

M/307 - 94 / 03

Université Abou Bekr Belkaid
Tlemcen Algérie



جامعة أبي بكر بلقايد



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOUBAKR BELKAID - TLEMCEM

Faculté des sciences

Département de Chimie

Laboratoire de Chimie Organique Substances

Naturelles et Analyses - COSNA -



Soutenu par:

ZIRAR MOHAMED

En vue d'obtenir le diplôme de:

Master

Spécialité : *Chimie Bio-Organique et Thérapeutique*

**Sujet : Contribution à l'étude chimique et biologique de
*Calycotome spinosa L.***

Dirigé par : Merghach Salima

Soutenu le 10 juin 2009 devant le jury composé de :

<i>Tabti Boufeldja.</i>	<i>Professeur</i>	<i>Président</i>	<i>UABT</i>
<i>Atmani Abdelkrim</i>	<i>Maître de Conférences</i>	<i>Examineur</i>	<i>UABT</i>
<i>Bensaid Okkacha</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineur</i>	<i>UABT</i>
<i>Arrar Zoheir</i>	<i>Maître de Conférences</i>	<i>Examineur</i>	<i>UABT</i>
<i>Allali Hocine</i>	<i>Maître de Conférences</i>	<i>Examineur</i>	<i>UABT</i>
<i>Ghalem Saïd</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineur</i>	<i>UABT</i>
<i>Joseph Kajima Mulengi</i>	<i>Professeur</i>	<i>Examineur</i>	<i>UABT</i>

Inscrit Sous le N°:
Date le: 09/06/2009
Code: 7855

bibliothèque des sciences



BPS11939

23 SEP 2008
36/11

Remerciements

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses COSNA de l'université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen, sous la direction du Professeur Joseph Kajima Mulengi.

je tiens à exprimer ma plus vive reconnaissance à mon encadreur le dr. Merghach Safima qui m'a beaucoup soutenu au cours des expériences effectuées dans notre laboratoire.

Monsieur le Professeur TABII Boufeldja, je vous remercie d'avoir présidé le jury de cette thèse.

Je remercie le Professeur Ghalem Said, le Professeur Joseph kajima mulengi, le Dr. Atmani Abdelkrim, le Professeur BENSALD Okkacha, le Dr. ARRAR Zoheir ainsi que le Dr. Allali Hocine de l'honneur qu'ils me font de juger ce travail.

Je tiens à remercier tous mes camarades de « promo » avec qui j'ai passé de joyeux moments.

Je tiens aussi à exprimer ma profonde reconnaissance à tout les membres du Laboratoire de Chimie Organique Substances Naturelles et Analyses COSNA.

Je remercie également mes parents mes frères et sœurs, et tout mes amis pour leurs encouragements et leur soutien permanent.

DEDICACES

A mes parents

A ma famille

A mes frères et sœurs

A mon cousin Boulnoir Abd Nour et sa famille

A mes amis

A toutes les mains qui m'ont été tendues...

Sommaire

Introduction.....	1
Références bibliographiques.....	4

CHAPITRE 1

PRESENTATION DE LA PLANTE

I. Généralités sur la famille des légumineuses (fabaceae).....	5
I.1. Introduction.....	5
II. Description de <i>Calycotome spinosa</i>	6
II.1. Genre.....	6
II.2. Synonymes.....	6
II.3. Etymologie.....	6
II.4. Description botanique et répartition géographique.....	6
III. Travaux de type chimique et biologique effectués sur le genre <i>Calycotome</i>	
III.1. Introduction	7
III.2. Etude de type chimique.....	7
III.3. Etude de type biologique.....	10
Références bibliographiques.....	11

CHAPITRE 2

ACTIVITE ANTIOXYDANTE

I. Généralités sur les antioxydants.....	12
II. Mécanisme d'action des antioxydants.....	12
III. Principales sources d'antioxydants.....	12
Références bibliographiques.....	17

CHAPITRE 3

DIABETE ET PHYTOTHERAPIE

I.Introduction	19
II. Principaux traitements	19
III. Types de diabète.....	20
IV. Complication	20
V. Plantes antidiabétiques	21
Références bibliographiques.....	22

CHAPITRE 4

ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET METABOLITES SECONDAIRES

I. Généralités sur les bactéries.....	23
II. Principaux métabolites secondaires antibactériens.....	23
Références bibliographiques.....	25

CHAPITRE 5

PARTIE EXPERIMENTALE

I. Introduction.....	26
II. Matériel végétal.....	26
II.1. Origine géographique et période de récolte.....	26
II.2. Identification botanique.....	26
II.3. Préparation des échantillons.....	26
III. Matériel et méthodes.....	26
IV. Tests phytochimiques.....	26
V. Réactif de caractérisation.....	28
VI. Extraction des racines de <i>calycotome spinosa L.</i>	29
VII. fractionnement de l'extrait méthanolique des racines de <i>calycotome spinosa L.</i>	30
VIII. Extraction des différentes parties de la plante.....	30
IX. Extraction de l'huile essentielle des fleurs.....	31

X. Activité biologique.....	31
X.1. Activité antimicrobienne.....	31
X.1.1. Provenance des germes.....	31
X.1.2. Choix des antibiotiques.....	32
X.1.3. Méthode utilisée.....	32
X.2. Activité antioxydante.....	33
Référence bibliographique.....	35

CHAPITRE 6

RESULTATS

I. Résultats des tests phytochimiques.....	37
II. Extraction et purification des racines de <i>calycotome spinosa l.</i>	39
II.1. Rendements des extractions.....	39
II.2. Purification de l'extrait 3.....	39
III. Résultats des extractions faites sur les différentes parties de la plante.....	40
IV. pouvoir antibactérien et antioxydant des extraits et de l'huile essentielle de <i>calycotome spinosa L.</i>	40
IV.1. Effet antibactérien.....	40

IV.2.Effet antioxydant.....42

Conclusion.....43

Introduction générale

Introduction

A l'origine, la nature constituée essentiellement d'êtres végétaux, servait d'alimentation aux animaux et aux hommes peuplant la terre. Mais à côté de cette fonction nutritionnelle, l'homme découvrit bien d'autres fonctions que pouvaient lui procurer les plantes: notamment le pouvoir de guérison. En effet cette faculté de guérison des plantes fut connue longtemps de nos ancêtres depuis les temps reculés. Elle deviendra plus tard la médecine traditionnelle avec toutes les avancées notoires qu'on peut lui attribuer.

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus. C'est pourquoi on utilise à nouveau l'absinthe Chinoise (*Artemisia annua*) et surtout son principe actif pour soigner la malaria lorsque les protozoaires responsables de la maladie résistent aux médicaments. La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques [1].

En Afrique, jusqu'à 80% de la population utilise la médecine traditionnelle pour répondre à ses besoins de soins de santé. Précisément, dans certains pays d'Afrique, les plantes médicinales représentent la seule source de médicaments pour près de 90% de la population [2]. De même, dans de nombreux pays asiatiques la médecine traditionnelle continue d'être largement utilisée, même si l'allopathie est facilement disponible. En Chine, l'utilisation des remèdes traditionnels représente 40% de tous les soins de santé. En même temps, pour certains pays de l'Amérique Latine, il a été rapporté que 71% de la population de Chili et 40% de la population de Colombie ont utilisé la médecine traditionnelle [3].

La médecine traditionnelle est également très populaire dans de nombreux pays développés parce qu'elle est fermement intégrée à des systèmes de croyance plus globaux [3].

Durant ces deux dernières décennies, la recherche en phytothérapie devient une des plus grandes préoccupations scientifiques [4]. De fait, l'OMS a mis une stratégie pour la médecine traditionnelle dont le but est de maximiser les possibilités de cette forme de médecine en tant qu'une source de soins de santé, et de protéger la matière première surtout dans le cas des plantes [3].

Comme la plus part des plantes poussent naturellement dans un grand nombre de pays, une plante qui présente un intérêt potentiel dans un pays peut fort bien avoir fait ailleurs l'objet d'une étude scientifique. Si les observations ainsi faites étaient communiquées à toutes les personnes intéressées beaucoup de temps et d'efforts pourraient être épargnés. Lorsqu'il s'agit de drogue, la mise en commun des informations est particulièrement capitale vu qu'un jugement de valeur sur l'innocuité ou l'efficacité d'une drogue donne peut rarement s'appuyer sur les résultats d'une seule étude. En revanche, si il' on dispose d'un ensemble de renseignements attestant qu'une certaine plante est utilisée depuis des siècles par le système de soins de santé local, ainsi que de données sur son efficacité et sa toxicité publiées par plusieurs groupes de chercheurs, il est plus facile de décider si cette plante peut être capable comme plante médicinale [5].

La méthode globale de travail que nous allons adopter, est basée sur une action pluridisciplinaire, visant une valorisation des plantes de la flore de la région de Tlemcen, utilisées en médecine traditionnelle et permettant de relier conformément les éléments d'information apportés par les ethnobotanistes, au travail des chimistes et des biologistes.

En se basant sur les résultats d'enquêtes ethnopharmacologiques effectuées auprès de la population de la région de Tlemcen, *Calycotome spinosa* a fait l'objet de notre étude. Le choix de celle-ci a été guidé par les indications d'usage traditionnel mais aussi par le fait que cette plante appartient à une famille botanique où l'on retrouve des groupes chimiques ayant des activités biologiques variées. En plus, cette espèce n'est peu étudiée.

La première partie de ce manuscrit concernera les résultats d'une recherche bibliographique.

La seconde partie portera sur les travaux réalisés sur la plante sélectionnée.

Il nous a paru intéressant et nécessaire de combler le vide par :

- ◆ La détermination des différentes classes de familles chimiques par criblage phytochimique.

Introduction générale

◆ La réalisation de quelques extractions des différentes parties de la plante, en utilisant des solvants à polarité croissante.

◆ La réalisation d'une chromatographie sur colonne dans le but d'obtenir quelques composés purs.

◆ L'extraction de l'huile essentielle des fleurs de *Calycotome spinosa* par hydrodistillation.

◆ La détermination de l'activité antibactérienne des extraits.

◆ La détermination du pouvoir antioxydant des extraits.

Références bibliographiques

- [1] **P.Iserin.**
Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins;2001.
- [2] **A.Laure.**
Phytochemica investigation of plants used in African traditional medicine:
“*Dioscorea sylvatica*” (Dioscoreaceae), “*Urginea altissima*” (Liliaceae),
“*Jamesbrittenia fodina*” and “*J. Elegantissima*” (Scrophulariaceae). *Thèse de
Doctorat, Université de Lausanne, 2002.*
- [3] **O.M.S.**
Stratégie de l’OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005.
- [4] **Niyah Njike G, Watcho P, Nguelefack TB, Kamanyi A.**
Hypoglycaemic activity of the leaves of *Bersama engleriana* in rats. *Afr J Trad.* 2005;
2(3): 215-221.
- [5] **O. Akerele**
L’OMS et la médecine traditionnelle : Chemin parcouru et perspectives. *Chronique
OMS, 1984.*

CHAPITRE 1

PRESENTATION DE LA PLANTE

I. Généralités sur la famille des légumineuses (Fabaceae)

I.1 Introduction

Les *Fabacées* constituent la 3^{ème} famille la plus importante du monde végétal (environ 16000 espèces) après les *Astéracées* et les *Orchidacées*. On y trouve des plantes herbacées, grimpantes, des buissonnantes et de vrais arbres. Elles peuvent être annuelles, vivaces, à feuilles caduques ou persistantes. La famille des Fabacées comprend 3 sous-familles [1] :

- a- les Mimosées véritables Acacia ou mimosas des fleuristes.
- b- les Césalpiniées : le Caroubier.
- c- les Papilionacées qui ont une importance économique remarquable dans: l'alimentation humaine où elles sont une ressource, suivant la spécificité de leurs graines :
 - graines amylacées : pois, haricots, fèves, lentilles.
 - graines riches en huiles végétales : arachides.
 - graines riches en protéines : soja.
 - la production de fourrage : luzernes, trèfles, sainfoins, lotiers.

Les applications pharmaceutiques : de très nombreuses préparations (baumes, gommés, sirops, insecticides) sont faits à partir de *Fabacées papilionacées*.

Les particularités : physiologiques les Fabacées vivent en relation symbiotique avec des bactéries installées dans leurs racines. Ces bactéries ont la capacité de capturer l'azote de l'atmosphère et de le transformer en substances azotées utilisables par la plante. C'est pourquoi elles peuvent se développer sur des sols pauvres en azote et l'enrichir (engrais vert) [2].

Les caractéristiques générales des Fabaceae :[3]

- Feuilles simples, trifoliées ou pennées avec souvent des stipules (sorte de fausse petite feuille) à la base. Beaucoup portent une vrille rattachée à la feuille ;
- Fleurs solitaires, en épis, grappes ou panicules ;
- Calice à 5 parties, vaguement tubulaire ;
- 5 pétales différents : un étendard, 2 ailes, 2 inférieurs soudés (carène) ;
- 10 étamines (rarement plus) placées en 2 groupes (diplostémone) ;

- 1 seul carpelle qui donnera une gousse ou "légume". Cette gousse se différencie du follicule par la présence de 2 ouvertures, une ventrale et une dorsale (exemple : le petit pois).

II. Description de *Calycotome spinosa* L.

II.1. Genre

Genre : calycotome

Espèce : spinosa

II.2. Synonymes [6]

Nom en Français : calycotome épineux, cytise épineux.

Nom en Anglais : sping broom, thorny broom.

Nom commun : Guendoul.

II.3. Etymologie

Dérivé de deux mots grecs, le nom générique attire l'attention sur calice qui se coupe, spinosa espèce épineuse [4].

II.4. Description botanique et répartition géographique

Arbrisseau de 1 à 2 mètres de longueur , dressée , à rameaux épineux , divariqués fortement stries , glabrescents, feuilles noircissant par la dessiccation , a fobioles subsessbles, obovales, obtuses, glabres en dessus, à poils appliqués en dessous, stipules très petites, fleurs solitaires ou fasciculées par 2-4, pédicelles 2-3 fois plus longs que large, carène aigue, gousse de 30-40 mm, sur 6-8, glabre , luisante et noir à le maturité , à Sture supérieure seul un peu sillée , abord droit, 3-8 graine, les fruits sont gousses à structure peu épaisse ,devenant noirâtres [5].

On la rencontre dans les forêts, les côteaux rocheux, les sols acides du littoral méditerranéen, en France, en Italie, en Espagne et en Algérie [5].

III. Traux de type chimique et biologique effectués sur le genre *Calycotome*

III.1. Introduction

Les plantes sont depuis toujours une source essentielle de médicament grâce à la richesse de ce qu'on appelle métabolite secondaire. Parmi les milliers de molécules produites par les métabolismes, l'homme sélectionne celle qui lui permet de se défendre contre les agressions d'autres organismes vivants et de corriger ses troubles métaboliques [7].

D'après les résultats de notre recherche bibliographique nous n'avons pas trouvé des travaux de type chimique et biologique effectués sur *Calycotome spinosa*, c'est la raison pour laquelle, nous avons orienté notre recherche bibliographique sur une espèce du même genre *Calycotome villosa*.

Des travaux de type chimique et biologique ont été réalisés sur *Calycotome villosa* qui est une espèce non épineuse et qui appartient à la famille des légumineuses.

III.2 Etude de type chimique

- Les composés majoritaires des huiles essentielles de *Calycotome villosa*

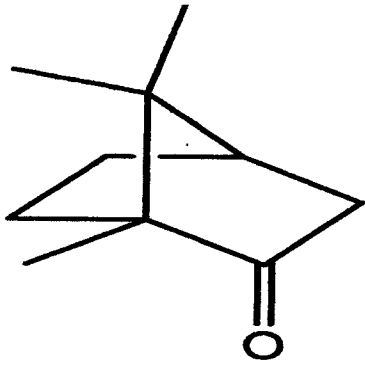
Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus important principes actifs des plantes, elles sont largement employées en parfumerie. Les huiles essentielles sont volatiles, leur densité est en général inférieure à celle de l'eau, elles sont solubles dans les solvants organiques usuels. Généralement, l'odeur d'une plante est liée à la composition chimique des huiles essentielles [10].

Les huiles essentielles ne doivent pas être utilisées par voie interne parce qu'elles déclanchent des irritations à différents niveaux.

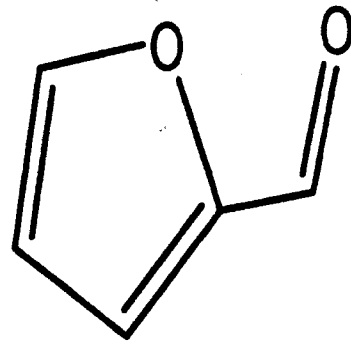
Les principaux composés chimiques de l'huile essentielle de *Calycotome villosa* sont donnés dans le tableau I

Tableau I : Les principaux composés de l'huile essentielle de *Calycotome villosa*.

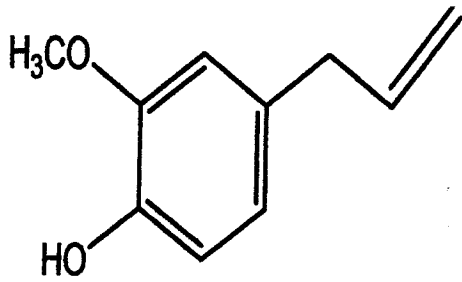
Composés majoritaires	Formules
camphre	1
eugéno	2
furfural	3
falcarenole	4
fenchone	5



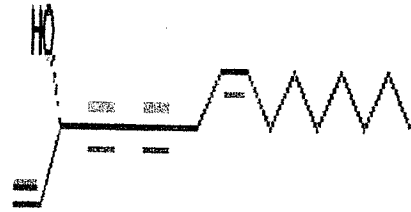
1



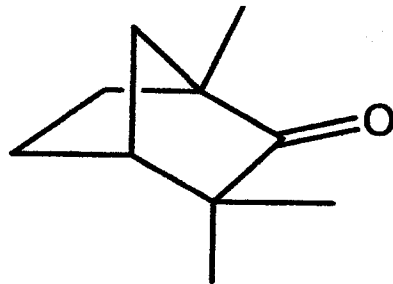
3



2

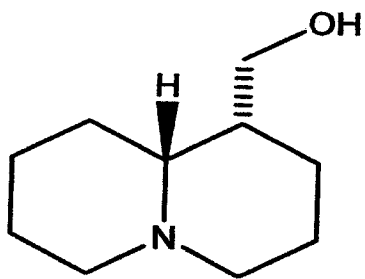


4

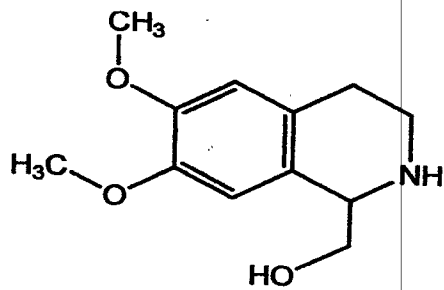


5

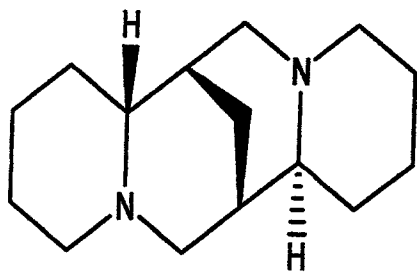
- Quelques alcaloïdes isolés de *Calycotome villosa* :



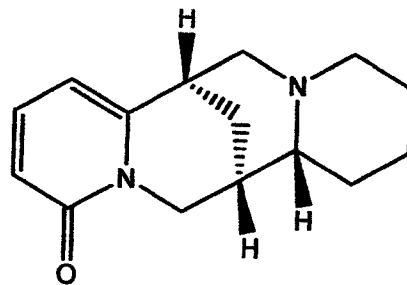
lupinine



Calycotomine

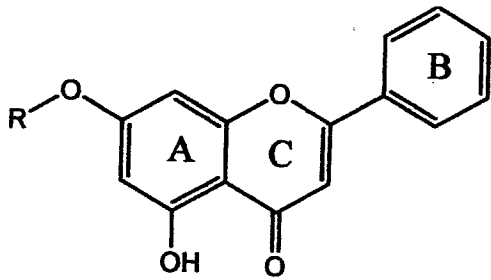


Sparteine



anagyrene

- Quelques flavonoïdes isolés de *Calycotome villosa* [9] :



R= Glucose

R= 6-o-acetyl-glucose

R=H (chrysin)

III.3. Etude de type biologique

Des tests d'activité antimicrobienne ont été réalisés sur les bactéries suivantes :

Bacillus lentus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii*. Ces tests ont montré une bonne activité antibactérienne pour l'extrait méthanolique de la partie aérienne de *Calycotome villosa* [8].

Références bibliographiques

- [1] **C. Évrard.**
Botanique systématique: une perspective phylogénétique Edition De Boeck. 2002; 488.
- [2] **J. Morot-Gaudry.**
Assimilation de l'azote chez les plantes: aspects physiologique, biochimique et moléculaire. 1998, 133.
- [3] **B. boullard.**
Dictionnaire des plantes médicinales du monde. Edition ESTM. 2001; 660.
- [4] **NT.WS.Beniston.**
Fleur d'Algérie. Edition entreprise nationale du livre, Alger, 1984.
- [5] **C. Flahault et H.L'abbé .**
Flore descriptive et illustrée de la France (tome1). Edition librairie des sciences et des arts, Paris. 1937.
- [6] **www.tela-botanica.org.**
- [7] **J.G.Fouché, A.Marquet, A.Hambukers.**
Les plantes médicinales, de la plante au médicament, observatoire du monde des plantes, Star - Tilman. 2000; 77.
- [8] **G.loy, F.cottigla, D.garau, D.Deiba, R.Pompei and L.Bbonsignore**
Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa*; 2001.
- [9] **A.El Antri, I.Messouri, R.Chendid Tlemçeni, M.bbouktaib, R.El Almi.B.El Bali and M.Lachkar.**
Flavonoïde glycoside from *Calycotome villosa*, 2004.
- [10] **R.P.Adamsand, T.A.Zanoni.**
J.Ess.Oil Res. 1990; 2; 163-165

CHAPITRE 2
ACTIVITE ANTIOXYDANTE

I. Généralités sur les antioxydants

Un antioxydant est toute substance qui lorsqu'elle est présente en faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manières significatives l'oxydation de ce substrat.

Ces antioxydants présentent un intérêt croissant car il semblerait que les formes réactives (les radicaux super oxydes, hydroxyles, alkoxydes et peroxydes, le peroxyde de l'oxygène, l'oxygène singulet) soient, en partie du moins à l'origine de nombreuses affections comme la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'artériosclérose, la polyarthrite chronique, le mongolisme ou encore le cancer [1]. Ils interviennent aussi dans le phénomène de vieillissement.

L'oxygène en plus de son action anti-infectieuse est utilisé par des enzymes telles que les monoamines-oxydases ou les monooxygénases pour métaboliser des composés endogènes et exogènes [2]. En outre la production par le corps humain de certains composés comme les prostaglandines passe par des intermédiaires radicalaires. Cependant lorsqu'il y a surproduction de ces espèces instables dans l'organisme, il se produit des dommages sur l'ADN, la peroxydation des lipides ou encore la fragmentation des protéines [1].

L'origine des radicaux est diversifiée ; ils sont générés lors de la pollution de notre environnement, par les rayonnements UV, les radiations ionisantes (IR), les métaux de transition (cuivre, zinc) et au cours des réactions enzymatiques [3].

II. Mécanisme d'action des antioxydants

Le mécanisme d'action des antioxydants se fait par la désactivation des radicaux libres, la complexation d'ions et de métaux de transition [4]. Ce sont les formes réactives de l'oxygène que les cellules macrophages utilisent pour lutter contre les agents infectieux [5].

Ainsi un apport en antioxydant pourrait permettre de pallier, la diminution des défenses naturelles et protéger les tissus contre une dégénérescence précoce.

III. Principales sources d'antioxydants

Certaines classes thérapeutiques tel que les AINS, les antihyperlipoprotéinémiques, les β -bloquants et antihypertenseurs sont connus pour leurs propriétés antioxydantes [5].

Le plus simple des capteurs des radicaux libres est l'alcool éthylique, agent de transfert d'hydrogène qui conduit à un composé biologiquement compatible, l'acétaldéhyde, bio oxydable par la chaîne enzymatique avec production d'énergie.

a) Les médicaments

– Le probucol® (lurselle) fait diminuer le taux sanguin de cholestérol.

– La N-acétylcysteine agit dans la régénération du glutathion en pénétrant les cellules. Les propriétés de la glutathione ont été reconnues lors d'études sur les phospholipides des feuilles de certains végétaux. En effet les thiols sont beaucoup plus actifs que les hydrocarbures, les alcools ou les phénols comme agents de capture radicalaire [6].

La capacité de protection de la glutathione est jugée supérieure à celle d'un antioxydant aussi puissant que l' α -tocophérol.

On observe in vitro que la glutathione introduit une période d'induction à la prise d'oxygène par l'hémoglobine et retarde l'oxydation de la fraction hydrocarbonée insaturée des lécithines (esters insaturés d'acide gras de phospholipides) et de l'aniline [7].

b) Les vitamines

– Acide ascorbique : Vitamine C

La Vitamine C contient une forme énediol qui produit la forme dicétonique par transferts successifs de ses deux atomes d'hydrogène.

La forme énediol est régénérée par l'intervention d'enzyme super oxyde dismutase en présence d'une catalase. On retrouve la vitamine C dans les légumes, les choux, le poivron, le persil, les agrumes et la kiwi. Elle joue un rôle important dans la régénération de la vitamine E [8].

- La vitamine E

Elle semble devoir fixer le radical hydroxyle avec formation d'une molécule d'ouverture de cycle. On la retrouve dans les huiles végétales (arachides, soja, chardon, tournesol, olive pressé à froid), les amandes, les graines, le lait, les oeufs, les légumes à feuilles vertes.

–Le β carotène (provitamine A)

Parmi les photo-protecteurs actifs, le β carotène apparaît comme un piègeur efficace. Sa constitution polyénique lui confère une capacité de piégeage de l'oxygène par formation d'un dioxétane (addition d'une oléfine et d'une molécule d'oxygène) ou par production d'hydroperoxydes (insertion d'oxygène dans toutes liaisons C-H conjuguées d'une double liaison)

susceptibles d'être réduits à leur tour. Il est présent dans les légumes verts, la salade, les carottes, l'abricot, le melon, les épinards, la papaye [8].

c) Les antioxydants naturels

Depuis quelques années de nombreux composés ayant des propriétés antioxydantes ont été isolés des plantes. Les antioxydants naturels sont présents dans toutes les parties des plantes supérieures et sont pour la plupart des composés phénoliques. Ils agissent par la désactivation des radicaux par réaction d'addition covalente, le captage de l'oxygène singulet, la complexation d'ions et métaux de transition et la réduction des radicaux.

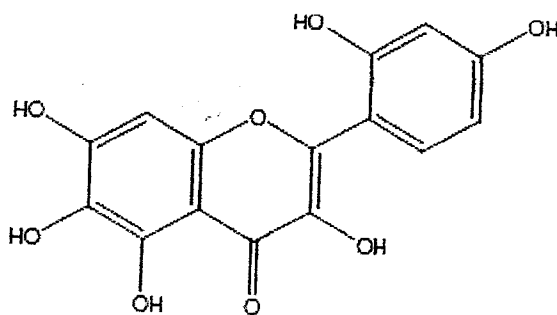
- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes agissent par deux mécanismes d'action :

- soit par chélation des métaux (quercétine, catéchine)
- soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxyles et peroxydes [9].

Ils jouent un rôle très important dans le traitement des inflammations, des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension, des thromboses, des allergies, des affections bactériennes.

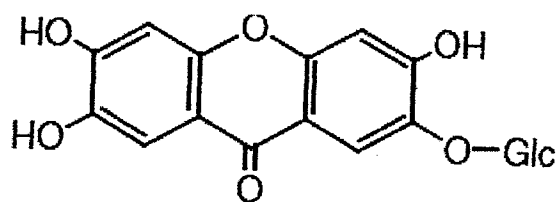
On les retrouve dans les fruits, les légumes, le thé et le vin [8].



Morine

- les xanthomes

Ils possèdent des propriétés inhibitrices envers la peroxydation des lipides en plus du fait qu'ils captent les radicaux libres contre les anions superoxydes [10].



Manguiférine

- les coumarines

Ils ont la capacité de capter les radicaux hydroxyles, superoxydes, et peroxydes. Ils préviennent également la peroxydation des lipides membranaires [10].

- les caroténoïdes

Les caroténoïdes réagissent avec l'oxygène singulet, les radicaux peroxydes et alkoxydes en capturant les radicaux libres [11].

- les dérivés d'acide phénolique

On les retrouve dans de nombreux fruits, légumes, le café, les prunes, les myrtilles, le raisin et les pommes. Les composés possédant des activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chorogénique [8].

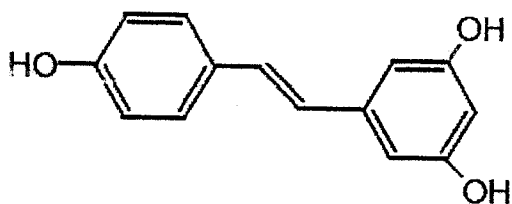
La plupart de ces composés sont issus de l'acide hydroxycinnamique, de l'acide coumarique, de l'acide caféique, de l'acide férulique et de l'acide chorogénique.

Il ne faut cependant pas ignorer leur propriété antitumorale car ils ont la capacité de bloquer la nitrosation des amines. Cette nitrosation se fait par réduction du nitrite en oxyde nitrique ou encore par formation des dérivés C-nitroso.

Le verbascoside qui possède une partie catéchole, inhibe l'autooxydation de l'acide linoléique et la peroxydation lipidique microsomale.

Il inhibe aussi la peroxydation lipidique dépendante du fer dans les mitochondries et possède une forte capacité de capter le radical libre DPPH.

Comme exemple de dérivés phénoliques possédant une activité antioxydante, le resvératrol est le plus cité. Ce stilbène qu'on retrouve dans le raisin, inhibe le développement des lésions pré-néoplasiques de la souris et est connu comme agent chimiopréventif potentiel chez l'être humain [12].



Resvératrol

- les tanins

Les tanins inhibent la peroxydation lipidique des mitochondries du foie et des microsomes mais aussi l'oxydation de l'acide ascorbique et du linoléate.

Lors de la peroxydation les tannins donnent des protons face aux radicaux libres, et ainsi des radicaux tanniques stables sont formés. Ce qui permet de stopper la réaction en chaîne de l'auto-oxydation lipidique.

Les effets bénéfiques du thé vert ne sont plus à prouver. Le thé par ces polyphénols en particulier le gallate d'épigallocatechine, possède des propriétés antioxydantes et capte les radicaux libres. Les polyphénols du thé vert ont en plus des propriétés antimutagènes ; des propriétés anticancéreuses qui ont été démontrées [12].

Références bibliographiques

- [1] **I.Chenalley.**
Contribution à l'étude phytochimique des Saxifragacées, isolement d'antioxydants à partir de *saxifrage stellaris*, 1, 2000; 175.
- [2] **A.Cavin.**
Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires: *Tinospora crispa*, *Merremia emorgina* et *orphea annendia*, 1999; 243.
- [3] **D.Batiday.**
Etude de deux plantes antioxydantes : *Lannea velutina* A., *Sporospermum guineense* Hochi, 2001; 5; 73.
- [4] **B. Timbo .**
Etude phytochimique et des activités biologiques de *Trichilia emetica* Vahl (Meliacée), Bamako Mali, 2002; 108.
- [5] **A. Salamatou .**
Etude phytochimique et des activités biologiques de *Balanites aegyptiaca* L. (Balanitacée), Thèse de Doctorat en Pharmacie, Bamako Mali, 2003; 117.
- [6] **P. Le Perchec.**
Les molécules de beauté, de l'hygiène et de la protection, Paris, 1994, 142.
- [7] **J.J. Mieyal.**
Mecanisme of enzyme like reactions involving human hemoglobin, New York; 1978; 315-348.
- [8] **I.P.L. Bossokpi.**
Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae), Bamako, 2002; 133.
- [9] **D.L.Madhavi, S. Deshpandle and D.K.Salunkle.**
Food antioxidant techenological, Toxicological and health, New York, 1996; 101.
- [10] **C.M.Anderson,A.Hallberg and T.Hogberbg.**
Advances in development of pharmaceutical antioxidant,1996; 28.
- [11] **N.I.Krinsky.**

Références bibliographiques

Antioxydant function of carotenoides, **1989**; 7.

[12] C. Ekoumou.

Etude phytochimique et pharmacologique de recettes traditionnelles utilisées dans le traitement des infections urinaires et de la cystite, **2003**; 7.

CHAPITRE 3
DIABETE ET PHYTOTHERAPIE

I. Introduction

Le diabète sucré est la maladie ou plutôt le syndrome endocrinien le plus répandu. On estime les diabétiques à plus de 100 millions dans le monde et ce chiffre, ainsi que le pourcentage de la population touchée, sont en progression constante (aux alentours de 6% dans les pays riches). Le diabète est une maladie ancienne dont les symptômes classiques : faim et soif importante avec augmentation du volume d'urine, maigreur ou au contraire obésité, risque de coma, sont bien connus par la majorité des guérisseurs ou tradipraticiens ; de nombreuses plantes sont considérées traditionnellement comme antidiabétiques certaines sont à l'origine de la mise au point de médicaments ex : le biguanide metformine grâce au *Gallega officinalis*.

Devant l'augmentation considérable du nombre de diabétiques dans les pays dont le niveau de vie s'améliore (ex Inde, Chine, sud-est asiatique, pourtour méditerranéen), de nombreux chercheurs ont évalué l'action pharmacologique de certaines plantes traditionnelles et donc leur intérêt en médecine quotidienne dans ces pays où les médicaments synthétiques sont malgré tout assez chers et où la tradition de médecine par les plantes est bien ancrée dans les mœurs (ex : au Maroc, une enquête dans un groupe de diabétiques (type 2) révèle que 25% n'utilisent que des plantes pour se soigner). Dans les pays riches où le traitement du diabète est d'un accès facile, il est apparu intéressant d'utiliser la phytothérapie, seule ou en complément, pour diminuer la dose de médicaments synthétiques, mais aussi parce que certains phytomédicaments semblent en même temps capables de lutter contre les complications du diabète (sclérose des vaisseaux sanguins, dépôt athéromateux, artérites et artériolites, hypertension, infections) [1].

II. Principaux traitements

L'insuline est une hormone naturelle de régulation du métabolisme du glucose, sécrétée par le pancréas ; elle diminue la teneur en glucose du sang (glycémie) en agissant à plusieurs niveaux :

- par augmentation de la « capture » du glucose sanguin au niveau du foie et des muscles et de sa transformation en une substance de réserve, le glycogène,
- par diminution de l'opération inverse (dégradation du glycogène),
- par augmentation de la transformation du glucose en graisse (stockée), et par augmentation de la synthèse des protéines à partir du glucose.

Les autres médicaments antidiabétiques artificiels sont :

- les sulfamides hypoglycémisants qui augmentent de façon temporaire la sécrétion naturelle d'insuline,
- les biguanides (inactifs chez le sujet non diabétique) qui augmentent l'utilisation du glucose par l'organisme, améliorent l'efficacité de l'insuline, diminuent la dégradation du glycogène et aussi diminuent l'absorption intestinale du glucose [1].

III. Types de diabète

Il faut différencier les deux types classiques de diabète :

- le diabète insulino - dépendant (type 1, ou diabète maigre ou diabète du jeune) qui représente 20 à 25% des diabétiques, se révélant généralement assez tôt et qui relève principalement d'un traitement par l'insuline avec surveillance stricte de l'alimentation (de l'apport de glucide),
- les diabètes non insulino - dépendants (type2, diabète gras ou de la personne âgée) qui se révèlent plus tardivement et sont équilibrés le plus souvent par un régime (amaigrissant) hypocalorique - hypoglucidique avec ou sans traitement médicamenteux associé (principalement des sulfamides hypoglycémisants, des biguanides, l'insuline)[1].

C'est ce dernier type de diabète qui semble en progression constante et qui peut être soigné par la phytothérapie

IV. Complication

Le diabète est responsable de rétinopathies et représente la première cause de cécité avant 50 ans. Il peut engendrer de atteintes des artères (artériopathie) et des nerfs (neuropathie) des membre inférieurs, cause d'une mauvaise irrigation et de problème de podologie. Ceux-ci peuvent être corrigé par le port de semelles thermomoulées. Certaines nécroses conduisent à des amputations d'orteil, de pied et de jambe [2,3].

V. Plantes antidiabétiques

Ardemment, plus de 1123 plantes sont utilisées traditionnellement pour traiter le diabète sucré [4]. Cependant, juste une minorité de ces plantes connaissent une évolution scientifique, citons essentiellement, *Momordica charantia*, *Catharanthus roseus*, *Trigonella foenum-greacum*, *Allium cepa*, *Allium sativum*, et autres [5]. Ce qui est remarquable, c'est l'existence de plusieurs composés d'origine végétale, semblent donner cet effet bénéfique. Leur nature différente les fait agir à différents sites.

D'autres espèces végétales réputées antidiabétiques semblent agir à des niveaux différents. Leurs principes actifs sont de nature organique: polysaccharides, acides amines [5], flavonoïdes, saponosides, acides gras, alcaloïdes [4,6] ou de nature minérale, tel que chez *Atriplex halimus* où le chrome organique (Glucose Tolerance Factor: GTF) régule la glycémie en potentialisant l'effet de l'insuline [7,8].

A coté du chrome, le vanadium, un insulino mimétique connu avant la découverte de l'insuline, a été utilisé pour le contrôle de la glycémie [6]. Des études ont montré que cet élément améliore la tolérance au glucose par son mécanisme au niveau post-récepteur [9]. D'autres minéraux tels que le magnésium [6], le cuivre, le sélénium et le fer ont également des effets bénéfiques [9,10].

Références bibliographiques

- [1] Plante médicinales et diabète www.phytomania.com. Phytothérapie, plantes médicinales, aromathérapie, huile essentielle, 2007.
- [2] **A.Paola, C.Jean-pierre et R.Christiane.**
Le diabète insulino-dépendant de l'enfant. Enseignement thérapeutique pour l'aide à l'éducation des enfants diabétiques. Service de pédiatrie – Centre - hospitalier Général de Hyères, 2001 .
- [3] diabète : glucose dans le sang _ hyperglycémie. Santé et corps humains. Soft Collection Micro Application. Encarta Encyclopedia Microsoft 2003.
- [4] **R.J.Marles , N.R.Farnsworth .**
Plants as sources of antidiabetic agents. *Econ Med Plant Res.* 1994; 6: p 149-187.
- [5] **A. Al-Achi.**
Herbs that affect blood glucose levels. *Women's Health in Primary Care.* 2005; 8(7), 325-330.
- [6] **M.D.Dey lucey and S.Anoja .**
Alternative therapies for type 2 diabetes. *Alternative medicine Review.* 2002; 7(1), 45-58.
- [7] **Z.Aharonson Z, J.Shani (Mishkinsky) and F.G Sulman .**
Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - a Feeding source of the sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetologia.* 1969; 5, 379-383.
- [8] **G.W.Evans and T.D Bowman.**
Chromium Picolinate Increases Membrane Fluidity and rate of Insulin Internalization. *J of Inorganic Biochemistry.* 1992; 46, 243-250.
- [9] **K.H.Thompson and D.V .Godin .**
Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. *Nutrition Research.* 1995; 15(9), 1377-1410.
- [10] **V. Ducros and A.Favier .**
Métabolisme du sélénium. *EMC-Endocrinologie.* 2004; 1(1), 19-28.

CHAPITRE 4
ACTIVITE ANTIMICROBIENNE ET
METABOLITES SECONDAIRES

I. Généralités sur les bactéries

A l'état normal, l'homme héberge sur sa peau, dans ses muqueuses (voies aériennes) et dans son tube digestif un grand nombre de bactéries saprophytes qui ne provoquent pas d'infections. Ils sont pathogènes lorsque leurs conditions de vie deviennent favorables:

- Emploi abusif d'antibiotiques à spectre large,
- Sujet dont le système immunitaire est affaibli,
- Infection nosocomiale.

Les bactéries sont des microorganismes. Elle est un parasite si elle vit aux dépend d'un autre organisme, saprophyte dans le cas contraire. L'appellation pathogène caractérise l'aptitude d'un agent infectieux à induire une maladie infectieuse [2].

II. Principaux métabolites secondaires antibactériens

En général les antimicrobiens sont des substances capables de tuer les microorganismes ou d'en bloquer la croissance.

■ Les tanins

Toutes les plantes contiennent des tanins à un degré plus ou moins élevé. Ceux-ci donnent un goût amer à l'écorce ou aux feuilles et les rendent impropres à la consommation *pour les insectes* [1].

Les tanins sont considérés responsables de l'activité antibiotique des extraits méthanoliques de l'écorce de *Terminalia alata* trouvé au Népal [3].

■ Les flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à colorer les fleurs et les fruits en jaune ou en blanc. Ils ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales [1].

Des flavonoïdes plus lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes. La catéchine se trouve dans le thé vert d'Oolong et exerce une activité antibactérienne [4].

■ Les coumarines

Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Des coumarines ayant des propriétés antimicrobiennes, ont été employées pour empêcher la récurrence des blessures froides provoquées par HSV-1 chez l'homme [5].

■ Les alcaloïdes

Formant un groupe très large, les alcaloïdes possèdent presque tous une molécule d'azote (-N—) qui les rend pharmaceutiquement très actifs. Certains sont des médicaments connus qui ont des vertus thérapeutiques avérées.

Le premier exemple médicament utilisé, d'un alcaloïde était la morphine isolé en 1805 de l'oeillette *Papaver somniferum* [6]. Des alcaloïdes de diterpénoïde, généralement isolé de *Ramunclus bulbosus* s'avèrent avoir généralement des propriétés antibactériennes [7].

■ Les terpénoïdes et les huiles essentielles

L'huile essentielle est définie comme l'extrait naturel de plantes ou d'arbres aromatiques. Aujourd'hui les huiles essentielles sont aussi produites synthétiquement et on les trouve sur le marché sous les deux formes. Les substances aromatiques naturelles, appelées essences, sont produites dans des glandes spécialisées de différentes parties des plantes (fleur, feuille, tige, écorce, racine, fruit, graine). L'huile essentielle ne se compose que de substances aromatiques volatiles, elle est soluble dans l'huile et dans l'alcool mais pas dans l'eau. Il existe plusieurs techniques pour obtenir des huiles essentielles. La principale et la plus ancienne est la distillation à la vapeur d'eau.

Les terpénoïdes sont actif contre les bactéries. Les terpénoïdes du trèfle pourpre de prairie (la fraction soluble dans l'éthanol) ont montré une forte activité contre *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* et une faible activité contre les bactéries Gram(-) et les albicans candida[8].

Références bibliographiques

- [1] **P.Iserin.**
Encyclopédie des plantes médicinales : identification, préparation, soins 2001
- [2] **T.Marc,W.Genad et L.Denis.**
Classification des anti-inflamatoires dans le Guide pharmacologique, 2001; P 426.
- [3] **R.S.Taylor,F.Edel,N.P.Manandhar and G.H.N.Towers.**
Antimicrobial activities of southern nepalese medicinal plant, J.Ethnopharmacol.1996; 50; p 97-102.
- [4] **M.Toda,S.Okubo,R.Ohnishi and T.Shimamura.**
Antibacterial and bactericidal activities of Japanese green tea, J.Bacteriol.1989; 5; P 561-566.
- [5] **B. Berkada.**
Preliminary report on warfarin for the treatment of herpes simplex, J.Irish Coll.Phys.Surg.1978; 22, p 56-59.
- [6] **R.J.Fessenden and J.S ..Fessenden.**
Organic chemistry ,2nd ed.willard Grant Press.Boston Mass.1982.
- [7] **Atta-ur-Rahman and M.I.Choudhary.**
Diterpenoid and steroidal alkaloids. Nat.Prod.Rep.1995; 12; p 361-379.
- [8] **C.D.Huffod,Y.Jia,E.M.Croom,I.Jr;Muhammed,A.L.Okunadr,A.M.Clark and R.D.Rogers.** Antimicrobial compound from *Petalostemum purpureum*. J.Nat.Prod, 1993; 56; p 1878-1889.

CHAPITRE 5
PARTIE EXPERIMENTALE

I. Introduction

La connaissance des activités biologiques et des constituants chimiques est très importante dans l'étude d'une plante.

II Matériel végétal

II.1. Origine géographique et période de récolte

La plante étudiée dans ce travail a été récoltée dans la région de Mansourah (wilya de Tlemcen) en Mars et Avril 2009.

II.2. Identification botanique

L'espèce a été identifiée par le Professeur N. Bennabadi du Laboratoire de Botanique, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Tlemcen.

II.3. Préparation des échantillons

Les différentes parties de la plante (racines, fleurs, feuilles et tiges) ont été triées puis elles sont séchées et broyées finement. Les quatre échantillons sont conservés dans des flacons en verre à l'abri de la lumière

III. Matériel et méthodes

Les absorbances ont été mesurées sur spectrophotomètre UV - Visible Thermo Spectronic Heliosy (type Helios Gamma). Les échantillons sont placés dans une cuve de trajet optique de 1 cm.

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F₂₅₄.

Le gel de silice utilisé pour chromatographie sur colonne présente une granulométrie de 0,063-0,2 mm (70-230 mesh) Merck-gel de silice 60.

IV. Tests phytochimiques

Les tests phytochimiques consistent à déterminer les différentes familles de composés existantes dans la partie étudiée de la plante par les réactions qualitatives de caractérisation. Ces réactions sont basées sur des phénomènes de précipitation ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composés. Toutes les parties de la plante (*Calycotome spinosa L*) sont soumis aux tests suivant :

Saponosides

Faire un décocté à 1 %, filtrer et ajuster à 100ml après refroidissement. Dans une série de 10 tubes à essai numérotés de 1 à 10, répartir successivement 1, 210 ml de décocté.

Ajuster le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée .

Agiter chaque tube dans le sens de la longueur pendant 15 secondes à raison de deux agitations par seconde. Laisser reposer 15 mn et mesurer la hauteur de la mousse de chacun des tubes. Le tube dont la hauteur est de 1cm indique la valeur de l'indice de mousse.

Coumarines

Evaporer 5ml d'extrait éthérique par macération pendant 24 heures dans une capsule et à l'air libre. Ajouter au résidu 2 ml d'eau chaude. Partager la solution entre 2 tubes à essai et ajouter au contenu de l'un des tubes 0,5 ml de NH_4OH à 25 %, mélanger et observer la fluorescence sous UV 366 nm. Une fluorescence intense dans le tube où il a été ajouté du NH_4OH indique la présence de coumarines.

Mucilages

Introduire 1ml de décocté à 10 % dans un tube à essai, ajouter 5 ml d'alcool absolu. L'obtention d'un précipité floconneux par mélange indique la présence de mucilages.

Composés réducteurs

Introduire 5ml de décocté aqueux à 10 % dans une capsule et évaporer à sec au Bain Marie. Ajouter au résidu 1ml de réactif de Fehling (0,5 ml de réactif A + 0,5 ml de réactif B). L'obtention d'un précipité rouge - brique indique la présence de composés réducteurs.

Stérols et triterpènes

Faire sur une macération de 24h à 5% dans l'éther. L'extrait éthérique est ensuite évaporé à sec et repris avec de l'anhydride acétique puis du chloroforme. Déposer au fond du tube contenant l'extrait de l'acide sulfurique. En cas de réaction positive il se forme un anneau rouge - brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides, la couche surnageante étant verte ou violette.

Tanins

Introduire 5ml d'infusé dans un tube à essai. Ajouter 1ml de FeCl_3 à 1 %. En présence de tanins, il se développe une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre. La présence de tanins catéchiques est caractérisée par addition à 5ml d'infusé d'un ml d'acide chlorhydrique concentré. Porter à l'ébullition pendant 10minutes, il apparaît un précipité rouge soluble dans l'alcool isoamylique. La différenciation des tanins catéchiques et galliques est obtenue par la réaction de Stiasny. A 30ml d'infusé à 5 %, ajouter 15 ml de réactif de Stiasny (10 ml de formol à 40 % + 5 ml d'acide chlorhydrique concentré), puis chauffer au Bain Marie pendant 15 à 30 minutes. L'obtention de précipité montre la présence de tanins catéchiques. Filtrer et saturer 10ml de filtrat avec l'acétate de sodium pulvérisé. Ajouter 1ml d'une solution de FeCl_3 à 1 %.

Le développement d'une teinte - noire indique la présence de tanins galliques non précipités par le réactif de Stiasny. Les tanins peuvent être également précipités par addition de gélatine à 1% à l'infusé.

Flavonoïdes

Traiter 3 ml d'extrait éthérique avec 1 ml de HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence des flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en l'espace de quelques minutes.

Alcaloïdes

A 20 g de poudre est additionné de l'acide sulfurique dilué au 1/20. L'ensemble est laissé en macération pendant 24 heures puis filtré.

Dans un tube à essai, introduire 1 ml de filtrat et ajouter 5 gouttes de réactif de Mayer dans le premier tube et 5 gouttes de réactif de Dragendorff dans le second tube. S'il y a apparition d'un précipité, la présence d'alcaloïdes est confirmée par leur extraction.

V. Réactif de caractérisation

Réactif de Mayer

Dissoudre 1.358 g de HgCl_2 dans 60ml d'eau. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solution puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau. Les alcaloïdes donnent avec ce réactif un trouble puis un précipité blanc.

Réactif de Wagner

Dissoudre 2g de KI et 1.27 g de I_2 dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100ml 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 0.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 50 ml d'eau distillée ;

Fehling B : dissoudre 6.5 g de NaOH et 17.3 g de tartrate de sodium dans 35 ml d'eau distillée puis compléter le volume à 50 ml.

VI. Extraction des racines de *Calycotome spinosa L*

Dans un ballon monocol, surmonté d'un appareil soxhlet et d'un réfrigérant, mettre 15,75 g de matière végétale (contenue dans une cartouche en papier) dans le soxhlet et 200 ml de l'eau dans le ballon .porter l'ensemble à reflux jusqu 'à épuisement total. l'extrait obtenu est filtré.

On a fait une série d' extractions liquide - liquide sur la phase aqueuse ,en utilisant plusieurs solvants à polarité croissante (heptane et chloroforme). Ceci est fait dans une ampoule à décanter. Afin d'épuiser la phase aqueuse, l'extraction liquide – liquide est refaite trois fois pour chaque solvant. Après l'extraction, l'eau est éliminée. On a récupéré un extrait solide. Ce dernier est épuisé par le méthanol. On a récupéré une fraction solide après filtration et évaporation de méthanol. A la fin, il restait un solide non soluble dans le méthanol. On considère :

Extrait 1 : extrait à l'heptane

Extrait 2 : extrait au chloroforme

Extrait 3 : extrait au méthanol

Extrait 4 : extrait soluble insoluble dans le méthanol

Tableau 2 : les masses des extraits de racines

Les extraits	Extrait 1	Extrait 2	Extrait 3	Extrait 4
m (g)	0,04	0,09	1,14	0.37

VII. Fractionnement de l'extrait méthanolique des racines de *Calycotome spinosa* L.

Un fractionnement de 1,14g de l'extrait 3 (extrait au méthanol des racines) a été réalisé sur une colonne en utilisant la silice. L'analyse sur C.C.M de ces fractions après révélation à la lumière UV (254 nm), nous a permis d'obtenir 10 fractions.

L'éluant utilisé pour cette chromatographie sur colonne est un mélange de chloroforme et de méthanol. On a commencé par le chloroforme puis on a augmenté la polarité de l'éluant par le méthanol.

Les fractions ont été regroupées en fonction de leurs Rf (le facteur de rétention).

Tableau 3 : fractionnement de l'extrait 3

fractions	F-1	F-2	F-3	F-4	F-5	F-6	F-7	F-8	F-9	F-10
m (g)	0,04	0,05	0,07	0,011	0,08	0,08	0,06	0,04	0,09	0,1

VIII. Extractions des différentes parties de la plante

Des extractions par soxhlet dans différents solvants sont faites pour les différentes parties de la plante : les racines les tiges, les feuilles et les fleurs.

Les solvants utilisés ont été choisis par croissance de polarité (l'hexane, méthanol et l'eau). Les masses exactes de chaque partie de la plante prises pour les extractions sont données dans le tableau suivant :

Tableau 4 : Masse de matière végétale

L'organe	Les racines	Les tiges	Les feuilles	Les fleurs
m (g)	8.0	8,5	6.0	5.0

IX. Extraction de l'huile essentielle des fleurs

L'hydrodistillation est une méthode simple et assez efficace. La plante dans ce cas, est en contact avec l'eau qui est directement chauffée. Les vapeurs refroidies décantent avec l'huile essentielle, qui va surnager sur la phase aqueuse, qui doit être séparée de la phase aqueuse. Toutefois, ce chauffage à 100°C en milieu aqueux, peut provoquer des modifications chimiques ce qui aboutit à la formation de nouvelles substances.

Le montage utilisé est constitué d'un ballon contenant 20 g de la matière végétale sèche et 200 ml d'eau, posé au-dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une colonne à distillation. Cette dernière est reliée à un réfrigérant qui condense les vapeurs que l'on recueille. On a fait une extraction liquide - liquide en utilisant le pentane. Après récupération de la phase organique on a évaporé cette phase puis on a récupéré les huiles essentielles. L'échantillon d'huile essentielle est conservé à -18° C. L'huile essentielle obtenue est limpide et visqueuse.

X. Activité biologique

X.1. Activité antimicrobienne

Cette activité a été testée sur les différents extraits, ainsi que sur l'huile essentielle des fleurs.

X.1.1- Provenance des germes :

Les souches pathogènes utilisées sont indiquées dans le tableau 5. Elles sont celles qui causent les maladies courantes (infections urinaires, broncho-pulmonaires, cutanées, digestives...) causées par les bactéries.

Souches utilisées	Origine
Bactéries à GRAM (-) : <ul style="list-style-type: none">• <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa)• <i>Escherichia coli</i> (Ec)	Souches pures fournies par l'institut Pasteur de Paris (IPP).
Bactéries à GRAM (+) : <ul style="list-style-type: none">• <i>Staphylococcus aureus</i> (St)	

Tableau 5: Provenance des germes étudiés

X.1.2- Choix des antibiotiques :

- La disponibilité des souches a été testée vis-à-vis un antibiotique, ceci en fonction de ceux utilisés au laboratoire de microbiologie à l'hôpital de Tlemcen, et aussi en fonction de leur disponibilité (tableau 6).

Groupe microbien	ATB	Sigle
Bactéries	Gentamicine	GT
	Amoxilline	Amx

Tableau 6 : L'antibiotique (ATB) utilisé.

X.1.3- Méthode utilisée :

- La méthode utilisée est celle de la diffusion des ATB sur gélose ou méthode des disques. Cette méthode se base sur la diffusion de l'extrait testé dans la gélose. Elle consiste à déposer à la surface d'un milieu gélosé préalablement ensemencé par la suspension de germes choisis, des disques de papier filtres imprégnés des extraits à tester [1] :
- Préparation de l'inoculum : On a préparé une culture de 24 heures à 37°C, de bactéries à tester sur gélose nutritive, après 24 heures d'incubation, On a pris 4 à 5 colonies et on les a mis dans 5 ml de bouillon nutritif ;
- On a mesuré la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à $\lambda = 625 \text{ nm}$, La valeur affichée doit être comprise dans l'intervalle [0.08 – 0.1], ce qui correspondra à une concentration en bactéries de 10^8 U.F.C / mL ;
- On a fait une dilution de 1/100 dans l'eau physiologique à 0.9%. Ce qui donnera une concentration en bactéries finale de 10^6 U.F.C / mL ;
- Ensemencement de la gélose Mueller-Hinton (MH) par inondation, l'excès du liquide est aspiré et la surface de la gélose est laissée sécher 15 à 20 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$;
- Préparation des disques : les disques sont préparés à partir du papier filtre (6 mm de diamètre). Ces derniers sont imprégnés des extraits à raison de $10 \mu\text{l}$ pour les différents extraits, ensuite séchés;

- A l'aide d'un distributeur de disques, on place sur la surface de la gélose Mueller – Hinton (MH) préalablement ensemencée, les différents disques d'ATB choisis. Les boîtes ont été laissées durant 20 minutes à la température ambiante pour permettre une bonne diffusion de l'ATB. Elles ont été ensuite incubées à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 18 à 24 heures. La lecture a été faite par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque.

Remarques :

Les extraits sont solubilisés dans le DMSO.

Inactif : diamètre $d \leq 6$ mm ;

Activité moyenne : $6 < d \leq 12$ mm ;

Activité modérée : $12 < d \leq 20$ mm ;

Bonne activité : $d > 20$ mm.

X.2- Activité antioxydante :

Les antioxydants radicalaires permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique :

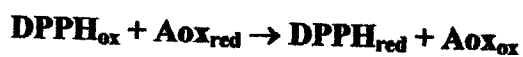
$\text{AH} + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{A}^\bullet + \text{RH}$. La molécule AH est antioxydante si le radical formé A^\bullet est plus stable.

La stabilité du radical A^\bullet peut s'expliquer par sa conservation en composés non radicalaires :

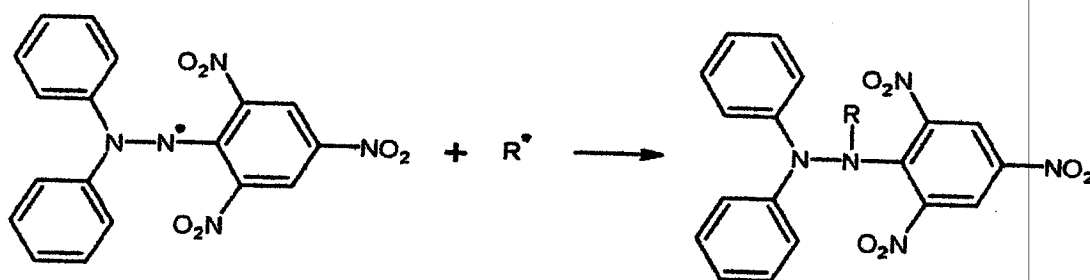
$\text{A}^\bullet + \text{A}^\bullet \rightarrow \text{A-A}'$ ou $\text{A}^\bullet + \text{R}^\bullet \rightarrow \text{A-R}$

Pour détecter l'activité antiradicalaire dans notre laboratoire, nous utilisons le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), un radical stable, violet en solution et présentant un maximum d'absorption caractéristique à 517 nm. Le protocole appliqué en routine repose sur la disparition de ce maximum lorsque le DPPH est réduit par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (méthode *in vitro*).

La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer les radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne : oxydation) se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH.



Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) de couleur violette, vire au jaune, en présence de capteurs de radicaux libres, et se réduit en 2,2-diphényl-1-picryl-hydrazine.



La disparition de la couleur violette aura lieu à 517 nm [2-9].

Manipulation : Nous avons préparé une solution de DPPH dans le DMSO (5.5 mg / 25 ml). 1 ml (0.22 mg de DPPH) de cette solution est ajouté à 2 mg d'extrait préalablement solubilisé dans le DMSO, le mélange est complété à 5 ml par le DMSO. Le mélange est fortement agité. Ensuite, ce dernier est laissé incubé pendant 30 mn dans l'obscurité à température ambiante. Après incubation, l'absorbance est mesurée à 517 nm (plusieurs mesures d'absorbance ont été faites afin d'avoir une valeur moyenne). Par ailleurs, un essai à blanc a été effectué, c'est-à-dire 1 ml de la solution de DPPH (5.5 mg/25 ml) est dilué 5 fois pour obtenir 5 ml, ensuite nous avons mesuré l'absorbance à 517 nm : c'est une solution de contrôle de DPPH. Le pourcentage du DPPH réduit est donné par la relation :

$$\% \text{ DPPH}_{\text{réduit}} = [(AC - AE)/AC] \times 100$$

AC : absorbance de contrôle ; AE : absorbance de l'extrait.

L'acide ascorbique et l'acide tannique sont utilisés comme composés de référence.

Remarques :

Pouvoir antioxydant faible : % DPPH réduit < 50% ;

Pouvoir antioxydant modéré : $50 \leq \% \text{ DPPH}_{\text{réduit}} \leq 70\%$;

Pouvoir antioxydant fort : % DPPH réduit $\geq 70\%$.

Références bibliographiques

- [1] **Tentaoui – Elaraki, A. A. Errifi, B. Bendjillali and N. Lallaoui.**
Antimicrobial activity of four chemically different essential oils. *Rivista Italiana EPPOS*. 1992; **6**; 20 - 24.
- [2] **Suaib Luqman et al.**
Antioxidant potential of the root of *Vetiveria zizanioides* L. Nash, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, February 2009, Vol. **46**; 122-125.
- [3] **N. E. Es Safi et al.**
Antioxidative effect of compounds isolated from *Globularia alypum* L. Structure – activity relationship. *LWT-Food Science and Technology*. 2007; **40** (7); 1246-1252.
- [4] **Funda Nuray Yalcine et al.**
Antimicrobial and free radical scavenging activities of some *Lamium* species from Turkey, Nacette pe University, *Journal of the Faculty of pharmacie*, January 2007, Vol. **27**, N° 1; 11-22.
- [5] **Hashem F.A. et al.**
Free Radical scavenging activity of the flavonoids isolated from *Tecama Radicans*, *Journal of Basic and Applied*, 2007, Vol. **3**, N°1.
- [6] **U. Sebnem Harput et al.**
Secondary metabolite from *Phlomis syriaca* and their antioxidant activities, *Turk J. Chem.*, 2006, **30**; 383-390.
- [7] **Patricia Middleton et al.**
Antioxydant activities and general toxicity of *Alnus glutinosa*, *Fraxinus excelsior* and *Papaver rhoeas*, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2005, **2**; 81-86.
- [8] **Masafumi Okawa et al.**
DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants, *Biol. Pharm. Bull.*, 2001, **24**, 10 ; 1202-1205.

Références bibliographiques

[9] **Y. Rolland.**

Antioxydants naturels végétaux, Burgundy Botanical Extracts, research@burgundy-extracts.com, p: 530 - 535

III. Résultats des extractions faites sur les différentes parties de la plante.

Tableau 11: Aspect physique et rendement des extraits

extraits	Aspects physiques	masses	Rdt (%)
CS1F	Une pâte verte	0,07	1,1
CS2F	Un solide vert	0,75	12,6
CS3F	Un solide	0,42	7
CS1FL	Une pâte verte	0,03	0,6
CS2FL	Un solide jaune	0,42	8,4
CS3FL	Un solide marron	0,11	2,2
CS1T _A	Une pâte verte	0,20	2,3
CS1T _B	Un solide	0,6	7
CS2T	Un solide	0,32	3,7
CS3T	Un solide marron	0,38	4,4
CS1R _A	Une pâte	0,2	2,5
CS1R _B	Un solide	0,04	0,5
CS2R _A	Un solide marron	0,52	6,5
CS2R _B	Un solide	0,03	0,3
CS3R	Un solide marron	0,69	8,6
HEZ	Limpide et visqueuse	0,1	0,5

CS : *Calycotome spinosa* ; 1 : hexane ; 2 : Méthanol ; 3 : eau ; F : feuilles ; FL : fleurs ; T : tige ; R : racines ; A : partie soluble dans le solvant ; B : partie non soluble dans le solvant ; HEZ : l'huile essentielle.

IV. Pouvoir antibactérien et antioxydant des extraits et de l'huile essentielle de *Calycotome spinosa* L.

IV.1 effet antibactérien

Les résultats de la sensibilité des bactéries vis-à-vis les antibiotiques, les extraits et l'huile essentielle sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 12 : AntibioGramme : diamètre (mm) des zones d'inhibition des différentes souches dans le cas de *Calycotome spinosa L.*

Extraits – concentration (g/ml)	Pa.	Ec.	Sa.
CS1F (0,02)	22	7	6
CS2F (0,02)	6	6	6
CS3F (0,02)	6	6	6
CS1FL (0,01)	9	6	6
CS2FL (0,02)	6	6	6
CS3FL (0,02)	6	6	6
CS1T _A (0,02)	16	6	6
CS1T _B (0,02)	6	6	6
CS2T (0,01)	6	6	6
CS3T (0,005)	6	6	6
CS1R _A (0,02)	6	9	6
CS1R _B (0,01)	6	6	6
CS2R _A (0,02)	15	11	6
CS2R _B (0,007)	6	6	6
CS3R (0,01)	15	12	6
HEZ (0,009)	16	9	6
Gentamicine (100 µg/disque)	n.d	38	37
Amoxylline (25 µg/disque)	n. d	0	29

n.d : non déterminé.

Nous constatons que les meilleurs résultats sont obtenus dans le cas des extraits CS1F, CS1T_A, CS2R_A, CS3R et HEZ vis-à-vis *Pseudomonas. E. coli* est inhibée par les extraits CS2R_A et CS3R avec des zones d'inhibition respectivement de 11 et 12 mm. Par contre *Staphylococcus* est résistante à tous les extraits.

IV.2 l'effet antioxydant

Tableau 13 : Pourcentage de DPPH réduits.

Extraits	% DPPH réduit
CS1F	16.03
CS2F	24.94
CS3F	36.51
CS1FL	36.48
CS2FL	24.57
CS3FL	02.38
CS1T _A	29.70
CS1T _B	18.98
CS2T	16.88
CS3T	13.45
CS1R _A	25.90
CS1R _B	10.19
CS2R _A	18.81
CS2R _B	31.63
CS3R	20.74
HEZ	23.69
Acide Ascorbique	79.06
Acide Tannique	65.84

Pouvoir antioxydant faible : % DPPH réduit < 50% ;

Pouvoir antioxydant modéré : $50 \leq$ % DPPH réduit \leq 70% ;

Pouvoir antioxydant fort : % DPPH réduit \geq 70%.

D'après les résultats du tableau 13, nous pouvons conclure que tous les extraits de *Calycotome spinosa* L ont un faible pouvoir antioxydant.

Conclusion

Au cour de ce travail ,on a testé plusieurs famille de composés par des réactions de précipitations et de colorations .Les résultats montrent que les parties de cette plante sont riches en composés réducteurs ,alcaloides, saponosides et tanins .D'autre part, les flavonoides et les coumarines marquent aussi leur présence dans les fleurs et les feuilles avec des quantités inférieurs.

Afin de pouvoir exploiter une éventuelle activité thérapeutique , les extraits de toutes les parties de la plante ont été soumis à des tests antibactériens et antioxydants. Les résultats montrent que quelque extraits possèdent une bonne activité antibactérien et la plante n'a pas une activité antioxydante.