IC50 inférieures à 1 µg/ml (Freiburghans et al., 1996).

Dans un travail de Yabu et al. (1998), 8 herbes de la médecine traditionnelle chinoise furent traitées *in vitro* sur *T. b. rhodesiense* donnant $20 < IC50 < 74$ µg/ml.

Par ailleurs, les IC50 sur *P. falciparum* et les tests d'inhibition (de croissance et de mobilité) de cellules procycliques de *T. brucei* à concentration constante (50 µg/ml) des extraits d'*A. pungens* L. donnent également des résultats très intéressants.

Enfin les tests de cytotoxicité de ces extraits sur cellules de mammifères démontrent que tous les extraits ne sont toxiques qu'à partir de 64,4 µg/ml ce qui est supérieur à la concentration utilisée pour les tests sur *T. brucei*.

IV. Conclusion

Les résultats obtenus sur les cultures de *Trypanosoma brucei* sont préliminaires et se basent sur des tests récemment instaurés pour permettre d'avoir une idée de l'activité trypanocides *in vitro* des extraits bruts de plantes. Ils nécessitent donc d'être amélioré afin de pouvoir obtenir des valeurs de témoins concordant avec l'ensemble des résultats obtenus de nos extraits.

Néanmoins les chiffres obtenus sont prometteurs, et les observations au microscope révèlent que l'extrait NM50 présente une inhibition de la mobilité des *T. brucei*.

Par ailleurs, l'étude chimique des trois parties de la plante *Aristida pungens* L. par fractionnement bioguidé permettra de mettre en évidence si certains composés de la plante présenteront une activité trypanocide.

CHAPITRE IV : Étude de l'inhibition de la croissance de souches bactériennes par les extraits d'*A. pungens*

I. Matériel et méthodes

Les souches de bactéries utilisées nous ont été fournies par le service de bactériologie du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris, à savoir :

Escherichia coli BL21 (DE3).

Pseudomonas aeruginosa AT27853.

Micrococcus luteus IP 53.45.

Staphylococcus aureus IP 4.83 ATCC 6538.

I.1. Préparation des cultures bactériennes

- *Pseudomonas aeruginosa*

Quelques colonies obtenues sur milieu Mueller Hinton sont placées dans 5 ml d'eau distillée (stérile) et ajustées à une D.O de 0,030. On prend 1 goutte dans 10 ml d'eau distillée. L'ensemencement se fait sur milieu Mueller Hinton.

- *Micrococcus luteus*

Quelques colonies obtenues sur milieu nutritif standard sont placées dans 5 ml d'eau et ajustées à une D.O de 0,036. On prend 4 gouttes dans 10 ml d'eau distillée et on ensemence dans du milieu Mueller Hinton.

- *Staphylococcus aureus*

4 colonies obtenues sur milieu nutritif standard sont préparées dans 5 ml d'eau et ajustées à une D.O entre 0,015 et 0,020. 5 gouttes sont mises dans 10 ml d'eau et l'ensemencement se fait sur milieu Mueller Hinton.

- *Escherichia coli*

Quelques colonies obtenues sur milieu nutritif avec Ampicilline à 50µg/ml sont placées dans 10 ml d'eau et ajustées à une D.O entre 0,017 et 0,020. On prend 1 goutte dans 10 ml d'eau et on ensemence en milieu de culture Mueller Hinton.

I.2. Effets antibactériens des différents extraits

Les solutions d'extraits sont préparées par solubilisation de 10 mg d'extrait dans 100 µl de DMSO dans un tube eppendorf.

On utilise des pastilles de papier de 6 mm de diamètre pour y déposer 10 µl (soit 1 mg) de produit pour chaque test. Les pastilles sont déposées sur les boîtes pétri préparées et mises à l'incubateur à 37 °C. La lecture se fait le lendemain et le cercle d'inhibition autour de la pastille constitue le diamètre d'inhibition (Hejny, 1978).

II. Résultats et discussion

Les résultats de la sensibilité des bactéries vis-à-vis des extraits d'*Aristida pungens* L. (GA, GM, NA, NM, EA, EM) sont donnés respectivement dans le tableau 13, les valeurs représentées sont des moyennes de deux expérimentations différentes et indépendantes l'une de l'autre. Elles sont par ailleurs représentées sous forme d'histogrammes pour chacune des souches bactériennes étudiées.

Tableau 13. Pouvoir antibactérien exprimé en diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches des extraits d'*Aristida pungens* L.

		GA	GM	NA	NM	EA	EM
Gram +	<i>S. aureus</i>	8	8	9	9	9	7
	<i>M. luteus</i>	9	7	8	6	8	6
Gram -	<i>E. coli</i>	7	7	7	6	8	7
	<i>P. aeruginosa</i>	6	6	6	6	6	6

GA: Extrait à l'acétate d'éthyle de la gaine; **GM:** Extrait au méthanol de la gaine; **NA:** Extrait à l'acétate d'éthyle du nœud; **NM:** Extrait au méthanol de la gaine; **EA :** Extrait à l'acétate d'éthyle des entre nœuds; **EM:** Extrait au méthanol des entre nœuds.

Les chiffres représentés dans le tableau 13 sont des moyennes de tests indépendants.

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus sur la souche de Staphylocoques (Gram +). Les parties de la plante les plus actives sont les nœuds avec 9 mm de diamètre d'inhibition pour les deux extraits à l'AcOET et au MeOH et les moins actives sont les entre-nœuds dont l'extrait EM présente un diamètre d'inhibition de 7 mm.

Lors du premier test sur *Micrococcus luteus* les zones d'inhibition n'étaient pas très claires donc le test a été refait avec des cultures de bactéries plus denses, ce qui a d'ailleurs marché. Pour le deuxième test, les résultats obtenus étaient bactériostatiques c'est-à-dire qu'il existe une repousse des bactéries au dessus de la zone d'inhibition sauf pour l'extrait NA pour lequel le cercle d'inhibition traduit un effet bactéricide. On remarque que les trois extraits (GA, NA, et EA) présentent des diamètres d'inhibition égales ou supérieurs à 8 mm.

Sur la souche *Escherichia coli*, les six extraits sont faiblement actifs à l'exception de l'extrait EA qui présente un diamètre d'inhibition de 8 mm.

Les extraits d'*Aristida pungens* L. n'ont aucune activité sur *P.aeruginosa*. On peut donc en déduire, au vu des résultats des tests sur les différentes souches bactériennes, que les six extraits d'*A. pungens* L. présentent une meilleure activité sur les bactéries Gram + que sur les Gram -.

II.1. Interprétation et discussion

Dans le travail de Baba Ahmed (2005), l'effet de quatre extraits (des tiges et des feuilles d'*Aristida pungens* L.) a été comparé à celui de neuf ATB sur les mêmes souches de *P. aeruginosa* et les résultats ont été représentés sur la figure 38.

Comme le montrent les résultats schématisés par la figure 38, tous les ATB ont un effet intermédiaire sur l'ensemble des bactéries Gram + et Gram - comparés aux extraits TM (extrait au méthanol de la tige), FM (extrait au méthanol de la feuille) et FA (extrait à l'acétate d'éthyle de la feuille). Ainsi, *Pseudomonas aeruginosa* (Pa1 et Pa2) se révèle très résistante à la plupart des ATB utilisés, alors qu'elle est fortement inhibée par les extraits TM et FA avec respectivement des diamètres d'inhibition de 21 et 22 mm et moyennement inhibée par FM avec un diamètre d'inhibition de 13 mm.

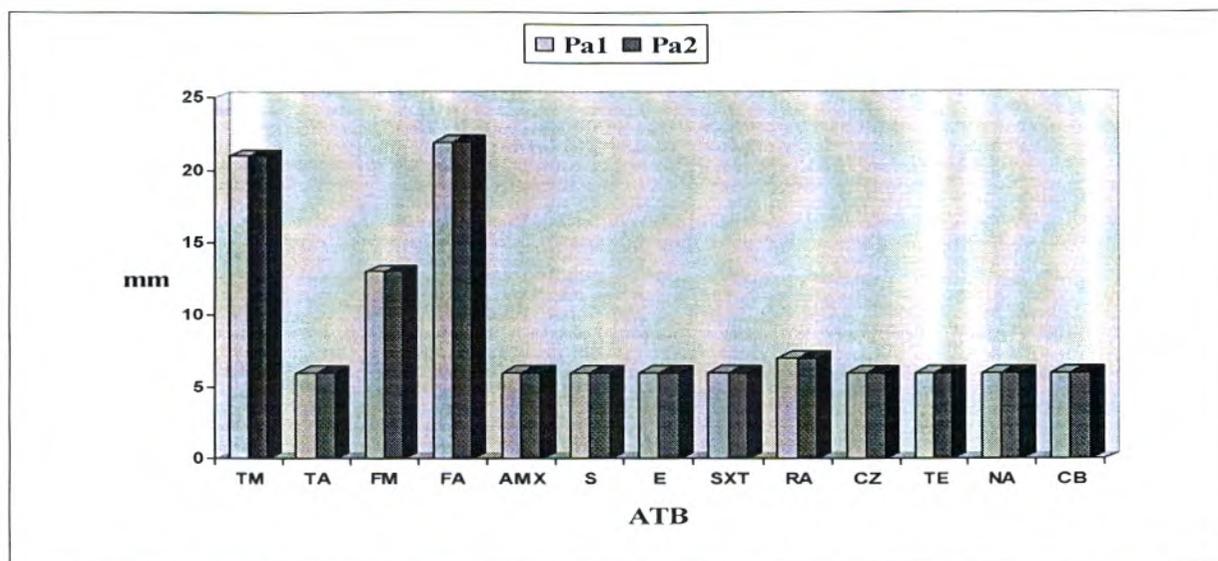


Figure 38 : Moyenne des diamètres (mm) des zones d'inhibition des souches (Pa1, Pa2) en fonction des extraits TM, TA, FM, FA et des ATB (Baba Ahmed, 2005).

Légendes: **TM:** Extrait méthanolique des tiges; **TA:** Extrait à l'acétate d'éthyle des tiges; **FM:** Extrait méthanolique des feuilles; **FA:** Extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles; **AMX:** Amoxicilline; **S:** Streptomycine; **E:** Erythromycine; **SXT:** Triméthoprine-sulfamide; **RA:** Rifampicine; **CZ:** Cephalozine; **TE:** tétracycline; **NA:** Acide nalidixique; **CB:** Carbénicilline; **Pa1:** Souche de *P. aeruginosa* 1; **Pa2:** Souche de *P. aeruginosa* 2.

Les produits naturels offrent des opportunités illimitées de découvertes de nouveaux produits pour l'industrie pharmaceutique (Cos et al., 2006). Pour confirmer la pratique de la médecine traditionnelle, la recherche scientifique est importante. En utilisant la méthode traditionnelle des disques, un potentiel antibactérien (sur *S. aureus* et *P. aeruginosa*) des extraits de feuilles d'une plante médicinale a été prouvé (Zaidan et al., 2005). Par ailleurs, 61 plantes médicinales indiennes testées à plusieurs dilutions sur *E. coli*, *P. aeruginosa*, *M. luteus* et *S. aureus* dont 28 plantes ont montré une activité antimicrobienne sur au moins une souche bactérienne (Kumar et al., 2006). Les résultats confirment ceux que nous avons obtenus dans le cas d'*A. pungens* L. pour les deux bactéries Gram + à savoir *S. aureus* et *M. luteus* avec un diamètre maximum d'inhibition obtenu de 9 mm.

L'utilisation des extraits bruts de plantes est largement décrite dans la littérature.

En effet, le potentiel antimicrobien de l'extrait méthanolique de *Phyllanthus amarus* a été recherché sur des bactéries pathogènes par la méthodes des disques de diffusion et son activité antibactérienne sur Gram – a été mesurée suivant la concentration (Mazumder et al., 2006). L'extrait méthanolique de racines de *Rheum undulatum* L. a présenté une forte activité (13 – 17 mm) sur *S. mutans* et *S. sobrinus*

(Song et al., 2006). Une autre étude de Suffredini et al. (2006) a montré que 12 extraits de plantes de la famille des Clusiaceae testés sur *E. coli* et *P. aeruginosa* ont donné des résultats significatifs. Les résultats présentés ici confirment que l'activité des extraits d'*A. pungens* L. sur les bactéries Gram + peut être qualifiée de bonne activité antibactérienne.

L'activité antimicrobienne de familles de composés présentes aussi dans *A. pungens* L. tels que les flavonoïdes est étudiée :

- Bibi et al., (2006) étudient deux isocoumarines dérivés d'érythromicine et d'érythrocentaurine qui présentent une activité antibactérienne. Isole et al., (2006) présentent deux flavonoïdes isolés d'une plante médicinale tropicale *Hyptis fasciculata* et qui donne une faible activité contre *Escherichia coli*.

- Gil et al., (2006) travaillent sur *Pseudophalium vira vira*, une plante médicinale dont le composant principal (l'acide kaurénoïque) est un diterpénoïde qui possède un effet contre des bactéries Gram + et Gram – de 2 à 4 fois plus important que l'effet des agents antimicrobiens utilisés actuellement.

Enfin, le fractionnement est toujours une bonne perspective pour *A. pungens* L. car dans certains travaux (Khan et al., 2006), les fractions avec différents solvants de trois plantes présentent une meilleure activité sur un large spectre de bactéries.

II.2. Conclusion sur l'inhibition de la croissance des souches bactériennes

Les résultats obtenus de l'inhibition de la croissance des souches bactériennes Gram + (*S. aureus* et *M. luteus*) par les extraits d'*A. pungens* L. sont intéressants.

En comparaison avec des résultats obtenus récemment, la mise en évidence de l'inhibition de la croissance de souches bactériennes Gram + et Gram – par les extraits d'*A. pungens* L. confirme l'utilité de l'usage par les nomades d'*A. pungens* L. pour la cicatrisation des blessures.

Par ailleurs, la comparaison permet d'affirmer que selon les diamètres d'inhibition obtenus, *A. pungens* L. est une plante qui possède une bonne activité antibactérienne.

Enfin, l'activité antimicrobienne de familles de composés (comme celles présentes chez *A. pungens* L.) est fréquemment mesurée et citée dans plusieurs

ouvrages récents, ce qui permet de confirmer l'importance de travaux effectués sur des produits naturels provenant de plantes médicinales.

1.1. Comparaison entre les différentes activités anti-microbiennes des extraits d'*Aristida pungens* L.

Les résultats de la comparaison entre les inhibitions de la croissance des différents germes à savoir ; *P. falciparum*, *T. brucei*, les bactéries Gram + (*S. aureus* et *M. luteus*) et les bactéries Gram – (*E. coli* et *P. aeruginosa*) par les six extraits d'*A. pungens* L. sont reportés sur le tableau 14.

Tableau 14 : Résultats de l'ensemble des activités antimicrobiennes des extraits d'*A. pungens* L.

Extraits	<i>Plasmodium falciparum</i> , IC50 (µg/ml)	Inhibition de la croissance de <i>T. brucei</i> à 50 µg/ml	MRC-5, IC50 (µg/ml)	diamètre (en mm) d'inhibition de <i>S.aureus</i>	diamètre en (mm) d'inhibition de <i>M. luteus</i>	diamètre en (mm) d'inhibition de <i>E.coli</i>	diamètre en (mm) d'inhibition de <i>P. aeruginosa</i>
GM	11,0 ± 1,8	-	64,4 ± 17,3	8	7	7	6
GA	15,6 ± 3,5	-	120,5 ± 9,9	8	9	7	6
EM	6,9 ± 1,1	-	126,7 ± 1,4	7	6	7	6
EA	12,5 ± 2,1	-	117,9 ± 15,8	9	8	8	6
NM	10,8 ± 1,4	+	98,4 ± 5	9	6	6	6
NA	21,1 ± 3,9	+	98,9 ± 11,6	9	8	7	6

Légendes: + : inhibition de la croissance; - : absence de l'inhibition de la croissance; ± : écart type.

En se basant sur la comparaison (tab. 14), on remarque que certains extraits (NM et NA) conjuguent plusieurs activités antimicrobiennes et ne sont pas très toxiques. Ainsi, NM présente une IC50 sur *P. falciparum* de 10,8 µg/ml, une inhibition de la croissance de *T. brucei* à 50 µg/ml, un diamètre d'inhibition de *S. aureus* de 9 mm et une IC50 de toxicité sur les cellules de mammifères à 98,4 µg/ml, soit un indice de sélectivité (MRC-5/Pf) SI = 9,2.

Les deux extraits de la gaine (GM et GA) d'*A. pungens* L. présentent une activité modérée contre *P. falciparum*, ne possèdent aucune influence sur les *T. brucei* à 50 µg/ml mais, d'un autre côté, ces extraits (GM et GA) présentent de bons diamètres d'inhibition sur les bactéries Gram + (*S. aureus* et *M. luteus*).

Les extraits des entre-nœuds ne possèdent aucun effet sur la croissance des *T. brucei* à 50 µg/ml, mais l'extrait EA présente un diamètre d'inhibition sur *S. aureus* de 9 mm et une IC50 sur cellules de mammifères de 117,9 µg/ml. Quant à l'extrait EM, il donne le meilleur résultat testé sur *P. falciparum* avec une IC50 = 6,9 µg/ml, il est le moins toxique sur cellules de mammifères avec une IC50 = 126,7 µg/ml, et il possède un SI de 18,4.

Conclusion générale

Les résultats obtenus au cours de ce travail nous ont permis de caractériser les différentes familles de composés présentes à savoir les flavonoïdes, les tanins, les composés réducteurs, les stérols et les stéroïdes, les saponosides et les émодols en quantités variables dans la gaine, les entre-nœuds et les nœuds.

En outre, l'étude de l'activité biologique sur les différentes souches nous a montré que nos extraits possèdent une bonne activité antimicrobienne.

En effet, les résultats de l'inhibition des souches résistantes à la chloroquine de *P. falciparum* par les extraits d'*A. pungens* L. notamment l'extrait EM (IC₅₀ = 6,9 µg/ml) par comparaison avec les résultats d'autres travaux récemment publiés sur divers produits naturels montrent une bonne activité antipaludique.

De plus, l'étude du pouvoir d'inhibition des *T. brucei* démontre que l'extrait NM (à 50 µg/ml) possède bien une influence sur la mobilité des trypanosomes.

Par ailleurs, parmi les résultats qui nous semblent significatifs, nous retiendrons d'une part l'inhibition de la croissance des souches bactériennes Gram + (*S. aureus* et *M. luteus*) et d'autre part, la très faible toxicité de tous nos extraits d'*A. pungens* L. sur cellules de mammifères (MRC-5).

Ces résultats nous encouragent à compléter le travail par l'identification des molécules responsables de ces activités antimicrobiennes et d'envisager des perspectives de travaux plus poussés sur *Aristida pungens* L. dans le domaine de l'ethnopharmacologie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Abrassard J. L., 2001. Aromathérapie essentielle, huiles essentielles et parfums pour le corps et l'âme. Ed. Guy Tredaniel.
- 2- Abubakirov N.K., 1981, Ecdysteroids of flowering plants angiospermae, in chem. Nat. compd. 17(6), 489-503.
- 3- Amiya T. and Bando H., 1988. Aconitum Alkaloids. *Chemistry and pharmacology* (ed. Brossi A.) Vol. 34. Academic Press 95-179.
- 4- Assoc., 1991. La teinture végétale, le bleu, expos., Pour l'étude et le document. Des textiles d'Asie, Paris.
- 5- Baba Ahmed A., 2005. Séparations et caractérisations de principes actifs d'*Aristida pungens* L. (graminées), mémoire de magister, COSNA, Tlemcen.
- 6- Banz M., 2006. Bacterial contamination in the anterior chamber after providone-iodine application and the effect of the leus implantation device. *J. Cataract Refract Surg.*, 32(10), 1691-1695.
- 7- Bellakhdar J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Paris, Edition Ibis presse.
- 8- Bertrand E., Serie F., Kone I., Rive J., Sentilhes L., 1973. Symptomatologie générale de la THA au moment du dépistage. *Med. Afr. Noire* 20, 303-314.
- 9- Bibi H., Ali I., Sadozai S. K., Atta-Ur-Rahman., 2006. Phytochemical studies and antibacterial activity of *Centaureum pulchellum* Druce. *Nat Prod Res.* 20(10), 896-901.
- 10- Boiteau P., 1995. *Kalanchoe* de Madagascar : systématique, écophysiologie et phytochimie. Paris-Karthala ; Boulogne (France) – Helen Rebinstein ; Gif sur Yvette (France) – ICSN, CNRS.
- 11- Bonza E., Munoz P., Guinea J., 2006. Mucormycosis : an emerging disease? *Clinical Microbiological Infections* 12(7), 7-23.
- 12- Bouhadjera K., Bendahou M., Tabti B., 2005. Anti-microbial activity of extracts from Algerian *Aristida pungens* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8(2), 206-210.

- 13- Boukli-Hassane C., 1990. Contribution à l'étude biochimique des composés pariétaux des tissus foliaires de trois plantes steppiques : *stipa tenacissima* L., mémoire de magister, Tlemcen.
- 14- Bouzidi S., 1988. Contribution à l'étude cytogénétique de deux espèces de graminées vivaces dans les hautes plateaux Algériens : *Aristida pungens* L. et *Stipa tenassima* L., Mémoire de D.E.S, I.S.N, Oran, pp : 3.
- 15- Bringmann G., Messer K., Wolf K., Muhlbacher J., Grune M., Brun R., Louis A. M., 2002. Dioncophylline E from *Dioncophyllum thollonii*, the first 7,3'-coupled dioncophyllaceous naphthylisoquinoline alkaloid. *Phytochemistry* 60(4), 389-397.
- 16- Brossi A. et Suffness M., 1990. The alkaloids – Antitumor bisindole alkaloids from *Catharanthus roseus* L. Academic press, San Diego, vol. 37.
- 17- Brouillard R., 1988. Flavonoids and flower colour, in “the flavonoids, advances in research since 1980”. Harborne J. B., éd. 525-538, Chapman et Hall, Londres.
- 18- Brun R., Burri C., Gichuki C. W., 2001. The story of CGP 40 215: studies on its efficacy and pharmacokinetics in African green monkey infected with *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Tropical Medicine and International Health* 6(5), 362-368.
- 19- Bruneton J., 1999, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. T.E.C et DOC, 3^e Ed. Lavoisier, 675-678p.
- 20- Brunetti R., Prosseda G., Beghetto E., Colonna B., 2001. The looped domain organization of the nucleoid histone – like protein defective *Escherichia coli* strains. *Société française de biochimie et biologie moléculaire* 83(9), 873-882.
- 21- Buguet A., Bert J., Tapie P., Tabaraud F., Doua F., 1997. Circadian disorders in sleeping sickness. *Neurol. Infect. Epidemiol.* 2, 39-47.
- 22- Camacho del Rayo M., Phillipson J. D., Croft S. L., Rock P., Marshall S. J., Schiff P. L. Jr., 2002. In vitro activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytother. Res.* 16(5), 432-436.
- 23- Chautard D., 2006. Actualités en réanimation et urgences. Société de réanimation de la langue française (SRLF). 1^{ère} Ed.

- 24- Chevalier L., Desbuquois C., Le Lannic J., Charrier M., 2001. Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *Comptes rendus Biologie* 324(11), 979-987.
- 25- Cordell G., 1981, Introduction to alkaloids. A biogenetic Approach, Wiley-Interscience, New York.
- 26- Cos P., Vlietinck A. J., Berghe D. V., Maes L., 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Journal of Ethnopharmacology* 106(3), 290-302.
- 27- Cunha S., Odijk T., Suleymanoglu E., Woldringh C. L., 2001. Isolation of the *Escherichia coli* nucleoid. *Société française de biochimie et biologie moléculaire* 83(2), 149-154.
- 28- Dalton, D.R., 1979, The Alkaloids, Marcel Delker, New York, 100p.
- 29- Danin, A., 1991. Plant adaptation in desert dunes. *Journal of arid environment* 21, 193-212.
- 30- Darke R.. 2003. Encyclopédie des graminées ornementales, éditions du Rouergne.
- 31- Delaveau P., 1999. Poaceae à huiles essentielles: Citronnelle, Verveine des Indes et autres... *Actualités pharmaceutiques* 371, 51-52.
- 32- Delpine M., 1954, Sur le mot « alcaloïdes » et la présence d'azote dans les alcaloïdes, *Annales Pharmaceutiques Françaises* 10(3), 208.
- 33- Demirayak S., 2005. synthesis and antimicrobial activities of some 3-arylamino-5-[2-(substituted-1-amidazolyl)ethyl]1,2,4-triazole derivatives. *European Journal of medicine Chemistry* 35(11), 1037-1040.
- 34- Denis M. et Mouchet J., 1991 – Paludisme. Ellipses/Aupelf.
- 35- Desjardins R.E., Canfield C. J., David Haynes J., Chulay J. D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 16(6), 710-718.
- 36- Diarbi K., 1989. Contribution à l'étude de l'Aristida (*Aristida pungens* Desf), anatomie et caractérisation enzymatique du tissu fibreux foliaire. Mémoire de D.E.S, I.S.N., Oran, pp : 28.
- 37- Doucet O., Lanvin M., Thillou C., Linossier C., Pupat C., Merlin B., Zastrow L., 2005. Reconstitution human corneal epithelium: A new alternative to the draize eye

- test for the assessment of the eye irritation potential of chemicals and cosmetic products. *Toxicology in vitro* 20, 499-512.
- 38- Dumas M., 1976. Traitement de la trypanosomiase humaine Africaine en milieu hospitalier. *Med. Afr. Noire* 23, 39-41.
- 39- Dumas M., 1995. Human African Trypanosomiasis. In : *Tropical Neurology*, vol 1, pp. 339-344, Shakir R. A., Newman P. K. and Poser C. M. (eds), Bailliere Tindal, London.
- 40- El Rhaffari L., Zaid A., 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Actes du 4^e congrès européen d'Ethnopharmacologie : origine des pharmacopées savantes, Metz, 11-13 mai 2000. Publiés par le CRD Montpellier, 295-304.
- 41- Enanga B., Burshmore R. J. S., Stewart M. L., Barrett M. P., 2002. Sleeping sickness and the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 845-858.
- 42- Fidock D.A., Rosenhalt P. J., Croft S. L., Brun R., Nwaka S., 2004. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compounds screening. *Nature reviews* 3, 509-520.
- 43- Fisher K., Phillips C. A., 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 101(6), 1232-1240.
- 44- Freiburghaus F., Ogwal E. N., Nkunya M. H., Kaminsky R., Brun R., 1996. In vitro antitrypanosomal activity of African plants used in traditional medicine in Uganda to treat sleeping sickness. *Tropical Medicine of International Health* 1(6), 765-771.
- 45- Freitas-Junior L. H., Bottius L. A. Pirrit K. W. Deitsch C. Scheidig F. Guinet U. Nehrbass T. E. Wellems and A. Scherf, 2000. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome clusters of *P. falciparum*. *Nature* 407, 1018-1022.
- 46- Gaëlle Ollivier et Dominique Legros, 2001. Trypanosomiase humaine africaine : historique de la thérapeutique et de ses échecs. *Tropical Medicine and International Health* 6(11), 855-863.

- 47- Gaignault J.-C.; Bidet D.; Gaillard M.; Perronet J., 1997, « *Stérols et stéroïdes* », Ellipse, éd Marketing S.A., Paris, 14, 115, 119, 149, 155, 159pp.
- 48- Gastellu Etchegorry. M., Helenport J. P., Pecoul B., Jannin J., Legros D., 2001. Availability and affordability of treatment for Human African Trypanosomiasis. *Tropical Medicine and International Health* 6(11), 657-959.
- 49- Geld H. M. and Hol G. W. 2002. *Science*, 297, pp. 343.
- 50- Gil F., De la Iglesia R., Mendoza L., Gonzalez B., Wilkens M., 2006. Soil bacteria are differentially affected by the resin of the medicinal plant *Pseudognaphalium vira vira* and its main component kaurenoic acid. *Microb Ecol.* 52(1), 10-18.
- 51- Glombitza K., Gerstberger G., 1985. Phlorotannins with dibenzodioxin structural elements from the brown alga *Eisenia arborea*. *Phytochemistry* 24, 53-551.
- 52- Goodwin T.W., 1965. *Chemistry and Biochemistry of plant pigment*, New York, 200p.
- 53- Gorske A., McQueen C., 2001. Treatment of gastrointestinal infections. *Curr. Opin. Gastroenterology* 17(1), 46-51.
- 54- Guintzburger C., 1986. Seasonal variation in abone-grand. *Annuel and perennial of management*, 39 : 348-353.
- 55- Harborne B., 1993, *The flavonoïds : Advances in research since 1986*, Chapman and Hall, New York.
- 56- Harche M., Tollier M.I., Monties, S.B., et Catesson A.M., 1991. Caractérisation comparée des constituants (polyosides, lignines et acides phénoliques) des parois de *Stipa tenacissima*, *Lygeum spartum* et *Aristida pungens*. *Cellulose and technology* 25, 11-17
- 57- Haslam E., 1995, Complexation and oxidation transformation of polyphenols. In: Ed. A. Scalber, *polyphenols 94*. Palma de Mallorca (Spain), les colloques de l'INRA 69, 45-55.
- 58- Hejny J.. 1978. Etude de la sensibilité des mycobactéries atypiques aux antibiotiques non spécifiques et aux sulfamides par la méthode des proportions. *Revue Française des Maladies Respiratoires* 6, 173-178.
- 59- Hongean Lin, Yi Xu, Yanke Ma, Peijin Zhou, 2000. Characterization of *Micrococcus antracticus* sp. Nov., a psychophilic bacterium from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 715-719.

- 60- Hostettman K., Marston A., 1995 Saponins: chemistry and pharmacology of natural products. Chemistry and pharmacology of natural products, saponins, New York, Cambridge University Press.
- 61- <http://fr.wikipedia.org/wiki/plasmodium>.
- 62- <http://tapageperso.aol.fr/fmeignant/aris.html>.
- 63- Hutchinson O. C., Févre E. M., Carrington M., Welburn S. C., 2003. Lessons learned from the emergence of a new *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness focus in Uganda. The Lancet infectious diseases 42-44.
- 64- Isobe T., Doe M., Morimoto Y., Nagata K., Ohsaki A., 2006. The anti-Helicobacter pylori flavones in a Brazilian plant, Hyptis fasciculata, and the activity of methoxyflavones. Biol Pharm Bull. 29(5), 1039-1041.
- 65- Iroka J. Udeinya and Akogyeram O., 1993. Induction of adhesiveness in human endothelial cells by Plasmodium falciparum infected erythrocytes. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 48(4), 488-495.
- 66- Jack R. W., Tagg J. R., Ray B., 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 171-200.
- 67- Jarraud S., Lina G., Vaudenesch F., Etienne J., 2002. Epidémiologie des infections toxémiques à Staphylocoque doré. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation 21(5), 370-374.
- 68- Jovet P., et De Vilmorin R., 1970. Flore descriptive et illustrée de la France, t. V : Graminées, Librairie scientifique et technique, Paris, pp : 210.
- 69- Kamanzi Atindehou K., Schmid C., Brun R., Kone M. W., Traore D., 2004. Antitrypanosomal and antiplasmodial activity of medicinal plants from Cote d'Ivoire. Journal of Ethnopharmacology 90(2-3), 221-227.
- 70- Kevin J. Saliba, Kiaran Kirk, 2005. CJ-15,801 , a fungal natural product, inhibits the intraerythrocytic stage of Plasmodium falciparum in vitro via an effect on pantothenic acid utilisation. Molecular & Biochemical Parasitology 141, 129-131.
- 71- Khan M. R., Omoloso A. D., Barewai Y., 2006. Antimicrobial activity of the Derris elliptica, Derris indica and Derris trifoliata extractives. Fitoterapia 77(4), 327-30.

- 72- Kristenssen K., 1995. Nervous system dysfunctions in African trypanosomiasis. In: Recent Advances in Tropical Neurology, pp. 165-174, Rose F. C. (ed.). Elsevier, Amsterdam.
- 73- Kumar V. P., Chauhan N. S., Padh H., Rajani M., 2006. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology 107(2), 182-188.
- 74- Lampard S., 1994. A la découverte des Grassettes du Mexique. The international Pinguicula Study Group Newsletter N° 5.
- 75- Lapiere J., 1973. Maladies exotiques et parasitaires autochtones. Laboratoires Fournier Frères, 4^e édition. Paris, France, 158p.
- 76- Larivee L., 2002. Les huiles essentielles, un arsenal de guerre contre les microbes. Publications 4 temps Vol. 21. N° 4.
- 77- Larousse, 2001. Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins, I.S.N.B : 2-03-560252-1.
- 78- Larrondo J. V. et M. A. Calvo, 1991. Effect of essential oils on candida albicans : a scanning electron microscope study. Biomedical letters 46(184), 269-272.
- 79- Lazdunski A., 2003. *Pseudomonas aeruginosa* : modèle de choix pour l'étude d'une bactérie pathogène opportuniste. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation 22(6), 523.
- 80- Leclercq R., 2002. Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation 21(5), 375-383.
- 81- Lepape A., 2003. Epidémiologie des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation 22(6), 531.
- 82- Lorand T., Kocsis B., Sohar P., Nagy G., Kispal G., Krane H. G., Schmitt H., Weckert E., 2001. Synthesis and antibacterial study of unsaturated Maunich Ketones. European Journal of Medicinal Chemistry 36(9), 705-717.
- 83- Mahato S. B., Nandy A.K., Roy G., 1992, Triterpenoids, Phytochemistry, 32, 2199p.
- 84- Martin G & Leboeuf ? (1908) sur l'emploi de l'Atoxyl seul dans le traitement de la trypanosomiase humaine. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 1, 624-630.
- 85- Martin P. J., 1991. The Zanzibar clove industry, Econ. Bot. 45, 450-459.

- 86- Mazumder A., Mahato A., Mazumder R., 2006. Antimicrobial potentiality of *Phyllanthus amarus* against drug resistant pathogens. *Nat Prod Res.* 20(4), 323-326.
- 87- Mbatchi S. F., Mbatchi B., Banzouzi J. T., Bansimba T., Nsonde Ntandou G. F., Ouamba J. M., Berry A., Benoit-Vical F., 2006. In vitro antiplasmodial activity of 18 plants used en Congo Brazzaville traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 104 (1-2), 168-174.
- 88- Mekhaldi A., 1994. contribution à l'étude d'*Aristida pungens* L. : germination, structure et ultrastructure du tissu fibreux, obtention de papetière à partir des tissus fibreux et caulinaire ; thèse de magister, pp : 97.
- 89- Mekonnen Y., Yardley V., Rock P., Croft S., 1999. In vitro antitrypanosomal activity of *Moringa stenopetala* leaves and roots. *Phytother Res.* 13(6), 538-539.
- 90- Mohammed I., Denis A., Duperret S., Chapuis F., Ploin D., 2003. Facteurs de risque d'infection à *Escherichia coli* résistant à l'amoxicilline-acide clavulanique en réanimation. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* 22(8), 711-715.
- 91- Moideen S. V., Houghton P. J., Rock P., Croft S. L., Aboagye-Nyame F. 1999. Activity of extracts and naphthoquinones from *Kigelia pinnata* against *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Planta Med.* 65(6), 536-540.
- 92- Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- 93- Mothes K., Schütte H. R. et Luckner M., 1985. *Biochemistry of alkaloids*, VCH, Berlin.
- 94- Mott, J.J., 1972. Germination studies on some annuals species from an arid region of western Australia *J of Ecology* 60, 293-304.
- 95- Mugedo J. Z. A. et Watermann P. G., 1992. Sources of tannin : alternative to wattle (*Acacia mearnsii*) among indigenous kenyan species, *Econ. Bot.* 46, 55-63.
- 96- Murciano C., Villamon E., Yanez A., 2006. Impaired immune response to *Candida albicans* in aged mice. *Journal of Medical Biology* 55(12), 1649-1656.
- 97- Nuchhi R., 2006. Roll Back Malaria 2001-2010 United Nations Decade to Roll back Malaria.

- 98- Ollivier G. et Legros D., 2001. Trypanosomiase humaine africaine : historique de la thérapeutique et de ses échecs. *Tropical Medicine and International Health* 6(11), 855-863.
- 99- Onwunming S., 1989. Evaluation of antifungal activity of lemongrass oil. *Int. J. of crude drug research* 27, 121-126.
- 100- Otshudi A. L., Apers S., Pieters L., Claeys M., Pannecouque C., De Clercq E., Van Zeebroeck A., Lauwers S., Frederich M., Foriers A., 2005. Biologically active bisbenzylisoquinoline alkaloids from the root bark of *Epinetrum Villosum*. *Journal of Ethnopharmacology* 102(1), 89-94.
- 101- Ozenda P., 1983. Flore du Sahara, 2^e éd. CNRS Grenoble, France, pp : 642.
- 102- Ozenda P., 2004. Flore et végétation du Sahara, 3^e éd. CNRS éditions.
- 103- Paul A., 1997, 1^{er} cycle universitaire, « Chimie organique cours », 16 Ed. Dunod., 313p.
- 104- Pelletier S.W., 1983-1988. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, 6 volumes. John Wiley et sous, New York.
- 105- Philippe G., Angenot L., De Mol P., Goffin E., Hayette M. P., Tits M., Frederich M., 2005. In vitro screening of some *Strychnos* species for antiplasmodial activity. *Journal of ethnopharmacology* 97(3), 535-539.
- 106- Pinkas M.; Trotin F.; Bézanger-Beauquesne, 1992. Les Plantes dans la thérapeutique, Maloine, Paris, 2e éd, 187p.
- 107- Porter L. J., 1989. Tannins in methods in plant Biochemistry (Plant Phenolics), Ed. P.M. Dey and J.B. Harbone, Academic Press, London 1, 389-419.
- 108- Prat H., 1960. La Systématique des Graminées, in *Ann. Sci. nat. Bot.*, t. XVIII.
- 109- Prevost K., Magal P., Beaumont C., 2006. A model of Salmonella within industrial house hens. *Journal of Theoretical Biology* 242(3), 755-763.
- 110- Quezel P., et Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. 2^e tome, éd. CNRS, France, pp : 1170.
- 111- Roux C., Almaraz T., Durrieu G., 1998. Phylogénie de champignons responsables des charbons des végétaux à partir de l'analyse des sequences ITS. *Comptes rendu Biologies* 321(7), 603-609.
- 112- Robin J. M, Norman R. F., 1988. Study on Medicinal Plant Research in Guinea *Economic and Medicinal Plant Research* 6, 151.

- 113- Ryckebusch A., Deprez-Poulain R., Debreu-Fontaine M. A., Vandaele R., Mouray E., Grellier P., Sergheraert C., 2003. Synthesis and *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of N1-(7-chloro-4-quinolyl)-1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine derivatives. *J Med Chem.* 46(4), 542-57.
- 114- Sato M., Maulik N. et Das D.K., 2002. Cardioprotection with Alcohol : Role of Both Alcohol and polyphenolic Antioxidants In : Alcohol and wine in health and disease. Palo Alto, CA, April 26-29, 2001. *Annals of New York Academy of Sciences*, Das D.K et Ursini F. (Dir.), *New York Academy of Sciences* 957, 122-135.
- 115- Schnell R., 1977. Flore et végétation de l'Afrique Tropicale, Tome 2. Ed. Ghautier villars, Paris, pp : 375.
- 116- Shuhna Yang., Shunji Sugawara, Toshikiko Monodane, 2001. *Micrococcus luteus* Teichuronic Acids Activate human and Murine Monocytic Cells in a CD14- and Toll-like Receptor 4-Dependant Manner. *Infection and Immunity* 96(4), 2025-2030.
- 117- SOM 208, 2006. Microbiology Syllabus Malaria.
- 118- Song J. H., Yang T. C., Chang K. W., Han S. K., Yi H. K., Jeon J. G., 2006. In vitro anti-cariogenic activity of dichloromethane fraction from *Rheum undulatum* L. root. *Arch Pharm Res.* 29(6), 490-496.
- 119- Suffredini I. B., Paciencia M. L., Nepomuceno D. C., Younes R. N., Varella A. D., 2006. Antibacterial and cytotoxic activity of Brazilian plant extracts--Clusiaceae. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101(3), 287-290.
- 120- Tasdemir D., Brun R., Perozzo R., Donmez A. A., 2005. Evaluation of antiprotozoal and plasmodial enoyl-ACP reductase inhibition potential of turkish medicinal plants. *Phytother. Res.* 19(2), 162-166.
- 121- Tasdemir D., Güner Deniz Nadide, Perozzo R., Brun R., Dönmez A. A., 2005. Anti-protozoal and plasmodial FabI enzyme inhibiting metabolites of *Scrophularia lepidota* roots. *Phytochemistry* 66, 355-362.
- 122- Thei Dame., Wyman C., Goosen N., 2001. Structural basis for preferencial binding of H-NS to curved DNA. *Société française de biochimie et biologie moléculaire* 83(2), 231-234.
- 123- Thomson R.H., 1987, Naturally occuring Quinones, Chapman and Hall, 3e Ed. New York.

- 124- Timberlake C. F. et Henry B. S. (1988). Anthocyanins as natural food colorants, in Plant flavonoids in biology and medicine II : biochemical, cellular, and medicinal properties, (Cody V., Middleton E., Harborne J. B. et Beretz A., édés), p. 107-121, Alan R. Liss, New York.
- 125- Toutain G., 1979. Eléments d'agronomie saharienne de la recherche au développement. Paris, pp: 277.
- 126- Trager W. and Jensen J. B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673-675.
- 127- Truffault A., Mimoz O., Karim A., Edouard A., Nordmann P., Samii K., 2000. La colonisation par *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline est un facteur prédictif du phénotype de résistance d'une souche infectante à *S. aureus*. Annales françaises d'anesthésie et de réanimation 19(3), 151-155.
- 128- Tsutomu F., Hisashi K., 1971. Studies in seed dormancy. Phytochemistry 10, 1607.
- 129- Van der Beek et John G., 1998. Genetic variation among pathogenetic Meloidogine species revealed by AFLPS and 2D-protein electrophoresis contrasted to morphology. Fundamental and applied Nematology 21(4), 401-411.
- 130- Veno O., 1992. Immunogold localisation of photosynthetic enzymes in leaves of *Aristida latifolia*, a unique C₄ grass with a double chloenchymatons bundle sheath physiol. Plant 85,189-196.
- 131- Vestal A.G., 1971. Foothills vegetation in Colorado front range, Bot. Gaz. 64, 353-385.
- 132- Waako P. J., Gumede B., Smith P., Folb P. I., 2005. The *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity of *Cardiospermum halicacabum* L. and *Homocardica foetida* Schmuch. Et Thonn. Journal of Ethnopharmacology 99(1), 137-143.
- 133- Waters A.P. et Janse C.J., 2005. Genomes and Molecular Biology, British Library.
- 134- Welburn S.C., Fèvre E. and Coleman P., 1999. Sleeping Sickness Rediscovered. Parasitology Today 15(8), 303-305.
- 135- Welburn S.C. and Maudin I., 1999. Tsetse-Trypanosome Interactions: Rites of Passage. Parasitology Today 15(10), 399-403.
- 136- World Health Organization, 2006. Guidelines for the treatment of malaria.

- 137- Wright C.W., 2005. Plant derived antimalarial agents: New lead and challenges. *Phytochemistry Reviews* 4: 55-61.
- 138- Wube A. A., Bucar F., Asres K., Gibbons S., Rattray L., Croft S. L., 2005. Antimalarial compounds from *Kniphofia foliosa* roots. *Phytother. Res.* 19(6), 472-476.
- 139- Yabu Y., Nose M., Koide T., Ohta N., Ogihara Y., 1998. Antitrypanosomal effects of traditional Chinese herbal medicines on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in vitro. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 29(3), 599-604.
- 140- Youcef I., 1991. Essai d'obtention de pâte crue et blanchie à partir d'une graminée vivace : *Aristida pungens* L. mémoire de D.E.S, I.S.N., Oran, pp : 66.
- 141- Zaidan M. R., Noor Rain A., Badrul A. R., Adlin A., Norazah A., Zakiah I., 2005. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop. Biomed.* 22(2), 165-170.
- 142- Zirihi Guédé Noël, Mambu L., Guédé-Guina F., Bodo B., Grellier P., 2005. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of 33 West African plants used for treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 281-285.
- 143- Zohary M., 1973. *Geobotanical foundation of the Middle East*. Vol. 1 and 2, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart; Swets et Zeitlinger, 739 p.

REVELATEURS

- 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 reposée 30 min à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert. D'autre part, cette réaction donne respectivement avec les hétérosides stéroïdiques et triterpéniques des colorations vert bleu et vert violet.

- Réactif de **Mayer**

Dissoudre 1,358 g de HgCl_2 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 100ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble plus un précipité blanc.

- Réactif de **Wagner**

Dissoudre 2 g de KI et 1,27 g de I_2 dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un précipité brun.

- Liqueur de **Fehling**

La liqueur de Fehling est un mélange de deux solutions :

- Fehling A : dissoudre un nombre x de grammes 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.

- Réaction de **Borntäger**

En milieu alcalin aqueux ces composés donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et la nature des substituants de la quinone, de l'orange rouge au violet pourpre plus ou moins violacée.

- **HEPES**

N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic.

- Cellules de **MALASSEZ**

Les cellules de Malassez permettent de dénombrer, dans un petit volume connu de liquide, à l'aide d'un microscope photonique, le nombre de cellules en suspension. Elles consistent en une plaque de verre creusée de deux rainures parallèles, délimitant une surface plane dans laquelle sont tracés des traits.

Après comptage de 10 rectangles, la formule permettant l'obtention de la dilution à partir du nombre e de cellules comptées est la suivante : $\bar{e} \times \text{Dilution} \times 10^{-5}$ cellules/ml.

- **Diff quick**

Solution contenant du Bleu de méthylène, de l'éosine dissoute dans du MeOH.

MILIEUX DE CULTURE

- La formule type d'un milieu nutritif complexe est la suivante :

- Macération de viande 1000 ml.
- Peptone bactériologique 10 g.
- NaCl 5 g.
- (agar) 15 g.
- pH ajusté à 7,2 – 7,4 avec NaOH 1N.

- Le milieu Muller-Hinton est standardisé selon les normes O.M.S. La formule type est la suivante :

- Infusion de viande de bœuf 300 g.
- Acidicase 17,5 g.
- Amidon 1,5 g.
- Eau distillée 1000 ml.

- pH = 7,4. On ajoute au milieu liquide une proportion de gélose.

Tableau 15 : Estimation de l'activité de l'extrait GM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Concentration (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,390	0,195	0,097	0,048	0,024
CPM	1155	4296	7112	11609	13802	16364	18962	18894	19106	17786	17517	13588

Tableau 16 : Estimation de l'activité de l'extrait GA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Concentration (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,390	0,195	0,097	0,048	0,024
CPM	641	3345	7593	12435	13050	12939	15981	14695	15780	15097	15713	14482

Tableau 17 : Estimation de l'activité de l'extrait EM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Concentration (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,390	0,195	0,097	0,048	0,024
CPM	875	2406	5067	9046	13409	16341	17224	19788	20281	18770	17874	1704

Tableau 18 : Estimation de l'activité de l'extrait EA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Concentration (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,390	0,195	0,097	0,048	0,024
CPM	898	4205	8375	13128	16576	16810	17359	17137	17627	20146	17774	160

Tableau 19 : Estimation de l'activité de l'extrait NM sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Concentration (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,390	0,195	0,097	0,048	0,024
CPM	730	4116	7157	10600	12704	14807	15690	16283	16878	16910	15768	168

Tableau 20 : Estimation de l'activité de l'extrait NA sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Concentration (µg/ml)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,390	0,195	0,097	0,048	0,024
CPM	5044	7067	10679	12055	13901	15041	15309	15410	14885	14851	13128	13

Tableau 21 : Estimation de l'activité de l'*Amodiaquine* sur la souche de *P.falciparum* en culture *in vitro*.

Concentration (nM)	250	125	62,5	31,25	15,625	7,812	3,906	1,953	0,976	0,488	0,244	0,122
CPM	819	462	451	775	652	2607	12088	14942	16297	17157	16809	17101