

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Analyses Biologiques et Biochimiques

Présenté par :

OGBI BEN HADOUCHE Fouzia & SIAD Hassiba

Thème

*Criblage phytochimique et évaluation de l'activité
antibactérienne des alcaloïdes et polyphénols de deux plantes
médicinales (famille de Boraginaceae)*

Soutenu le : 02/07 /2017

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. BOUTELDJA R.

MAA

Univ. de Bouira

Présidente

Mlle. BENSMAIL S.

MAA

Univ. de Bouira

Promotrice

Mme. DJOUHRA FAHEM D.

MAA

Univ. de Bouira

Co-Promotrice

Mme. CHAKROUNE M.

MAA

Univ. de Bouira

Examinatrice

Année Universitaire : 2016/2017

Remerciements

Nous tenons d'abord à remercier Dieu tout puissant qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

On tient à remercier très sincèrement notre promotrice M^{elle} BENSMAIL S., pour l'honneur qu'elle nous a fait en dirigeant cette recherche, pour leur infinie gentillesse, leur disponibilité constante et de mettre à notre disposition tous les moyens nécessaires pour la réussite de ce travail.

Nos profonds remerciements pour notre Co-promotrice Mme DJOUAHRA D. pour leur soutien et leur gentillesse.

*Nos vifs remerciements vont aux membres du jury:
Mme BOUTHALDJA R., qui a nous fait l'honneur et l'immense plaisir de présider le jury de soutenance. Ainsi que, Mme CHAKROUNE M. qui a accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver, ici l'expression de notre reconnaissance et notre respect.*

A tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, par un geste, une parole, ou un conseil, on leur dit merci.

Nous exprimons nos gratitude à nos familles SIAD et OGBI BEN HADOUCHE pour leur soutien et leur confiance tout au long de ce travail.

DEDICACE

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras

Mes chers parents ;

A ma très chère mère Louiza;

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père Lakhdar ;

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes sœurs: Houria, Samira, Naima, Linda, Hanane.

A mon frère: Mohammed.

A mon mari Daci Sofien ainsi que sa famille.

A tout mes Ami(e)s :

Razika, Assia, Hamama, Fatiha, Hassiba.

FOUZIA

DEDICACE

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde qui m'ont permis de continuer mes études dans les meilleures conditions et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras

Mes chers parents ;

A ma très chère mère Fatima;

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Et Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père Ali ;

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mes sœurs: Hdjila, Nassima, Safia, Hanane et Faiza.

A mes frères: Tahar, Lias, Farid, Arab, Halim, Fares, Raduane, Arezki et Hamza

A mon mari Badis Hamza ainsi que sa famille.

A tout mes Ami(e)s :

Mariem, Siham, Djamila, Razika, Zakia, Sara, Mona, Thiziri, Assia, Hamama, Fatiha, Dihia, Rima, Massouda, Karima, Djegdjiga, Taous et Kahina.

HASSIBA

Table des matières

Liste des abréviations.....	i
Liste des figures.....	ii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction.....	1
Partie I : Données bibliographiques.....	3
I. les plantes médicinales.....	3
I.1. Généralités.....	3
I.2. Les plantes en médecine moderne.....	3
II. La famille de <i>Boraginaceae</i>	3
II.1. Définition.....	3
II.2. Utilisation traditionnelle.....	4
II.3. La taxonomie.....	4
II.4. La distribution géographique.....	4
III. Présentations des plantes étudiées.....	5
III.1. <i>Cynoglossum cheirifolium</i>	5
III.1.1. Description botanique.....	5
III.1.2. Nomenclature.....	6
III.1.3. Taxonomie.....	7
III.2. <i>Cynoglossum creticum</i>	7
III.2.1. Description botanique.....	7
III.2.2. Nomenclature.....	8
III.2.3. Classification.....	9
III.3. Propriétés et usages thérapeutiques des deux plantes.....	9
IV. Les substances actives des plantes médicinales.....	9
IV.1. Les métabolites secondaires.....	10
IV.1.1. Les composés phénoliques.....	10
IV.1.1.1. La biosynthèse des composés phénoliques.....	10
IV.1.1.2. Rôles physiologiques.....	11
IV.1.1.3. Rôles biologiques.....	11
IV.1.1.4. Classification des composés phénoliques.....	12
IV.1.2. Les alcaloïdes.....	15
IV.1.2.1. Rôles physiologiques.....	15
IV.1.2.2. Rôles biologiques.....	16

IV.1.2.3. Classification des alcaloïdes selon l'origine biosynthétique.....	16
IV.1.2.4. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (AP).....	17
Chapitre II: Matériels et Méthodes	19
I.1. Matériel	19
I.1.1. Matériels non biologiques.....	19
I.1.2. Matériel biologique.....	20
I.2.1. Séchage et conservation de la plante	20
I.2.2. Caractéristiques des poudres obtenues.....	21
II. Méthodes	22
II.1. Screening phytochimiques.....	23
II.1.1. Préparation de l'infusé à 5%	23
II.2. Les méthodes d'extractions.....	26
II.2.1. Extraction des alcaloïdes par macération	26
II.2.2. Extraction des poly-phénols par macération.....	27
II.3. Extraction mécanique.....	28
II.4. Détermination des rendements en poly-phénols et en alcaloïdes	29
II.5. Dosage des poly-phénols totaux.....	30
II.6. Séparation des alcaloïdes et poly-phénols par CCM.....	30
II.7. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits	32
II.7.1. Microorganismes testés.....	32
II.7.2. Test d'antibiogramme.....	32
III. Résultats et Discussion	34
III.1. Screening phytochimique.....	34
III.2. Détermination des rendements en alcaloïdes et poly-phénols.....	35
III.2.1. Les poly-phénols totaux.....	35
III.2.2. Les alcaloïdes.....	36
III.3. Dosage des poly-phénols totaux.....	38
III.4. Séparation des poly-phénols et des alcaloïdes par CCM.....	39
III.4.1. Les poly-phénols.....	40
III.4.2. Les alcaloïdes.....	42
III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	45
Conclusion	51
Références bibliographiques	53
Annexes	

Liste des abréviations

ANZFA	: <i>Australia New Zealand Food Authority</i>
ATCC	: <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	: Adénosine Triphosphate
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CPG/SM	: Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
GHz	: Gigahertz
HPLC	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
IPCS	: Programme International de l’OMS sur la Sécurité des substances Chimiques
KHz	: Kilohertz
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
Rf	: Rapport frontale
UFC	: Unité Formant Colonie
UV	: UltraViolet
v/v	: volume/volume

Liste des Figures

Figure 1 : Vues de différentes parties de <i>Cynoglossum cheirifolium</i>	06
Figure 2 : Vues des différentes parties de <i>Cynoglossum creticum</i>	08
Figure 3 : Structures de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques (a), exemples de dérivés des alcaloïdes (b, c) et l'acide nécique.....	18
Figure 4 : Présentation des zones de récolte sur la carte géographique de Bouira.....	20
Figure 5 : Aspect des poudres des feuilles de <i>C. cheirifolium</i> (a), feuilles de <i>C. creticum</i> (b) et des racines (c)	21
Figure 6 : Schéma général des différentes étapes du travail.....	22
Figure 7: Les étapes d'extraction des alcaloïdes.....	26
Figure 8 : Les étapes appliquées pour l'extraction des poly-phénols totaux.....	27
Figure 9 : Section transversale microscopique de tige apicale de menthe (<i>Mentha piperita</i>) montre le mécanisme des actions lors de l'extraction ultrasonique (Gx2000).....	28
Figure 10 : Extraction des alcaloïdes de <i>C. cheirifolium</i> par sonication (Bain à ultrasons).....	29
Figure 11 : Les rendements en polyphénols totaux des feuilles des deux plantes.....	36
Figure 12 : Rendement d'extraction des alcaloïdes par macération de deux plantes (feuilles).....	37
Figure 13 : Rendement en alcaloïdes de <i>C. Cheirifolium</i> selon la méthode d'extraction....	38
Figure 14 : Teneur en polyphénols des feuilles des deux plantes.....	39
Figure 15 : Révélation des plaques CCM après migration des extraits de poly-phénols des feuilles de <i>C. creticum</i> (Pcc) et <i>C. cheirifolium</i> (PccH) : avec la lampe UV 254 nm (a), lampe UV 365 nm (b) et après l'action de l'ammoniaque (c).....	42
Figure 16 : Séparation par CCM des extraits d'alcaloïdes de <i>C. cheirifolium</i> obtenus par macération (a) et par sonication (b).....	44
Figure 17 : Exemple sur les zones d'inhibition obtenues, cas des poly-phénols de <i>C. creticum</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> M.....	46

Liste des Tableaux

Tableau I : Exemples des rôles biologiques des composés phénoliques.....	12
Tableau II : Structures chimiques de certains composés phénoliques.....	14
Tableau III : Liste de matériels non biologiques utilisés pendant la manipulation.....	19
Tableau IV : Systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des alcaloïdes des deux plantes étudiées par CCM.....	31
Tableau V : Systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des poly-phénols des deux plantes étudiées par CCM.....	31
Tableau VI : Caractéristiques générales des bactéries testées.....	32
Tableau VII : Résultats du screening phytochimique de <i>C. creticum</i> et <i>C. cheirifolium</i> des deux parties feuilles et racines.....	34
Tableau VIII : Résultats des mini-CCM pour la séparation des poly-phénols des deux plantes.....	41
Tableau IX: Résultats des mini-CCM pour la séparation des alcaloïdes des deux plantes extraits par macération.....	43
Tableau X: Détermination des zones d'inhibition obtenues avec les extraits de <i>C. creticum</i>	46
Tableau XI: Détermination de la zone d'inhibition des antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.....	47

Introduction

Introduction

La connaissance et l'usage des plantes médicinales constituent un vrai patrimoine de l'être humain, c'est pour ça l'étude de la chimie des plantes est toujours une actualité malgré son ancienneté. Cela tient principalement au fait que le règne végétal représente une source importante d'une immense variété de molécules bioactives à intérêts multiples en alimentation, en cosmétologie et en pharmacologie.

Aujourd'hui plus de 120 composés provenant de plantes sont utilisés en médecine moderne et près de 75% d'entre eux sont utilisés selon leur usage traditionnel dont le nombre de médicaments issus de produits naturels est en progression croissante par comparaison à des produits issus de la chimie combinatoire (**Abedini, 2013**).

Certaines plantes ne sont pas exclusivement utilisées pour les soins médicaux humains mais également appliquées comme des pesticides, poisons de flèche ou de pêche ou encore comme narcotiques pour leur caractère toxique (**Schmelzer et Gurib, 2008**).

L'Algérie possède une flore végétale riche et diversifiée. Parmi les plantes médicinales qui constituent le couvert végétal, on trouve assez des espèces de la famille des *Boraginaceae*, qui sont également largement distribuées dans les régions méditerranéennes, dont certaines d'entre eux sont des espèces endémiques des zones magrébines.

Le screening ou le criblage phytochimique joue un rôle essentiel dans la caractérisation des groupes de familles chimiques dans une plante donnée, par contre, il ne permet pas d'identifier ou de déterminer la structure chimique des composés présents.

Notre étude a ciblé deux plantes de la famille de Boraginacée : *Cynoglossum cheirifolium* et *Cynoglossum creticum* vue le nombre très faibles des travaux effectués pour étudier les différents principes actifs des deux plantes surtout *C. cheirifolium*.

Selon la littérature, le genre *Cynoglossum* est une source très riche en alcaloïdes. A l'heure actuelle, les chercheurs ont isolé à partir des différents organes des plantes de ce genre, plusieurs alcaloïdes de type pyrrolizidine qui sont considérés comme des substances toxiques surtout s'ils sont destinés à un usage interne (**Belda et Zaragoza, 2013**). Pour cela, le nombre des travaux réalisés sur les autres principes actifs de ces plantes n'a pas augmenté au cours du temps voir inexistantes pour certaines espèces.

A fin d'améliorer nos connaissances sur les deux plantes déjà citées, notre travail se base premièrement sur un screening phyto-chimique appliqué afin d'élucider les différentes classes chimiques des deux espèces pour les deux parties aérienne et des racines. Par la suite, on a ciblé deux classes des substances bioactives les poly-phénols et les alcaloïdes, dont les étapes de l'étude sont les suivantes :

- Application des méthodes conventionnelles (par macération) pour l'extraction des alcaloïdes et poly-phénols de la partie aérienne des deux plantes ;
- L'utilisation d'une technique innovante (la sonication) dans l'extraction des alcaloïdes afin de la comparer à la méthode conventionnelle ;
- Analyses qualitative par CCM et quantitative de la composition chimique de nos extraits ;
- L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne des extraits obtenus sur des souches de références.

Chapitre I
Partie Bibliographique

I. Les plantes médicinales

I.1. Généralités

Les végétaux constituent depuis longtemps une importante ressource naturelle pour les sociétés humaines. Ils servent à la fois pour l'alimentation et la confection d'autres biens de consommations nécessaires aux sociétés (**Gontier, 2008**).

Les extraits bruts des plantes font l'objet des études pour leur éventuelle utilisation dans la préparation des produits cosmétiques, des parfums, des arômes et comme des alternatives dans le traitement des maladies infectieuses et pour la protection des aliments contre l'oxydation. Ils interviennent dans la prévention et le traitement des maladies liées au stress oxydatif tels que les cancers, la cataracte, l'athérosclérose, le diabète, l'hypertension artérielle, les maladies neuro-dégénératives, l'arthrite...ect (**Chourba, 2015**).

L'approvisionnement en produits d'origine naturelle devra de plus en plus se faire en tenant compte des contraintes écologiques : produits non pollués et obtenus sans destruction des gîtes naturels (**Cabalion, 1990**).

I.2. Les plantes en médecine moderne

L'usage des plantes en médecine est très ancien, où les animaux sauvages utilisent instinctivement certaines plantes pour se soigner! Aujourd'hui, pour que la médecine traditionnelle puisse porter ses fruits à une large échelle, et de manière encore plus efficace, il lui faut rencontrer la médecine dite « moderne » où l'homme a développé des procédés d'extraction qui ont permis la fabrication de médicaments à partir d'agents phytochimiques extraits des plantes (**Gontier, 2008**).

L'avenir des substances naturelles biologiquement intéressantes passe par la poursuite des études chimiques et pharmacologiques classiques de la matière, mais aussi par le développement des études biotechnologiques. Il n'est pas superflu d'insister une fois de plus sur l'importance primordiale de la systématique pour connaître parfaitement et identifier le matériel vivant. Sans elle, rien ne pourrait ici se faire intelligemment (**Cabalion, 1990**).

II. La famille de *Boraginaceae*

II.1. Définition

Les *Boraginaceae* sont des angiospermes, comprenant 1600 espèces réparties en 110 genres, on y trouve des herbes annuelles, arbustes et arbres. Les feuilles sont souvent entières, simples, alternées et ex-stipulées, possèdent des tiges avec des poils rigides qui donnent une sensation rugueuse. Les cellules des feuilles possèdent des cristaux d'oxalate de calcium. Les fleurs, qui sont le plus souvent hermaphrodites, ont un calice à lobes imbriqués et une corolle

tubuleuse campanulée, divisée en 5 lobes relativement réduits et munis d'écailles ou de poils au centre (**Bremer et al., 2003; Benamer, 2006**).

La classe des alcaloïdes pyrrolizidiniques constitue un marqueur chimio-taxonomique important des *Boraginaceae* car on le retrouve quasi systématiquement dans les genres qui forment cette grande famille (**Gandini, 2016**).

II.2. Utilisation traditionnelle

Les différentes parties (feuilles, fleurs et racines) de plusieurs plantes de la famille de *Boraginaceae* sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter : les blessures, les maladies de la peau (soulagement des brûlures), de la fièvre, des douleurs thoraciques, abdominales et articulaires, l'hypotension, inflammation des yeux, infection de l'oreille, arthrite. Elles présentent également des activités antispasmodiques, antibactériennes, antihelminthique, anti-hémorragique, antiseptique, diurétique, cataplasme aux plaies courantes et aux maladies vénériennes, etc.... (**Tiwari, 2008 ; Attard et Pacioni, 2012 ; Joshi et al., 2016**)

II.3. La taxonomie

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Sous embranchement : Angiospermae

Classe : Magnoliopsida

Ordre : lamiales

Famille : *Boraginaceae*

Sous famille : Cordioideae

Ethretioideae

Heliotropoideae

Wellstedioideae (**Benamer, 2006**).

II.4. La distribution géographique

Les *Boraginaceae* ont une distribution cosmopolite. Les genres d'arbres sont pantropicales et subtropicale, tandis que les genres d'herbacées sont distribués dans le monde entier bien que particulièrement abondants dans la région méditerranéenne et en Asie tempérée chaude. Ils se produisent dans un large éventail d'habitats à partir du niveau de la mer à plus de 4000m d'altitude (**Benamer, 2006 ; Bowe et Yatskievych, 2016**).

III. Présentations des plantes étudiées

Les deux plantes étudiées appartiennent au genre *Cynoglossum*. Ce nom vient du grec « cyni » qui signifie *chien* et *glossan* qui veut dire *langue*. La Cynoglosse a ainsi été nommée par le botaniste grec Pedanius Dioscoride (40-90 après J.-C.) dans son premier ouvrage botanique en référence au toucher rêche des feuilles (**Anonyme, 2011**).

Le genre *Cynoglossum* représente environ 75 espèces connues réparties en Asie, en Afrique et en Europe, mais récemment, la révision de la liste des plantes a augmenté le nombre d'espèces acceptées dans ce genre à plus de 86 espèces. Toutes les espèces poussent le long des forêts ouvertes, de la route et des dunes de sable.

Cynoglossum est un genre riche en espèces et, en raison de ses similitudes dans la morphologie externe, il est décrit comme un genre taxonomiquement difficile, où des observations détaillées de la micromorphologie de la plupart des espèces sont insuffisantes et ne peuvent être résolues sans une enquête appropriée. Les espèces de ce genre sont utilisées comme remèdes dans la médecine traditionnelle et cultivées comme plante ornementale dans les jardins et les parcs (**Joshi et al., 2016 ; Bowe et Yatskievych, 2016**).

III.1. *Cynoglossum cheirifolium*

III.1.1. Description botanique

Actuellement connue sous le nom de *Pardoglossum cheirifolium* L. (Barbier & Mathez, 1973), son nom spécifique *cheirifolium* vient du latin "*folium*" signifie feuille et de l'arabe "*keiri*" qui désigne la Giroflée.

Cette plante biannuelle s'élève jusqu'à 30 à 40 cm, sa tige est branchue, un peu anguleuse et chargée d'un duvet blanc extrêmement court. Ses feuilles sont allongées, étroites, spatulées, blanchâtres, les corolles sont blanches et tachées de rouge, leurs pédoncules et les bords de leurs calices sont cotonneux, les corolles sont deux fois plus long que le calice. La période de floraison est du mois de Mars-Avril/Juin selon le pays et le climat (**Figure 1**) (**Quezel et Santa, 1963 ; Barbier et Mathez, 1973**). Cette espèce se développe dans les régions arides et rocailleuses, au niveau des garrigues (sols calcaires), dans l'ouest méditerranéen et dans tout l'Algérie (**Barbier et Mathez, 1973**).



Figure 1 : Vues des différentes parties de *Cynoglossum cheirifolium* (Photos originales).

III.1.2. Nomenclature

Synonymes : *C. cheirifolium* L. (1753), *Anchua lanata* L. (1759), *C. argenteum* Lam. (1779), *Alkanna tinctoria* Tausch (1824), *Solenanthus lanatus* Murb. (1898).

Noms vernaculaires : En arabe: Ouadnine eljadienne, afrad, el massassa. En Français: Cynoglosse à feuilles de giroflée. En Espagnol: Viniebla de hoja de alheli. En Italien: Lingua-di-cane giallastra (**Delahaye et al., 2002**).

III.1.3. Taxonomie

La classification systématique de *C. cheirifolium* est la suivante (**Barbier et Mathez, 1973**).

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	<i>Boraginaceae</i>
Genre	<i>Pardoglossum</i>
Espèce	<i>Pardoglossum cheirifolium</i>

III.2. *Cynoglossum creticum*

La Cynoglosse de Crète est une espèce méditerranéenne, très commune dans le Tell algérien et rare ailleurs. Elle se rencontre sur les sommets arides, dans les lieux incultes et au bord des chemins (**Anonyme, 2011**).

III.2.1. Description botanique

C. creticum est une plante biannuelle qui atteint jusqu'à 60 cm de hauteur. Ses tiges sont densément recouvertes de poils fins. Elle a des feuilles de couleur verte foncée, jusqu'à 20 cm de long et 25-35 mm de large, recouvertes de longs poils grossiers. La base de la feuille est en forme de cœur et ferme la tige. Les feuilles sont alternativement placées et diminuent la taille de la tige. Au cours de la première année de croissance, la plante forme une rosette; ceci est suivi par une ou plusieurs tiges de haute floraison pendant la deuxième saison de croissance. La fleur, un tube de 10 à 11 mm de long, est rose à bleu et a des veines et des étamines sans poils plus foncés qui se développent à partir de la base du tube. Chaque fleur produit quatre «akènes» ou nucules, accrochées ou barbes lorsqu'elles sont mûres. Les graines sont ovales de 6-8 mm de long et leur surface extérieure est couverte d'épines (**Figure 2**) (**Anonyme, 2003 ; Anonyme, 2007 ; Bowe et Yatskievych, 2016**).



Figure 2 : Vues des différentes parties de *Cynoglossum creticum* (Photos originales).

III.2.2. Nomenclature

Synonymes : *C. pictum* Aiton (1789), *C. siculum* Guss. (1832), *C. atlanticum* Murb. (1922).

Noms vernaculaires : En arabe: Saboun el arais, Ouden el arnebe. En Français: Langue de chien, Cynoglosse de Crète, Cynoglosse peinte. En anglais: Blue hound's tongue. En Espagnol: Lengua de perro. En Italien: Lingua-di-cane a fiori variegati (**Anonyme, 2011 ;** **Bowe et Yatskievych, 2016**).

III.2.3. Classification

La position systématique de *C. creticum* est la suivante (**Barbier et Mathez, 1973**).

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Lamiales
Famille	<i>Boraginaceae</i>
Genre	<i>Cynoglossum</i>
Espèce	<i>Cynoglossum creticum</i>

III.3. Propriétés et usages thérapeutiques des deux plantes

Les feuilles de *C. creticum* astringentes étaient utilisées contre les brûlures. Elle traite également les infections pulmonaires et la tuberculose. Les racines servaient d'expectorant et d'anti-diarrhéique, où leur décoction est utilisée pour soulager les douleurs articulaires. Pour *C. cheirifolium* est utilisé traditionnellement pour le traitement de l'acné, diarrhée, blessures et l'ulcère. Les usages doivent être uniquement externes car il s'agit d'une plante toxique pour le foie (**Anonyme, 2011 ; Tiwari, 2008 ; Attard et Pacioni, 2012**).

IV. Les substances actives des plantes médicinales

Les plantes ont une importance capitale pour la survie de l'homme et des différents écosystèmes. Elles renferment une part importante des composés qui interviennent dans l'ensemble des réactions enzymatiques ou biochimiques ayant lieu dans l'organisme. On distingue ainsi deux groupes de métabolites:

- **Les métabolites primaires** : sont des molécules organiques qui se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie. Ces composés sont classés en quatre principaux groupes : les glucides, les protéines, les lipides et les acides nucléiques (**Hamidi, 2013**).
- **Les métabolites secondaires** : sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes (**Boudjouref, 2001**). Ils sont nécessaires à sa défense contre les agressions externes. Cependant, ils ne sont pas toujours nécessaires à la survie de la plante.

On trouve ces métabolites dans toutes les parties de la plante, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

Les métabolites secondaires font l'objet de nombreuses recherches pour leurs intérêts multiples. Ils sont mis à profit aussi bien dans l'industrie alimentaire, cosmétique que pharmaceutique. Ils sont largement utilisés en thérapie comme vasculo-protecteurs, anti-inflammatoires, inhibiteurs enzymatiques, antioxydants et anti-radicalaires. **(Hamidi, 2013).**

Donc, les plantes médicinales doivent leur action à un ou plusieurs principes actifs que l'on peut analyser chimiquement et qu'il est indispensable de les connaître pour comprendre comment elles agissent sur l'organisme **(Benhamza, 2008).**

IV.1. Les métabolites secondaires

IV.1.1. Les composés phénoliques

Ils se caractérisent par la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester ou hétéroside **(Krief, 2003).**

IV.1.1.1. La biosynthèse des composés phénoliques

Les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromagnèse :

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (l'acide shikimique) conduit des oses aux amino-acides aromatiques (Phe, Tyr et Trp) puis par désamination de ces derniers aux acides cinnamiques et à des très nombreux dérivés : acides benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines, etc... **(Heller et al., 2004 ; Brunton, 2009).**

Cette voie débute par la condensation d'un érythrose-4-phosphate (prélevé sur la voie des pentoses) et d'un phosphoénolpyruvate (produit de la glycosyle) pour former un composé hétérocyclique à sept carbones, le 3-désoxy-D-arabino-heptuloronate-7-phosphate (DAHP) qui après déphosphorylation, déshydratation et réduction, donne du shikimate. Une série de réactions assure ensuite l'accrochage d'une chaîne latérale et la création d'une double liaison sur le cycle, d'où le chorismate. Toutes ces réactions, dont certaines exigent de l'ATP, sont catalysées par des synthases **(Heller et al., 2004).**

- L'autre voie, voie de l'acétate et conduit à des poly- β -cétosters de longueur variable, les polyacétates, qui engendrent par cyclisation (réaction de CLAISEN ou

condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, xanthes, quinones, etc...

La diversité structurale des composés phénoliques due à cette double origine biosynthétiques est encore accrue par la possibilité très fréquente d'une participation simultanée du shikimate et de l'acétate à l'élaboration de composés d'origine mixte (flavonoïdes *lato sensu*, stilbénes, pyrones, xanthes, etc...) (**Brunton, 2009**).

IV.1.1.2. Rôles physiologiques

- Ce sont des pigments permettant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles ;
- Les composés phénoliques sont impliqués dans les réactions de défense contre les agents pathogènes ou le rayonnement UV.
- Ils sont engagés dans les processus de germination, floraison, tubérisation et la croissance racinaire.
- Le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec diverses hormones végétales de croissance (**Heller et al., 2004 ; Abedini, 2013 ; Kebili, 2016**).

IV.1.1.3. Rôles biologiques

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en générale et les flavonoïdes en particulier sont très poussées en raison de leurs diverses propriétés biologiques comme les activités antiallergique, anti-atherogénique, anti-inflammatoire, hépato-protective, antivirale, antibactérienne, anti-carcinogénique, anti-thrombotique, cardio-protective et vasodilatatoire (**Tableau I**). Ces actions sont attribuées à leur effet antioxydant qui est due à leurs propriétés redox en jouant un rôle important dans la destruction oxydative par la neutralisation des radicaux libres, piégeage de l'oxygène ou décomposition des peroxydes (**Zeghoune, 2014**).

Tableau I : Exemples des rôles biologiques des composés phénoliques (**Kebbab, 2014**).

Composés phénoliques	Activités biologiques
Acides phénoliques	Antifongique, antioxydant, antibactérienne
Tanins	Effet stabilisant sur le collagène, antioxydant, anti-diarrhéique, effet antiseptique, effet vasoconstricteur.
Flavonoïdes	Anti-tumorale, anti-carcinogène, anti-inflammatoire, antioxydante, antiallergique, antiulcéreuse, antivirale, antimicrobienne, hypotenseur, diurétique.
Coumarines	Anticoagulante, antioxydante, protectrice vasculaire et anti-œdémateuse.
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux, antioxydant
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène, antioxydants, anti-tumorale, antifongiques et anti-inflammatoires.
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes
Lignanes	Anti-inflammatoires, analgésiques

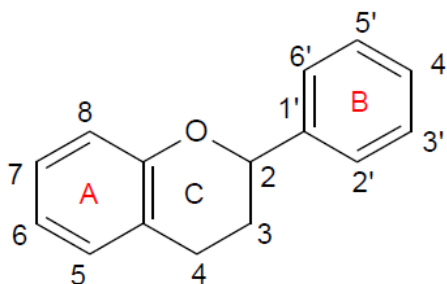
IV.1.1.4. Classification des composés phénoliques

1. Les non flavonoïdes

- a. **Les acides phénoliques** : le terme d'acide-phénolique peut s'appliquer à tous les composés possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïque et cinnamique (**Brunton, 2009**).
- b. **Les coumarines** : tirent leur nom de « coumarou » nom vernaculaire de la fève tonka, d'où fut isolée en 1820 (**Brunton, 2009**). Se sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (**Hamidi, 2013**).
- c. **Les lignines** : ce terme désigne habituellement des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbone- β des chaînes latérales de deux unités dérivés du 1-phénol propane (liaison 8-8'). On dit aussi que ce sont des dimères d'alcools ou d'acides cinnamiques (**Brunton, 2009**).

d. Les stilbènes : ce sont des composés phénoliques, qui possèdent deux noyaux benzéniques séparés par un pont éthane ou éthène, dont la structure est $C_6-C_2-C_6$ comme les flavonoïdes, généralement peuvent être libres ou hétérosidiques parfois polymériques (**Brunton, 2009 ; Yezza et al., 2014 ; boukri, 2014**).

2. Les flavonoïdes : ces composés sont présents chez toutes les plantes vasculaires et la plupart des Bryophytes (**Kather, 2011**), ayant une structure de base en $C_6-C_3-C_6$, constituée de deux noyaux aromatiques, désignés par les lettres A et B reliés par un hétérocycle oxygéné, indiqué par la lettre C (**Brunton, 2009**).



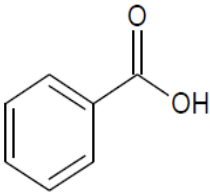
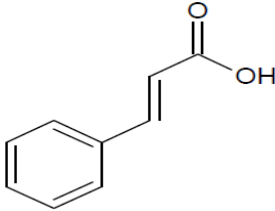
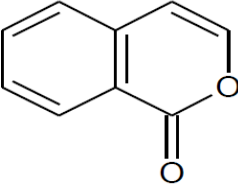
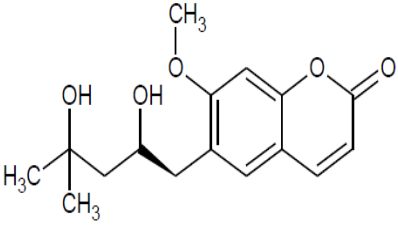
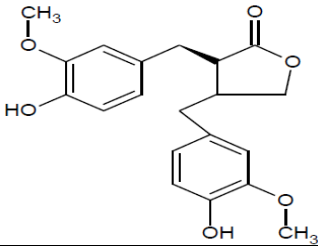
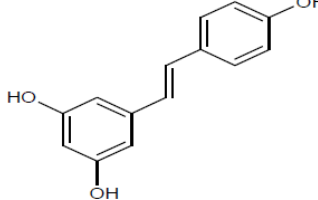
Les flavonoïdes sont classés en fonction du degré d'oxydation du noyau pyranique central. On les distingue aussi par le nombre et la position des groupements hydroxyles et par l'existence ou non de substituant sur la génine. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et de ce fait possèdent le même élément structural de base. Selon la position de la liaison entre le noyau B et l'hétérocycle C, on distingue :

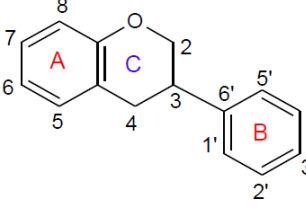
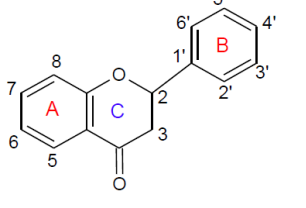
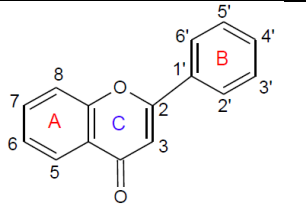
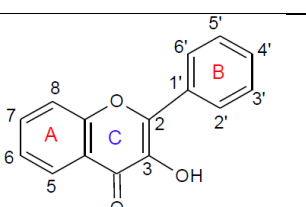
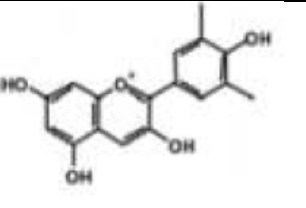
- Dans la position 2 : le flavonoïde est appelé flavane ;
- Dans la position 3 : le flavonoïde est désigné par le terme isoflavane ;
- Si la position 4 du flavane porte un groupement carbonyle, la molécule est appelée flavanone ;
- Si la liaison C_2-C_3 dans le squelette de la flavanone est en plus insaturée, le composé est nommé flavone.
- Si le squelette précédent est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle. Il est désigné par le nom de flavonol (**Abdini, 2013**).

a. Les anthocyanes : un terme général qui regroupe les anthocyanidols et leurs dérivés glycosylés. Ces molécules faisant partie de la famille des flavonoïdes et capables d'absorber la lumière visible, ce sont des pigments qui colorent les plantes en, bleu, rouge, mauve, rose ou orange (**Kholkhal, 2014**). Leur

structure de base est caractérisée par un noyau « flavon » généralement glycosylé en position C₃, les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment (**Cheurfa, 2015**).

Tableau II : Structures chimiques de certains composés phénoliques (**Belyagoubi, 2012 ; Hamidi, 2013 ; Abdini, 2013 ; Cheurfa, 2015**).

Nom	Structure Chimique
L'acide benzoïque	
L'acide cinnamique	
Benzo-2-pyrone (Isocoumarine)	
Coumarines (Peucédanol)	
Lignane (Matairesinol)	
Stilbène (Resveratrol)	

Flavane	
Isoflavane	
Flavanone	
Flavone	
Flavonol	
Anthocyanes	

IV.1.2. Les alcaloïdes

Un alcaloïde est une substance organique azotée à caractère alcalin et présente une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique (**Badiaga, 2011**).

IV.1.2.1. Rôles physiologiques

Le rôle des alcaloïdes dans les végétaux est encore largement inconnu. Certaines théories prédisent que certains alcaloïdes interviennent dans les relations plantes/prédateurs en protégeant les premières contre l'agression des seconds.

Plusieurs alcaloïdes sont très toxiques et offrent, par conséquent, un arsenal chimiques de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des microorganismes, par exemple la nicotine empêche la croissance des larves du tabac. En outre, certains alcaloïdes protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV. Ils constituent aussi une réserve de substances capables de fournir l'azote ou d'autres fragments nécessaires au développement de la plante.

Les alcaloïdes sont totalement impliqués dans une chimie de communications inter et intra-espèce, intégrés dans une écologie chimiques. Dans les relations inter-espèce, le goût amer est une approche non négligeable souvent suivie de la toxicité.

A l'heure actuelle, on n'arrive toujours pas à savoir la fonction exacte des alcaloïdes dans les végétaux. L'existence de plantes ne contenant pas d'alcaloïdes démontre que ces composés ne sont pas apparemment essentiels à leur reproduction (**Badiaga, 2011**).

IV.1.2.2. Rôles biologiques

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités pharmacologiques qui s'exercent dans les domaines les plus variés :

- Au niveau de système nerveux centrale qu'ils soient dépresseurs (morphine, scopolamine) ou stimulants (strychimie, caféine).
- Au niveau de système nerveux autonome : sympathomimétiques (éphédrine) ou sympatholytique (yohimbine), parasymphomimétique, inhibiteurs des cholinestérasés (pilocarpine, galanthamine), anti-cholinergiques (atropine, hyoscyamine, scopolamine), ganglioplégiques (spartéine, nicotine).
- On notera aussi l'existence des curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'anti-fibrillants (quinidine), d'anti-tumoraux, d'antipaludiques et d'amoebicides (**Brunton, 2009**).

IV.1.2.3. Classification des alcaloïdes selon l'origine biosynthétique

1. **Les alcaloïdes vrais** : existent sous forme de sels, correspondent à des substances formées à partir d'un acide aminé, leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et elles possèdent une activité pharmacologiques significative.

2. **Les pseudo-alcaloïdes** : présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas dérivés des acides aminés. Il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoides et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques. On connaît également des substances azotées hétérocycliques issues du métabolisme de l'acétate.
3. **Les proto-alcaloïdes** : ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique; ils ont une réaction basique (**Brunton, 2009**).

IV.1.2.4. Les alcaloïdes pyrrolizidiniques (AP)

Les alcaloïdes de pyrrolizidine sont des toxines naturellement présentes dans une grande variété d'espèces végétales et affectent la faune sauvage, les animaux d'élevage et les humains (**FAO et OMS, 2011**).

Les AP et leurs oxydes azotés forment un grand groupe de métabolites secondaires produits par certaines plantes qui peuvent devenir hépatotoxiques (l'intoxication chronique se traduit par une perte d'appétit, des douleurs, une distension abdominale, une augmentation du volume du foie). Certains d'entre eux se sont révélés génotoxiques et cancérigènes (**Lanzelotti, 2011**).

Ces alcaloïdes sont caractérisés par une structure pyrrolizidine qui correspond à l'association de deux cycles pyrroles (**Figure 3**). La diversification chimique se fait par des ramifications, sur la position 1 et 7 du noyau pyrrolizidine. La plupart de ces alcaloïdes sont des esters formés entre des amino-alcools et un ou deux acides carboxyliques aliphatiques. Les amino-alcools dérivés de la pyrrolizidine sont appelés des nécines. Les acides estérifiant ces nécines sont des acides aliphatiques pouvant compter jusqu'à 10 carbones et sont nommés acides néciques (**Gandini, 2016**).

1. La toxicité des AP

Pour être toxique, la substance doit présenter une in-saturation entre les positions 1 et 2 de l'hétérocycle et une estérification spécifique du groupe hydroxyle attaché à la nécine.

Compte tenu de toutes les combinaisons chimiques possibles de ces structures, il pourrait y avoir plus de 600 molécules différentes d'alcaloïdes pyrrolizidiniques et jusqu'à présent plus de 350 ont été identifiées dans les plantes du monde entier.

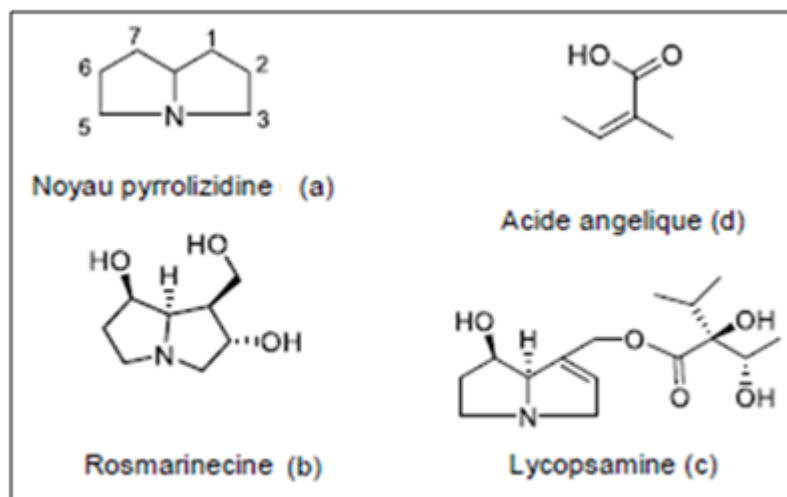


Figure 3 : Structure de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques (a), exemples de dérivés des alcaloïdes (b, c), et acides néciques (d) (**Gandini, 2016**).

Les AP ne sont pas toxiques en soi mais au travers de leurs métabolites, car ils sont transformés par les enzymes hépatiques du cytochrome P-450, ce qui cause des dégâts au niveau des chromosomes (**Lanzelotti, 2011**).

L'IPCS (OMS, 1988) a déterminé que chez l'homme, l'intoxication aux AP se manifeste généralement par une maladie veino-occlusive aiguë (VOD) caractérisée par une douleur sourde prolongée dans la partie supérieure droite de l'abdomen, et l'épanchement rapide d'ascites, produisant la distension marquée de l'abdomen, et parfois accompagnée d'oligurie et d'une effusion pleurale massive. Elle peut aussi se manifester comme maladie subaiguë avec des symptômes vagues et persistants d'hépatomégalie.

L'IPCS n'a conclu qu'une dose journalière d'AP aussi faible que l'équivalent de 0,01 mg/kg d'héliotrine peut provoquer la maladie chez les humains.

ANZFA (2001) a conclu que l'organe cible dans la toxicité des AP à la fois chez les animaux de laboratoire et chez les humains est le foie. Chez les animaux, la toxicité se manifeste en tant qu'activité antimitotique entraînant une fibrose importante, la régénération nodulaire, le parenchyme et le cancer, alors que chez les humains les principaux effets sont les lésions hépatocellulaires, la cirrhose et la maladie veino-occlusive.

Il a été proposé une dose journalière tolérable provisoire de 1 µg/kg/jour sur la base de la maladie veino-occlusive du foie en tant que principal effet toxicologique de l'exposition chronique (**FAO et OMS, 2011**).

Chapitre II
Matériel & Méthodes

Matériels et Méthodes

Notre travail a porté sur l'étude phytochimique des deux parties aérienne et sous terraines de *C. creticum* et *C. cheirifolium* ainsi que l'extraction des alcaloïdes et des polyphénols des deux plantes (à partir des feuilles) et l'évaluation de leurs activités antibactériennes.

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Biochimie, Département des Sciences Biologiques (Faculté SNV-ST) de Bouira ainsi qu'au niveau du laboratoire de Microbiologie, Centre Hospitalier Mohamed Boudiaf (W. Bouira).

I.1. Matériel

I.1.1. Matériels non biologiques

L'ensemble de matériel non biologique utilisé pour réaliser cette étude est résumé dans le tableau suivant:

Tableau III : Liste des matériels non biologiques utilisés pendant la manipulation.

Verreries et petits matériels	Appareils	Réactifs et produits chimiques
Bécher 250ml, 500ml, 1L, 2L	Bain Marie (Nuve Bath)	Acide chlorhydrique
Ampoule à décanter 250ml, 500ml	Agitateur magnétique (Jlab Tech)	Trichlorure de Fer
Fiole 250ml, 500ml	Rota-vapeur (Stuart)	Hydroxyde de Potassium
Eprouvette 10ml, 25ml, 50ml, 100ml	Pompe à vide (Stuart)	Acide sulfurique
Erlenmeyers de 250ml	Hotte chimique (Cruma 670)	Propanol, Chloroforme
Entonnoirs	Balance analytique (OHAUS ^R)	Ethanol absolu, Méthanol
Tubes à essai	Etuve (Venticell)	Ammoniaque, Hexane
Boîtes de Pétri	Autoclave (Wise Classe)	Ether di-éthylique
Bec benzène (Erdgas)	Spectrophotomètre (Optizen 3220 UV)	Acétone, Acide acétique
Micropipettes		Acétate d'éthyle, Butanol
Pipettes Pasteur		Acide gallique
Ecouvillons		Carbonate de sodium
Papier pH		Réactif de Folin-Ciocalteu
Papier Wattman		Réactifs de Dragendorff et de Mayer
Plaques CCM...etc		Milieu Muller-Hinton
		Milieu Gélose nutritive

I.1.2. Matériel biologique

Le matériel végétal, exploité dans cette étude, est constitué par les feuilles et les racines de *C. creticum* et *C. cheirifolium*, qui ont été récoltées pendant les deux mois Février et Mars (2017) dans les régions d'Ait Laaziz, Aomar et Ain Lahdjar de la wilaya de Bouira (Algérie) (Figure 4).



Figure 4 : Présentation des zones de récolte sur la carte géographique de Bouira (www.dcw.dz).

- Altitude des zones de récolte : 1018 m pour Ait Laaziz, 700 m pour Oamar et 583m pour Ain Lahdjar de la wilaya de Bouira.
- Ces zones sont caractérisées par un climat méditerranéen avec un été chaud.

I.2.1. Séchage et conservation de la plante

Les différentes parties des plantes sélectionnées (les feuilles et les racines) sont nettoyées, séchées à l'air libre, à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 20 jours, puis broyées à l'aide d'un broyeur électrique (SAYONA) et conservées à sec dans des boîtes en verre, à température ambiante et à l'abri de la lumière.

I.2.2. Caractéristiques des poudres obtenues

Les parties d'intérêts ont été broyées afin obtenir une poudre relativement fine ayant une couleur verdâtre foncée pour les feuilles de *C. creticum* et plus claire avec un aspect cotonneux pour celles de *C. cheirifolium*. La poudre des racines des deux plantes est de couleur marron clair (Figure 5).

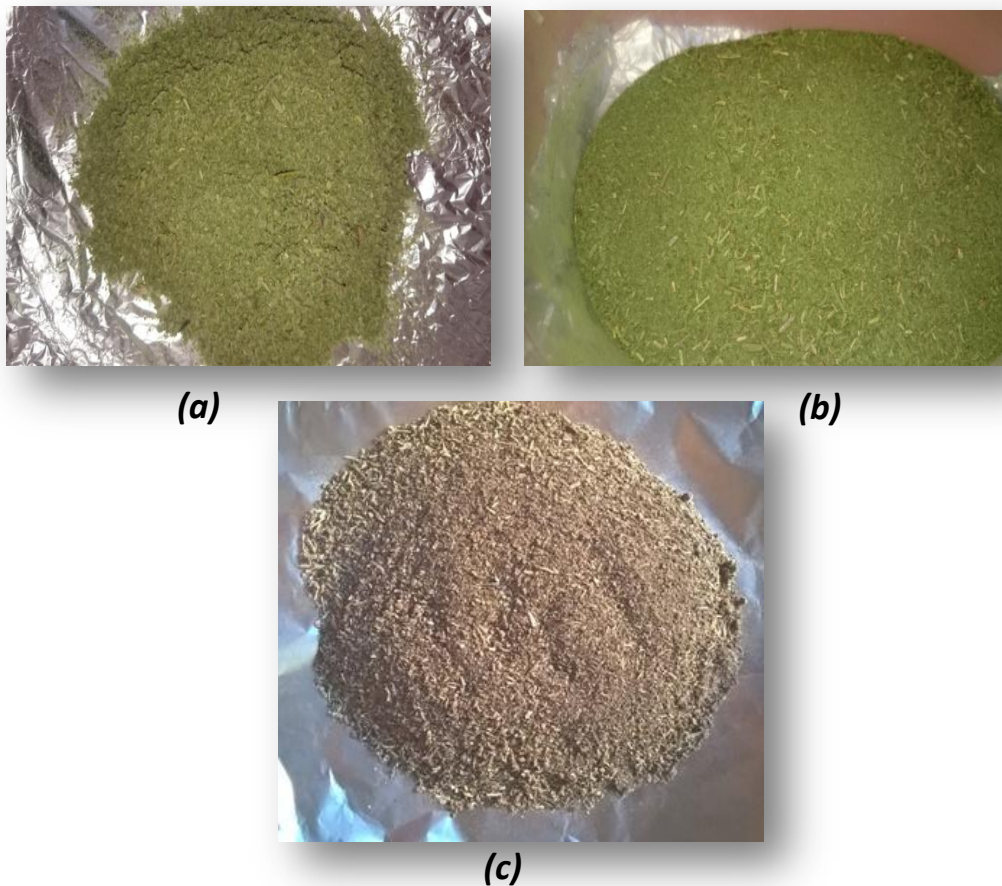


Figure 5 : Aspect des poudres des feuilles de *C. cheirifolium* (a), feuilles de *C. creticum* (b) et des racines de *C. cheirifolium* (c) (Photos originales).

II. Méthodes

Les différentes étapes réalisées pendant notre travail sont résumées dans le diagramme suivant (**Figure 6**) :

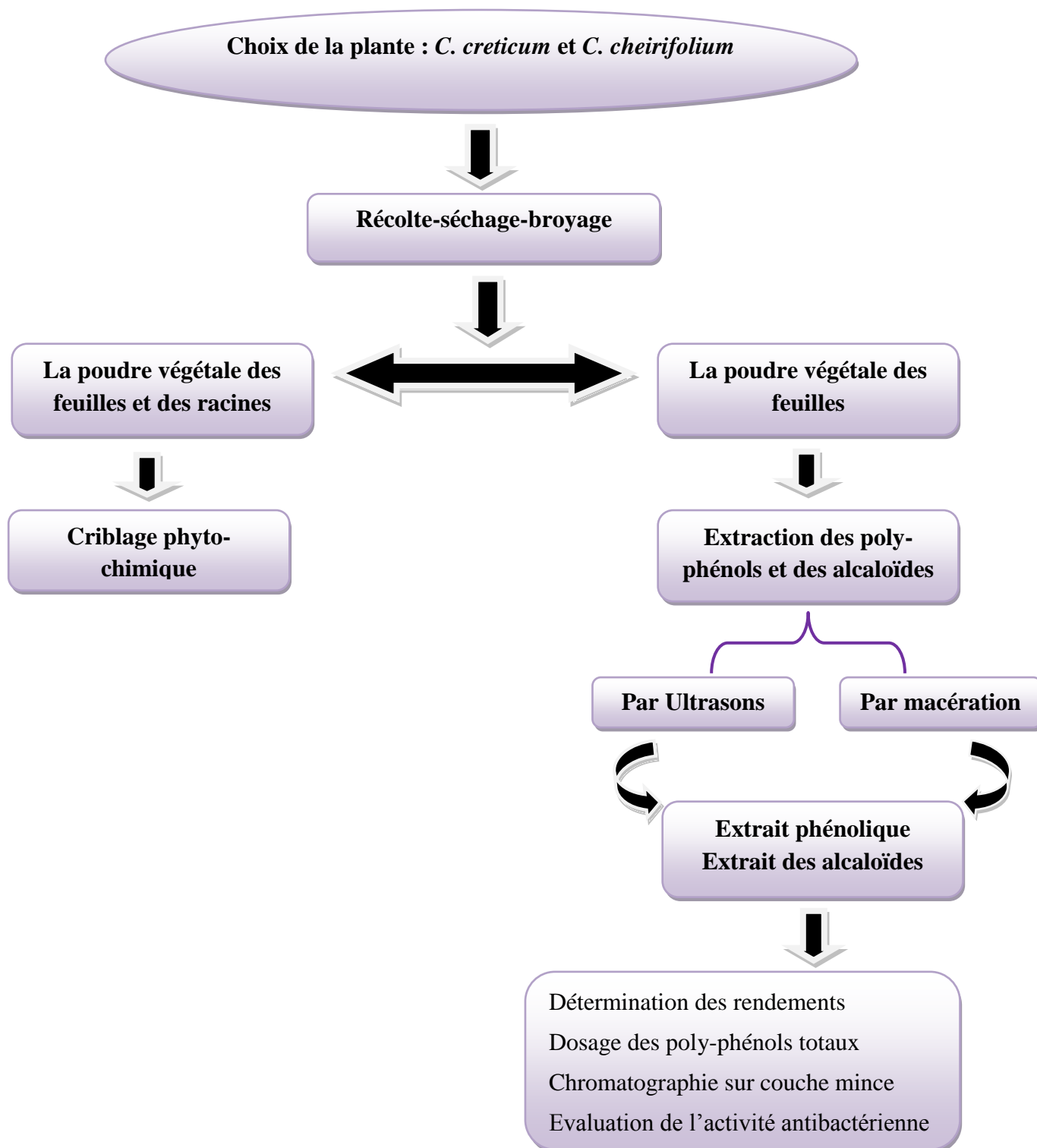


Figure 6 : Schéma général des différentes étapes du travail.

II.1. Screening phytochimiques

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Elles se basent sur des réactions chimiques qui permettent d'identifier la présence des substances chimiques (**Hamidi, 2013**). Les méthodes de caractérisation utilisées sont celles décrites par **Bruneton, (2009)**.

II.1.1. Préparation de l'infusé à 5%

Nous avons introduit 5g de la poudre séchée de chaque plante (feuilles, racines) dans 100ml d'eau distillée bouillante pendant 30 min puis nous avons filtrés la solution. Le volume final de filtrat doit être 100 ml ce qui indique qu'il faut laver la poudre avec de l'eau distillée chaude afin d'arriver au volume désiré.

- 1. Test des flavonoïdes :** ce test consiste à ajouter à 5ml d'infusé, additionner 5ml d'acide chlorhydrique concentré, un copeau de magnésium et 1ml d'alcool isoamilique. La réaction donne une coloration rouge orangé en présence des flavonoïdes.
- 2. Test des tanins :** à 5ml d'infusé rajouter quelques gouttes d'une solution de FeCl_3 à 5%, la réaction donne une coloration bleu noir en présence des tanins.
 - 2.2. Tanins catéchiques :** ce test consiste à additionner à 15ml d'infusé quelques gouttes d'une solution de chlorure de FeCl_3 à 5%. La réaction donne une coloration bleue noire en présences des tanins catéchiques.
 - 2.3. Tanins galliques :** à 5ml d'infusé, ajouter 2g d'acétate de sodium et quelque gouttes de FeCl_3 à 5%. La réaction donne une coloration bleue foncée en présence des tanins galliques.
- 3. Test des anthocyanes :** cette identification consiste à ajouter quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré à 5ml d'infusé à 5%. La réaction donne une coloration rouge en présence d'anthocyanes.
- 4. Test des mucilages :** on introduit 1ml de l'infusé dans un tube et on lui ajoute 5ml d'éthanol absolu, obtention d'une précipitation des flocons indique la présence des mucilages.
- 5. Test des saponosides :** les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse, leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2ml de l'extrait aqueux après

l'agitation, le mélange est abandonné pendant 20 minutes et la teneur en saponosides est évaluée.

- pas de mousse : test négatif.
- mousse moins de 1cm d'hauteur : test faiblement positif.
- mousse de 1 à 2 cm : test positif.
- mousse plus de 2 cm : test très positif.

6. Test des leucoanthocyanes : 2g de poudre végétale dans 20 ml d'un mélange de Propanol /acide chlorhydrique concentré (1/1 ; v/v) sont portés en bain Marie bouillant pendant quelques minutes. Une coloration rouge se développe en présence des leucoanthocyanes.

7. Test des dérivés anthracéniques

- **Préparation de l'extrait chloroformique :** dans un tube à essai, nous avons introduit 1g de poudre végétale et 10ml de chloroforme, ensuite nous avons procédé à un chauffage au bain Marie pendant 15 min puis on filtre et on complète le volume à 10ml avec du chloroforme.
- **Préparation de l'hydrolysate :** le résidu épuisé par le chloroforme est additionné de 10ml d'HCl concentré, après un chauffage au bain Marie bouillant pendant 15 min, nous avons refroidi la solution sous un courant d'eau et filtré. Le filtrat a été ajusté à 10ml avec de l'eau distillée.
- A l'extrait chloroformique nous avons ajouté une solution aqueuse de KOH à 10%. Après agitation, la présence des anthraquinones est confirmée par un virage de la phase aqueuse en rouge. Si le test est positif nous procédons à la recherche des composés suivants :

7.1. Les anthraquinones libres : dans un tube à essai, introduire 1ml de l'extrait chloroformique et 1ml de NH_4OH dilué au demi. La coloration plus au moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

7.2. Les anthracéniques combinés

- **Les O-hétérosides :** prélever 5ml d'hydrolysate et agiter avec 5ml de chloroforme. Après décantation de la solution, soutirer la phase organique et l'introduire dans un tube à essai puis ajouter 1ml de NH_4OH dilué. Leur présence est révélée par une coloration rouge plus ou moins intense.

- **Les O-hétérosides à génine réduite** : si la réaction précédente est négative ou faiblement positive, on recherche les O-hétérosides à génine réduite. Dans un tube à essai, introduire 5ml d'hydrolysate et 3 à 4 gouttes d'une solution de FeCl_3 à 10%. Le tout est porté au bain Marie à 90°C pendant 5 min puis refroidi sous courant d'eau. Agiter la solution avec 5 ml de chloroforme, soutirer la phase chloroformique et l'introduire dans un tube à essai. A celle-ci ajouter 1ml de NH_4OH dilué au demi puis agiter. En présence de produits d'oxydation des anthranols ou anthrones, on obtient une coloration rouge plus intense que précédemment.
 - **Les C-hétérosides** : reprendre la phase aqueuse qui a été conservée au cours de la caractérisation des O-hétérosides par 10ml d'eau distillée et ajouter 1ml d'une solution de FeCl_3 à 10%, maintenir le tube à essai dans un bain Marie pendant 30 min. Après refroidissement sous courant d'eau, agiter la solution avec 5ml de chloroforme. Soutirer la phase chloroformique et l'agiter avec 1ml de NH_4OH dilué. L'existence des C-hétérosides est confirmée par la coloration rouge plus ou moins intense.
- 8. Les coumarines** : 2g de poudre végétale, sont mis à ébullition dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 min dans un bain Marie puis filtrer. A 5ml de filtrat, rajouter 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH et quelque goutte d'HCl à 10%, la formation d'un trouble indique la présence des coumarines
- 9. Test des alcaloïdes** : 1g du matériel végétal est mélangé avec 5 ml d'une solution d'acide sulfurique à 10%. Le mélange obtenu est mis sous agitation pendant 24 h à température ambiante, ce mélange est ensuite filtré et le volume est complété avec de l'eau distillée à 5ml.
- 1ml du filtrat obtenu est placé dans deux tubes différents, puis 5 gouttes du réactif de Dragendorff sont ajoutées dans l'un des tubes et 5 gouttes de réactif de Mayer dans l'autre. L'apparition d'un précipité rouge orangé et blanc jaunâtre respectivement dans les tubes témoigne la présence des alcaloïdes.

II.2. Les méthodes d'extractions

II.2.1. Extraction des alcaloïdes par macération

L'extraction des alcaloïdes à partir de la poudre de feuilles des deux plantes étudiées a été réalisée selon la méthode de **Bruneton, (1999)**, basée sur la macération de la poudre végétale dans un milieu acide, suivie d'une extraction liquide-liquide.

- **Mode opératoire :** une quantité bien définie de la poudre de chaque plante sont laissés macérer séparément dans d'une solution d'acide chlorhydrique (1N) avec un rapport p/v ; 1/8, pendant 2h sous agitation magnétique. Après filtration à travers une passoire puis sur coton et papier filtre, la solution filtrée est transvasée dans une ampoule à décanter pour un dégraissage avec l'hexane, suivie d'une alcalinisation de la phase aqueuse par l'ammoniaque. La solution basique ainsi obtenue est extraite dans une ampoule à décanter avec un volume donnée de chloroforme. La solution organique obtenue est ensuite lavée à l'eau distillée puis évaporée à sec à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif (**Figure 7**).

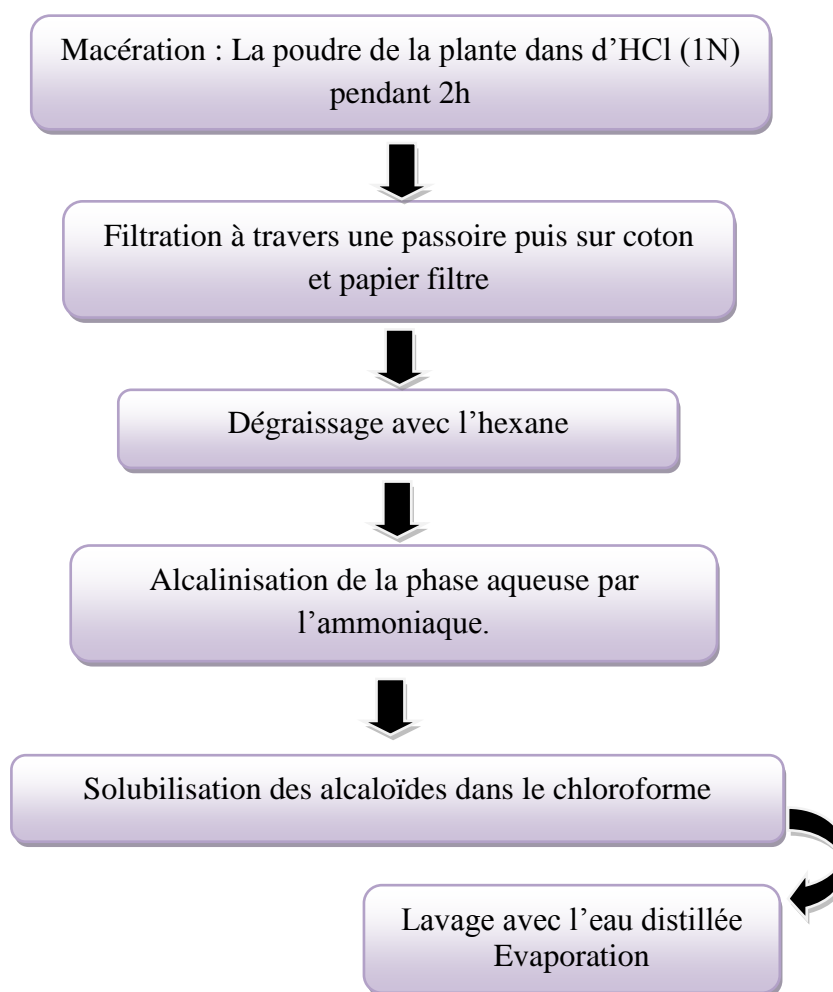


Figure 7: Les étapes d'extraction des alcaloïdes (**Bruneton, 1999**).

II.2.2. Extraction des poly-phénols par macération

Le principe de cette méthode repose sur l'extraction solide-liquide qui est une opération de séparation qui consiste à extraire un constituant solide d'une matrice qui en comporte plusieurs, en le transférant sélectivement vers une phase liquide. La procédure suivie est celle décrite par **Vuorela, (2005)** avec quelques modifications au niveau de l'étape délipidation.

- **Mode opératoire :** 30g de la poudre des deux plantes sont laissés macérer indépendamment dans 100ml de l'éthanol (ou méthanol) pendant 72h sous agitation magnétique. Après une filtration sur coton, le résidu est extrait pour la deuxième fois avec de l'éthanol (ou méthanol) pendant 24h à 48h. Les deux solutions ont été ensuite combinées et filtrées à travers le papier.

La solution filtrée est conservée à 4°C pendant une nuit, puis transvasée dans une ampoule à décanter afin d'éliminer les impuretés par lavage avec l'hexane. L'extrait éthanolique (ou méthanolique) est ensuite soumis à une évaporation à basse pression à 40°C, puis récupéré dans un pilulier et enfin laissé à l'air libre jusqu'à évaporation totale (**Figure 8**).

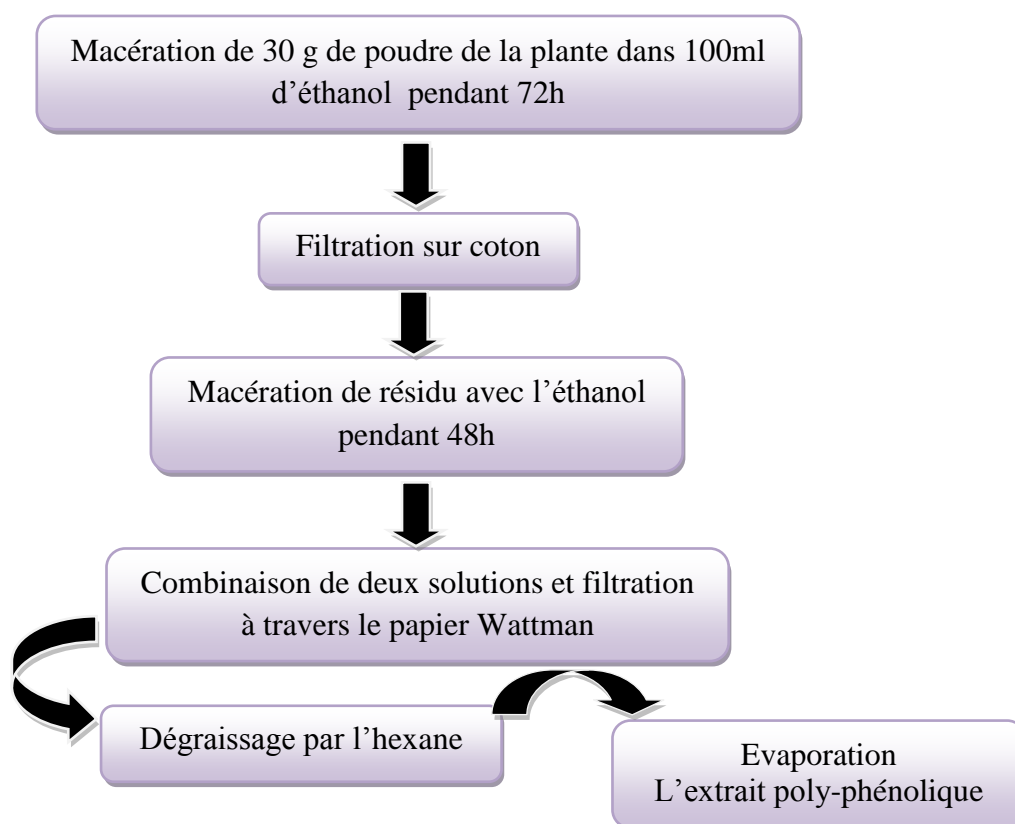


Figure 8 : Les étapes appliquées pour l'extraction des poly-phénols totaux (**Vuorela, 2005**).

II.3. Extraction mécanique

L'extraction assistée par ultra-sons (UAE, Ultrasonic Assisted Extraction) ou la sonication est une méthode simple, efficace et peu coûteuse (**Leandro, 2013**).

- **Principe** : les ultrasons sont des ondes vibrationnelles mécaniques de fréquence allant de 16 KHz à 1 GHz pouvant se propager dans les solides, les liquides et les gaz. La vibration se propage dans le milieu en transportant de l'énergie mécanique sous forme de rapides variations de pression. Le milieu de propagation de l'onde ultrasonore est soumis à une succession de compression et décompression provoquant la formation de bulles.

Lorsque les bulles de cavitation sont formées à proximité d'une surface solide, elles deviennent asymétriques, et l'implosion qui en résulte produit des jets de liquide projetés à très grande vitesse vers la surface du solide, ainsi qu'une augmentation locale de la température et de la pression. Dans le cas d'une matrice végétale, ces jets de liquides vont percer les parois végétales et permettre ainsi la libération des molécules dans le milieu liquide (**Figure 9**) (**Michel, 2011**).

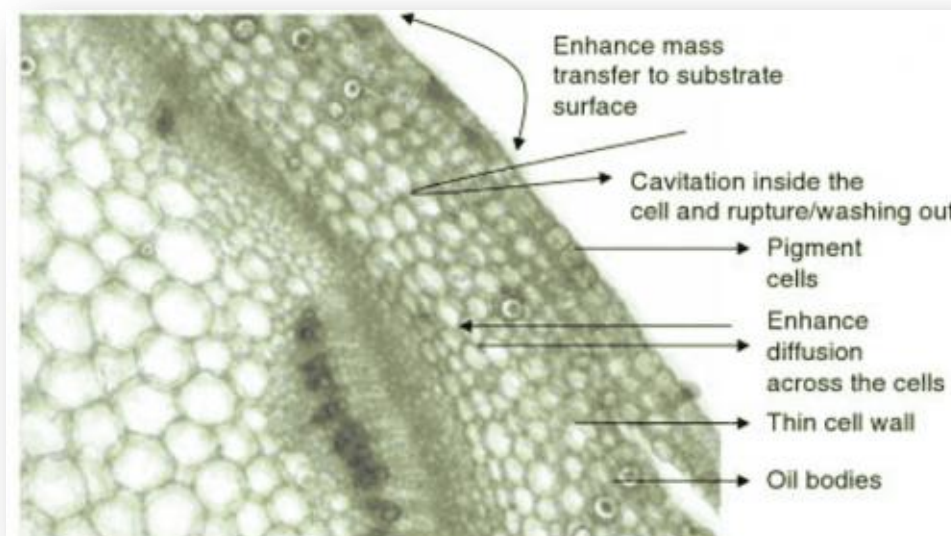


Figure 9 : Section transversale microscopique de tige apicale de menthe (*Mentha piperita*) montre le mécanisme des actions lors de l'extraction ultrasonique (Gx2000) (**Vilkhu et al., 2011**).

- **Mode opératoire**

Cette méthode a été réalisée pour une seule plante *C. cheirifolium* afin d'extraire les alcaloïdes uniquement. Cette extraction mécanique a été effectuée afin de comparer sa performance par rapport la méthode conventionnelle par macération.

Pour extraire les alcaloïdes de *C. cheirifolium*, la poudre des feuilles de la plante a été introduite dans un Erlenmeyers de 250ml additionnée de la solution d'HCl (1N), puis placée dans un bain à ultrasons (**Figure 10**).



Figure 10 : Extraction des alcaloïdes de *C. cheirifolium* par sonication (Bain à ultrasons).

L'influence du temps de sonication sur le rendement d'extraction des alcaloïdes a été étudiée en variant le temps d'exposition de la matière végétale aux ultrasons pendant 30 min, 60 min, 90 min et 120 min. Au total, 4 essais ont été lancés avec la même quantité de la plante introduits dans des Erlenmeyers comme déjà expliqué, on respectant le rapport solide/liquide. L'extraction a été conduite à la température ambiante. Après filtration, le filtrat obtenu pour chaque expérience est traité de la même manière que dans le cas de la macération.

II.4. Détermination des rendements en poly-phénols et en alcaloïdes

Le taux d'extraction ou le rendement des différents extraits obtenus est défini comme étant le rapport entre la masse des extraits bruts à l'état sec et celle de la matière végétale utilisée, il est calculé comme suit :

$$\text{Rendement (\%)} = [(p_1 - p_0) / p] \times 100$$

Avec :

- P : poids initial de l'échantillon (g) ;
- P₀ : poids du bécher vide (g) ;
- P₁ : poids du bécher après évaporation totale (g).

II.5. Dosage des poly-phénols totaux

- **Principe** : la concentration en poly-phénols a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de Folin-Ciocalteu (**Singleton *et al.*, 1965**). Ce réactif de couleur jaune est constitué par un mélange d'acide phospho-tungstique et d'acide phosphomolybdique. Lorsque les poly-phénols sont oxydés, ils réduisent le réactif de Folin-Ciocalteu en un complexe ayant une couleur bleue constitué d'oxyde de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés (**Boizot et Charpentier, 2006**).
- **Mode opératoire** : le dosage a été réalisé selon le protocole de **Talbi *et al.*, (2014)** avec quelques modifications. 2,5ml de réactif de Folin- Cioclateau (1/10) est ajouté à 0,5ml d'échantillon ou standard (préparés dans l'éthanol) avec des dilutions convenables. Après 2 min, 2ml d'une solution de carbonate de sodium sont additionnés au milieu réactionnel. Après 15 min d'incubation au bain Marie à 50°C. L'absorbance est mesurée à 760 nm. Le dosage a été réalisé en triplicata et les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écartype.
La concentration des poly-phénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique/g de la poudre (mg EAG/g de poudre).

II.6. Séparation des alcaloïdes et poly-phénols par CCM

- **Principe**

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des différents métabolites (**Seghiri, 2002**).

Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire qui peut être gel de polyamide ou gel de silice, fixée sur une plaque en verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon est déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (**Zaaror, 2012**).

- **Mode opératoire**

- *Phase stationnaire* : plaque de gel de silice fixé sur une feuille en plastique.
- *Phase mobile* : l'élution dans cette phase est répétée deux fois.

Plusieurs systèmes solvants ont été testés afin de fixer le meilleur système qui assure la séparation des extraits d'alcaloïdes (**Tableau IV**) et de poly-phénols (**Tableau V**) des deux plantes. Le choix du système est basé sur l'observation des plaques CCM après migration.

Tableau IV : Systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des alcaloïdes des deux plantes étudiées par CCM (**Chebili, 2012 ; Djouahra, 2012**).

Systèmes solvants	Composition (v/v)
S1	Chloroforme-méthanol-ammoniaque (85 :15 :1).
S2	Chloroforme-méthanol (4:1).
S3	Chloroforme- méthanol- ammoniaque (90:9 :1).
S4	Ether di-éthylique- méthanol- ammoniaque (44:5 :1).
S5	Chloroforme-méthanol- acide acétique (47,5:47,5:5).
S6	Chloroforme- acétone (9:1).
S7	Hexane- acétate d'éthyle (8:2).
S8	Chloroforme- acétate d'éthyle- acétone (5:4:1).
S9	Acétate d'éthyle- méthanol- eau distillée (77:13:10).

Tableau V : Systèmes solvants utilisés pour la migration et la séparation des poly-phénols des deux plantes étudiées par CCM (**Djouahra, 2012**).

Systèmes solvants	Composition (v/v)
S1	Acétate d'éthyle- méthanol-eau distillée (100 :13,5 :10).
S2	Butanol-acide acétique-eau distillée (4:1:5).
S3	Chloroforme-méthanol-eau distillée (1:1:0,5).

Préparation des extraits : une concentration de 9 mg/ml est préparée pour chaque extrait dans l'éthanol (soit pour les alcaloïdes ou pour les poly-phénols).

Révélation: La visualisation des plaques est faite par deux méthodes :

- **Physiques**: sous une lampe UV en utilisant deux longueurs d'onde : 365 nm et 254 nm.
- **Chimique** : par la suite les plaques sont exposées aux vapeurs d'ammoniaque afin de révéler les poly-phénols. Dans le cas des alcaloïdes, on réalise une pulvérisation directe du réactif de Dragendorff sur les plaques (**Zaaror, 2012**).

II.7. Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits

II.7.1. Microorganismes testés

Le nombre des souches bactériennes testées lors de notre étude est 7 souches qui sont fournies par Mr Boudjemaa K. (Laboratoire de Biochimie Appliquée, Département de Biologie, FS, Boumerdes). Quelques caractéristiques générales de ces bactéries sont présentées dans le **Tableau VI**.

Tableau VI : Caractéristiques générales des bactéries testées.

Nom de la souche	Références	Gram	Famille
<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	Négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC700603	Négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> M	ATCC43300	Positif	<i>Micrococcaceae</i>
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC10876	Positif	<i>Bacillaceae</i>
<i>Salmonella thyphimurium</i>	ATCC13311	Négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC43972	Négatif	<i>Enterobacteriaceae</i>
<i>Staphylococcus aures</i>	ATCC25923	Positif	<i>Micrococcaceae</i>

M : souche résistante à la méthicilline.

II.7.2. Test d'antibiogramme

C'est une technique très utilisée en bactériologie médicale, appelée également la méthode par diffusion en milieu gélosé ou encore méthode des disques. Plus le diamètre de la zone d'inhibition crée autour de la colonie bactérienne est grand, plus la souche est sensible à l'antibiotique ; par contre plus il est petit, plus la bactérie est résistante (**Herouini, 2015**).

Afin d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits d'alcaloïdes et de poly-phénols des deux plantes étudiées, on a appliqué les étapes suivantes :

- 1. Revivification et repiquage des germes** : les différentes espèces bactériennes ont été repiquées sur gélose nutritive en boîtes de Pétri (90 mm) par la méthode des stries, puis incubées à 37°C pendant 24h afin d'obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation d'inoculum.
- 2. Préparation de l'inoculum bactérien** : une parcelle de la colonie cible obtenu après revivification a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur puis homogénéisée avec 9ml

d'eau physiologique stérile dans un tube à essai. Des dilutions sont effectuées dans la même solution, jusqu'à avoir une densité microbienne de 10^8 UFC/ml (DO= 0,08 à 0,1 pour une longueur d'onde $\lambda = 625$ nm). Cette concentration a subi ensuite deux dilutions décimales afin d'atteindre une concentration finale de 10^6 UFC/ml.

- 3. Préparation des boîtes de Pétri :** la gélose de Muller Hinton stérile prête à l'usage a été coulée dans des boîtes de Pétri stériles. L'épaisseur de la gélose est de 4 mm répartie uniformément dans les boîtes. Ces dernières doivent être séchées pendant 24h à une température de 37°C avant leur utilisation.
- 4. Ensemencement :** les milieux de cultures préalablement préparés, sont ensemencés par étalement à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé de la suspension bactérienne déjà préparée. L'ensemencement s'effectue de telle sorte à assurer une distribution homogène des bactéries sur les milieux.
- 5. Préparation des disques :** des disques de papier Wattman de 6 mm de diamètre, stériles (120°C pendant 20 min par autoclavage), ont été chargés de l'extrait naturel à tester. En parallèle, on a utilisé des disques imprégnés d'éthanol qui vont servir de témoin négatif.
- 6. Antibiogramme :** sur chaque boîte de Pétri ensemencée, on a déposé après séchage, les disques contenant les différentes concentrations des extraits étudiés allant de 20µg/disque à 120µg/disque. Du même un disque témoin imprégné d'éthanol a été déposé dans les mêmes conditions.
- 7. Incubation :** les boîtes ont été mises à 4°C pendant 2h pour assurer la diffusion des extraits testés dans le milieu ensemencé, puis incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24h.

L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque disque. Un extrait est considéré actif lorsqu'on mesure une zone d'inhibition autour de disque dont le diamètre est supérieur à 7 mm et à l'intérieur du laquelle aucune croissance n'est observée.

En parallèle, des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton ont été ensemencées avec les sept souches bactériennes et testées pour leur sensibilité ou la résistance aux antibiotiques suivants: Tétracycline (TE30), Gentamicine (GEN10), Vancomycine (VA30), Céphalothine (CEP30), Chloramphénicol (C30), Amoxicilline (AMC30), Cefotaxime (CTX30).

Chapitre III
Résultats & Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1. Screening phytochimique

La première partie de notre étude consistait à détecter les différentes familles des composés existantes dans les deux parties, feuilles et racines, des deux plantes *C. creticum* et *C. cheirifolium*. Les tests appliqués sont basés sur des phénomènes de précipitation et/ou de coloration par des réactifs spécifiques à chaque famille de composé. Les résultats obtenus sont représentés dans le **Tableau VII**.

Tableau VII: Résultat du screening phytochimique de *C. creticum* et *C. cheirifolium* des deux parties feuilles et racines.

Organes	Composants	Résultats	
		<i>C. creticum</i>	<i>C. cheirifolium</i>
I. Feuilles	1. Poly-phénols		
	Flavonoïdes	++	++
	Coumarines	+	+
	Tanins totaux	+++	+++
	Tanins galliques	+++	+++
	Tanins catéchiques	+++	+++
	Anthocyanes	+	+
	Leuco-anthocyanes	-	-
	2. Saponosides	+	+
	3. Dérivés anthracéniques	-	-
	4. Alcaloïdes	++	++
	5. Mucilages	+	+
II. Racines	Coumarines	+	+
	Tanins totaux	+++	+++
	Tanins galliques	+++	+++
	Tanins catéchiques	+++	+++
	Anthocyanes	+	+
	Flavonoïdes	++	++
	2. Saponosides	+	+
	3. Dérivés anthracéniques	-	-
	4. Alcaloïdes	++	++
	5. Mucilages	+	+

(-) : Absence ; (+) : faible présence; (++) : Présence moyenne ; (+++) : Fort présence.

Il ressort de cette analyse que les feuilles et les racines des deux plantes *C. creticum* et *C. cheirifolium* possèdent presque la même composition en métabolites secondaires.

Dans les feuilles et les racines de ces plantes, la recherche des alcaloïdes, des poly-phénols, des saponosides et des mucilages a été positive. Mais, il faut signaler que ces deux derniers ainsi que les coumarines et les anthocyanes sont présents en faible quantité, alors qu'on a noté une absence totale des dérivés anthracéniques.

Suite à notre recherche bibliographique, on n'a pas trouvé des travaux publiés visant la détermination de la composition chimique de *C. creticum* à part deux articles qui portent sur les alcaloïdes pyrrolizidiniques de cette espèce (El Sahzly et Wink, 1996 ; Joshi *et al.*, 2016), tandis que les autres ont consacré l'objectif de leur étude sur la description botanique et la vérification de sa classification (Mathez, 1974 ; Bowe et Yatskievych, 2016).

Cependant Achour, (2014) a rapporté la présence des alcaloïdes, des saponosides et certains groupes des composés phénoliques retrouvés au niveau des feuilles et les racines de *C. cheirifolium*.

III.2. Détermination des rendements en alcaloïdes et poly-phénols

D'une manière générale, les teneurs en extraits secs varient non seulement d'une plante à une autre de la même famille mais également en fonction des paramètres de l'extraction solide-liquide des poly-phénols : la température, le solvant d'extraction, la taille des particules et le coefficient de diffusion de solvant (Bougandoura, 2011).

III.2.1. Les poly-phénols totaux

Les résultats obtenus après l'extraction par macération sont résumés dans la **Figure 11**. D'après ces données, on remarque que *C. cheirifolium* est plus riche en poly-phénols (2,098%) et qui correspond à 1,6 le rendement en même composé de *C. creticum*.

Puisque les conditions qui affecte le rendement d'extraction des métabolites d'une plante (le plus souvent : le temps de macération, la température, le solvant d'extraction,...) (Su *et al.*, 2006), sont les mêmes pour les deux espèces, on déduit que cette différence est induite par la composition des feuille de la plante utilisée.

Du fait que le rendement en poly-phénols totaux des feuilles de *C. cheirifolium* est plus élevé à celui de *C. creticum*, nous avons choisi la première espèce pour réaliser une autre expérience avec le méthanol afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction en gardant les autres conditions de macération fixes. Les résultats obtenus montrent que le méthanol permet d'augmenter le rendement en poly-phénols extraits avec un facteur de 0,874.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par plusieurs auteurs (**Telli *et al.*, 2010; Bourgou *et al.*, 2012 ; Khorman, 2013 ; Khenfer, 2016**).

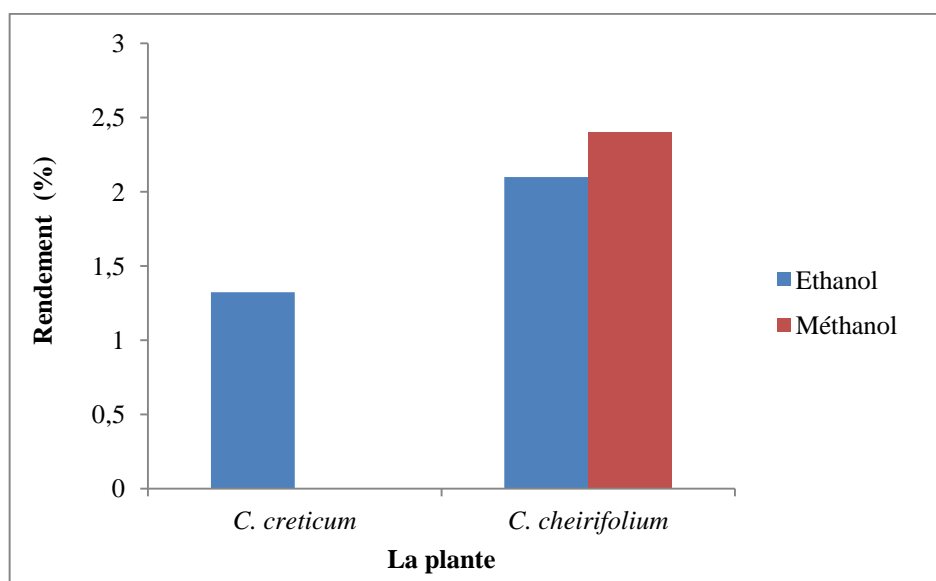


Figure 11 : Les rendements en poly-phénols totaux des feuilles des deux plantes.

Une étude a été réalisée par **Boussoualim, (2014)** sur l'extraction des poly-phénols de l'espèce *Anchusa azurea* de la même famille que les cynoglosses (*Boraginaceae*) par différents solvants, montre que l'extrait méthanolique donne un meilleur rendement ($7,58 \pm 0,21\%$) par rapport les autres solvants ce qui confirme nos résultats.

Selon **Chinos *et al.*, (2007)** un rapport de 70% de méthanol au minimum est nécessaire pour inactiver les poly-phénols-oxydases, des enzymes intervenant dans l'oxydation des poly-phénols, ce qui conduit au phénomène de brunissement. Donc l'utilisation du méthanol comme solvant d'extraction permet d'améliorer l'extraction des poly-phénols par l'inhibition de ces enzymes.

A la fin on peut dire que les calculs des rendements permettent non seulement d'apprécier les extraits totaux issus de chaque espèce, mais également d'envisager la quantité d'organe à prélever en cas de besoin.

III.2.2. Les alcaloïdes

Selon les résultats de l'extraction par macération des alcaloïdes (**Figure 12**), on constate que le rendement de *C. creticum* est 2,271 celui de *C. cheirifolium* en alcaloïdes.

Selon **Paris et Moyes, (1971)**, on peut considérer la plante étudiée, comme une plante à alcaloïdes, si le rendement d'extraction est supérieur à 0,01%. Donc, nos résultats se

concordent avec la littérature, où c'est connu que les espèces de la famille des *Boraginaceae* sont des plantes à alcaloïdes, mais sans la présence des données sur les rendements en alcaloïdes pour les deux espèces étudiées dans notre cas (malgré que c'est connu que *C. creticum* est une plante riche en alcaloïdes ce qui confirme nos résultats).

Selon la disponibilité des plantes étudiées, nous avons choisi de poursuivre notre étude sur la poudre de *C. cheirifolium* afin de tester l'efficacité d'une autre méthode mécanique d'extraction, la sonication dans l'extraction des alcaloïdes et comparer les rendements avec celui obtenu par la macération.

L'extraction par sonication en utilisant le même solvant (l'eau acidifiée) a été conduite en variant le temps d'exposition aux ultrasons de 30 min à 120 min avec un intervalle de 30 min. Les résultats obtenus sont indiqués dans la **Figure 13**.

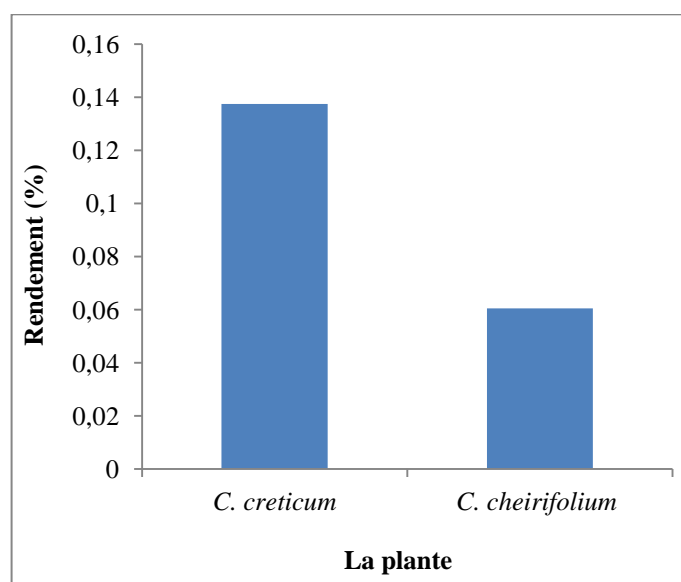


Figure 12: Rendement d'extraction des alcaloïdes par macération de deux plantes (feuilles).

D'après les résultats obtenus, on remarque que le rendement d'extraction des alcaloïdes augmente en fonction de temps d'exposition aux ultrasons où il atteint un maximum après 1 h avec un rendement de 0,105%, mais au-delà de cette période on observe une diminution qui est expliquée par la dégradation des alcaloïdes sous l'effet des ultrasons (**Chebili, 2012**).

D'après les résultats obtenus, on déduit que la sonication de 1 h donne un meilleur rendement par comparaison à la macération dont le rendement obtenu par cette dernière est de 0,0605% après une durée d'extraction de 2 h, ce qui correspond à une augmentation de 1,735 fois.

En plus, on constate que le rendement obtenu après 30 min par sonication (0,061%) est mieux que le rendement obtenu par macération pendant 2h, ce qui nous permet de conclure que la sonication est la méthode d'extraction la plus performante dans l'extraction des alcaloïdes selon les conditions expérimentales appliquées.

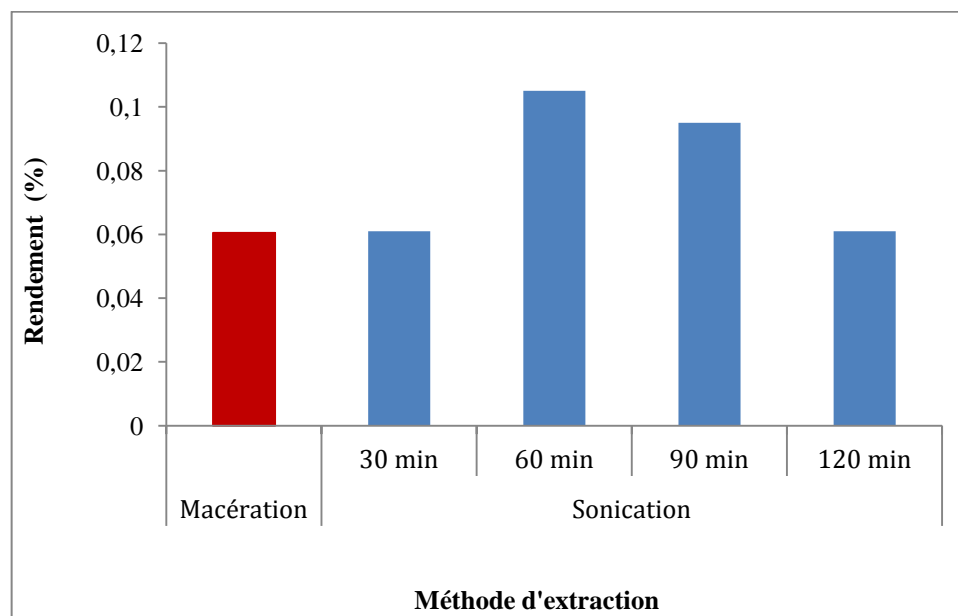


Figure 13 : Rendement en alcaloïdes de *C. cheirifolium* selon la méthode d'extraction.

III.3. Dosage des poly-phénols totaux

Une étude comparative en poly-phénols totaux a été faite grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec l'acide gallique comme standard préparé à différentes concentrations (Voir Annexe 1). Les résultats obtenus sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique/g de la poudre, en utilisant l'équation de la régression linéaire de la courbe d'étalonnage.

Malgré la sensibilité et la simplicité de la méthode de Folin-Ciocalteu, elle n'est pas spécifique des poly-phénols. En effet, le réactif peut réagir avec des protéines, des sucres réducteurs, l'acide ascorbique et des composés soufrés (Singleton *et al.*, 1999).

Les résultats de dosage (Figure 14) indiquent que les feuilles de *C. cheirifolium* sont plus riches en poly-phénols totaux que celles de *C. creticum* avec un facteur de différence de 2,2 ; ce qui confirme les résultats des rendements déjà obtenus.

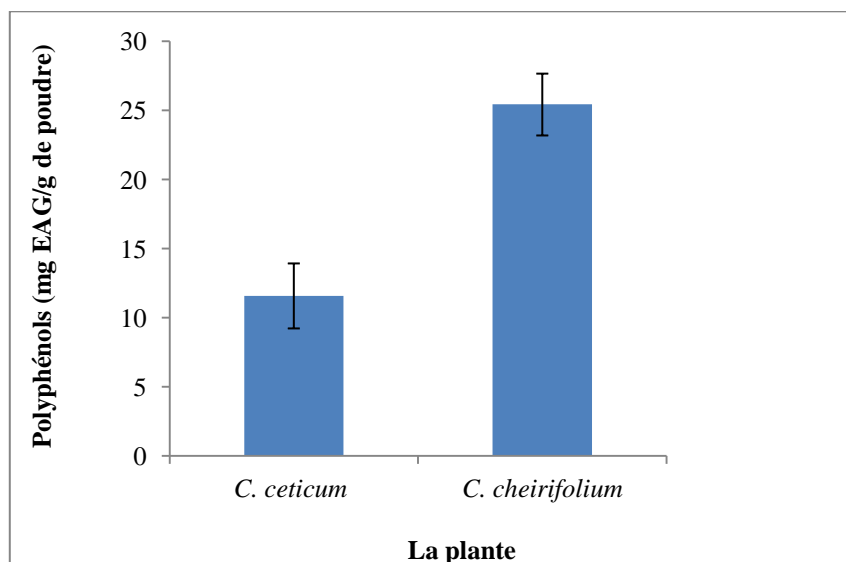


Figure 14 : Teneur en poly-phénols des feuilles des deux plantes étudiées.

Cette variation quantitative de contenu poly-phénolique entre les deux plantes peut être liée aux facteurs génétiques (puisque les deux plantes sont actuellement classées dans deux genres différents), climatiques ou environnementaux (la zone géographique, la sécheresse, le sol et les maladies). La période de la récolte et le stade de développement de la plante peuvent également influencer la teneur en phénols totaux (**Lee et Coll, 2003 ; Ebrahimi et coll, 2008**). Mais puisque on ne dispose pas de données dans la littérature sur les teneurs en poly-phénols des deux plantes étudiées, donc on ne peut pas favoriser un facteur par rapport à l'autre afin d'expliquer cette différence.

Nos résultats pour les deux plantes sont supérieurs à ceux trouvés par **Bentabet, (2015)** dont le dosage des poly-phénols de l'espèce *Echium vulgare* (famille de *Boraginaceae*) montre que l'extrait hydrométhanolique de la plante renferme une concentration de l'ordre de $741,8 \pm 0,25$ mg EAG/100g de matière sèche.

Du même, par comparaison aux résultats de dosage des poly-phénols totaux publiés par **Boussoualim, (2014)** concernant toujours la partie aérienne de l'espèce *Anchusa azurea* Mill (famille de *Boraginaceae*) montre que l'extraits méthanolique renferme une concentration de $7,58 \pm 0,21$ μ g EAG/mg d'extrait, est plus faible par rapport à nos concentrations.

III.4. Séparation des poly-phénols et des alcaloïdes par CCM

Nous avons soumis nos extraits à une analyse qualitative par chromatographique sur couche mince dans le but est d'estimer le nombre des principes actifs dans chaque extrait.

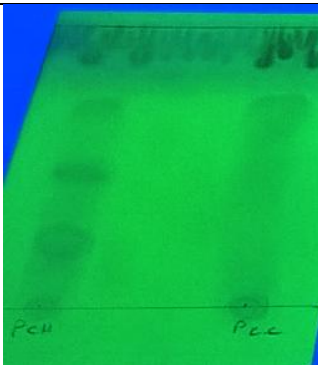
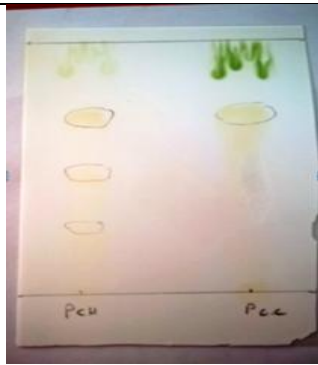
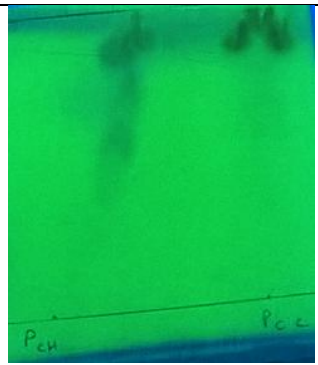
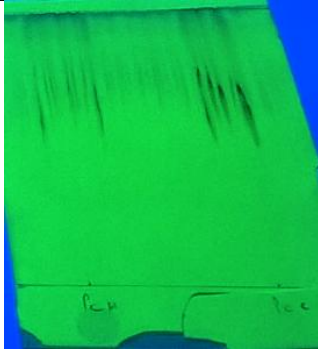
L'extrait de chaque plante a été déposé à des points précis, à 1cm du bord inférieur de la plaque. Après le développement du chromatogramme et lorsque le front du solvant d'éluion a atteint la ligne supérieure, la plaque a été retirée, séchée et examinée sous la lampe UV à 254 nm suivi d'une révélation chimique afin d'avoir une identification du nombre de constituants présents.

III.4.1. Les poly-phénols

D'après les résultats obtenus des mini-CCM (**Tableau VIII**) nous avons choisi le système S1 comme la meilleure phase mobile pour la séparation des poly-phénols en se basant sur l'observation sous UV et après révélation. Les taches dans les plaques CCM révélées avec l'ammoniaque sont bien remarquables et significatives des poly-phénols. On n'a pas traité les deux autres plaques vue la mauvaise migration obtenue.

Pour la séparation de l'extrait poly-phénolique de l'espèce *C. cheirifolium* sur CCM on remarque la présence de 3 taches importantes qui signifie la présence de trois types de poly-phénols différents mais pour l'extrait de *C. creticum* une seule tache est observée après l'action de l'ammoniaque qui signifie la présence d'un seul type de poly-phénols majoritaire puisque on a noté d'autres bandes très claires.

Tableau VIII : Résultats des mini-CCM pour la séparation des poly-phénols des deux plantes.

Système	Révélation sous l'UV à 250 nm	Révélation par l'ammoniaque
S1		
S2		
S3		

Pch : poly-phénols de *C. cheirifolium*; Pcc : poly-phénols de *C. creticum*.

Une autre séparation des poly-phénols sur plaque CCM a été réalisée afin de confirmer les résultats déjà obtenus dont la révélation a été effectuée en plus par lampe UV à 365 nm (**Figure 15**).

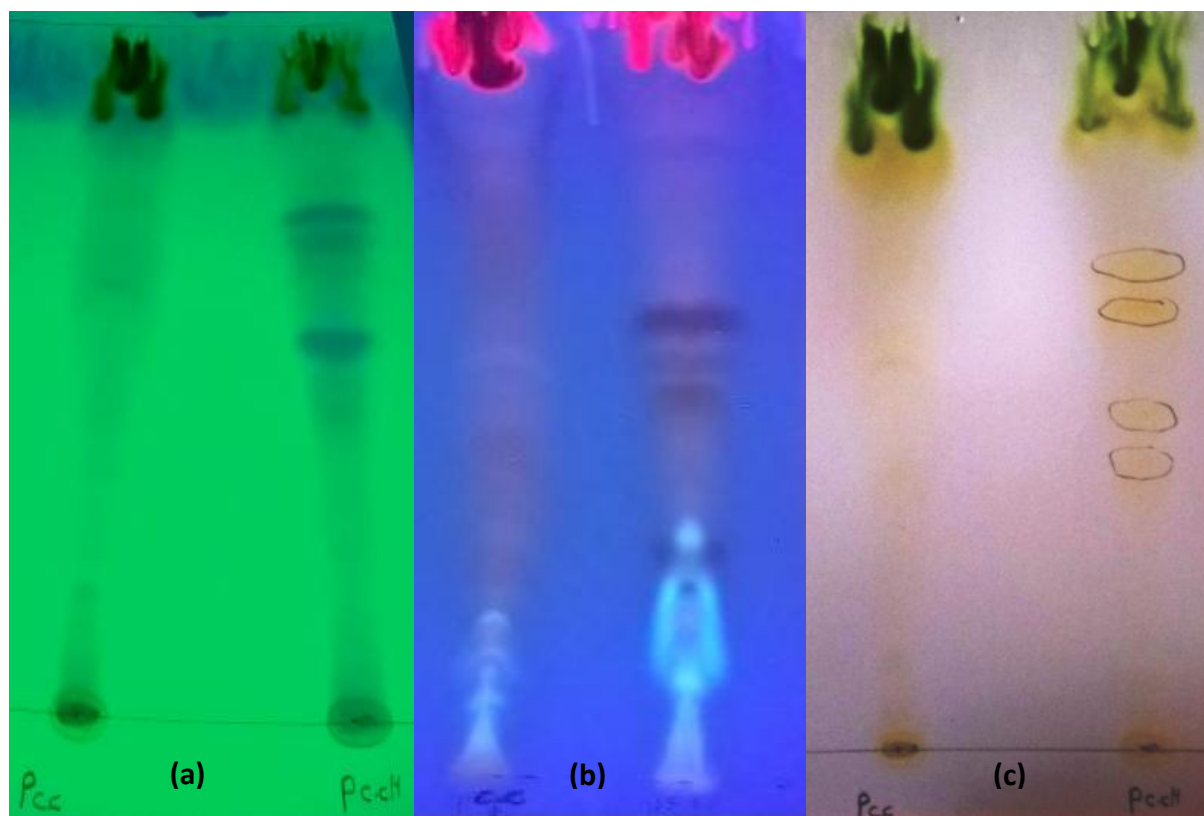


Figure 15 : Révélation des plaques CCM après migration des extraits de poly-phénols des feuilles de *C. creticum* (Pcc) et *C. cheirifolium* (PccH) : avec la lampe UV 254 nm (a), lampe UV 365 nm (b) et après l'action de l'ammoniaque (c).

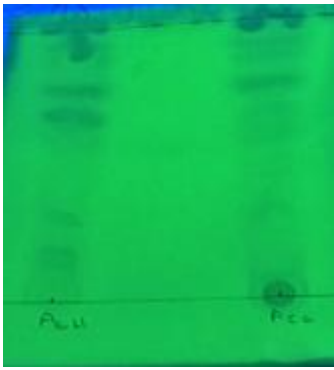
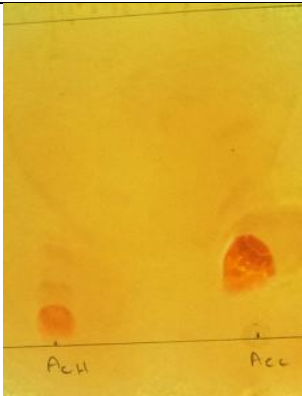
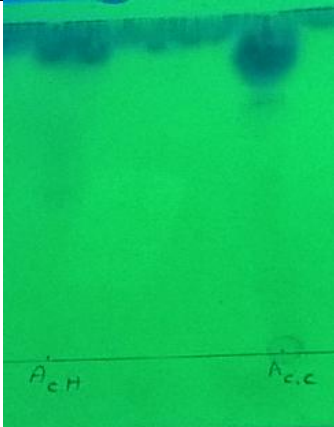
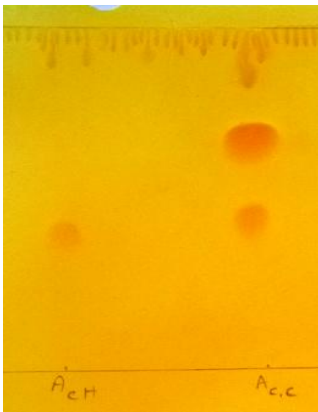
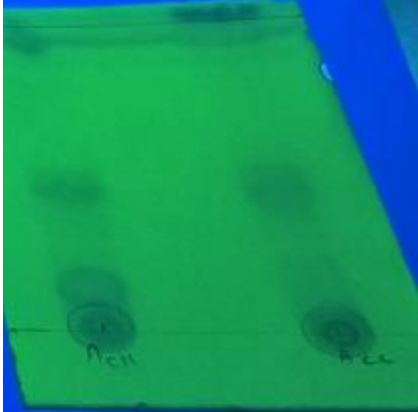
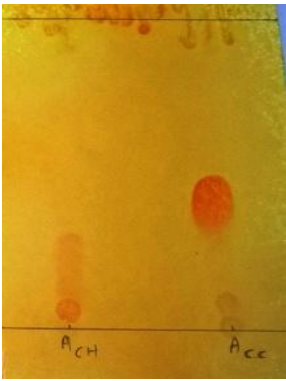
On remarque la détection de 4 taches très repérées par les différentes méthodes de révélation au niveau de l'extrait des poly-phénols spécifique à *C. cheirifolium*. Par contre, on n'a pas obtenu une observation visible dans le cas des poly-phénols de la deuxième plante, qui est expliquée probablement par la faible concentration de poly-phénols dans l'extrait de *C. creticum* et qui a influé sur la quantité de l'extrait déposé sur la plaque pour la migration.

III.4.2. Les alcaloïdes

Les résultats de séparation des alcaloïdes (*C. creticum* et *C. cheirifolium*) par les différents systèmes solvants sont visualisés sous le lompe UV à 254 nm puis révélés par le réactif de Dragendorff dont le choix de meilleur système est basé sur cette réaction spécifique.

Les résultats avec les trois systèmes (S3, S5 et S6) qui assurent la migration des alcaloïdes sont représentés ci-dessous (**Tableau IX**) alors que les résultats des autres systèmes sont répertoriés dans l'Annexe 1.

Tableau IX: Résultats des mini-CCM pour la séparation des alcaloïdes des deux plantes extraits par macération.

Système	Révélation sous l'UV à 254 nm	Révélation par Dragendorff
S3		
S5		
S6		

A_{cH} : Alcaloïdes de *C. cheirifolium*; A_{cc} : Alcaloïdes de *C. creticum*.

Selon les photos représentées au niveau du tableau XII, on observe que les trois systèmes assurent la migration des alcaloïdes des deux extraits, mais c'est le système solvant S5 qui assure la meilleure séparation avec la détection de deux bandes (dont l'une est majoritaire) pour l'extrait de *C. creticum* et une seule bande dans le cas d'extrait de *C. cheirifolium*.

L'observation sous UV à 254 nm ne permet pas de révéler les taches des alcaloïdes de façon spécifique comme le réactif de Dragendorff, dont la majorité des cas soit les bandes observées ne correspondent pas aux alcaloïdes (système S3) soit aucune bande n'est révélée par cette lumière (système S5).

Après le choix de système solvant nous avons réalisé deux CCM, la première pour comparer entre les bandes des deux extraits de *C. creticum* et celui de *C. cheirifolium* puisque les mini-CCM déjà réalisées n'assurent pas cet objectif, la deuxième est lancée pour les extraits obtenus par sonication de *C. cheirifolium* afin de révéler l'effet des ultrasons sur l'extraction (**Figure 16**).

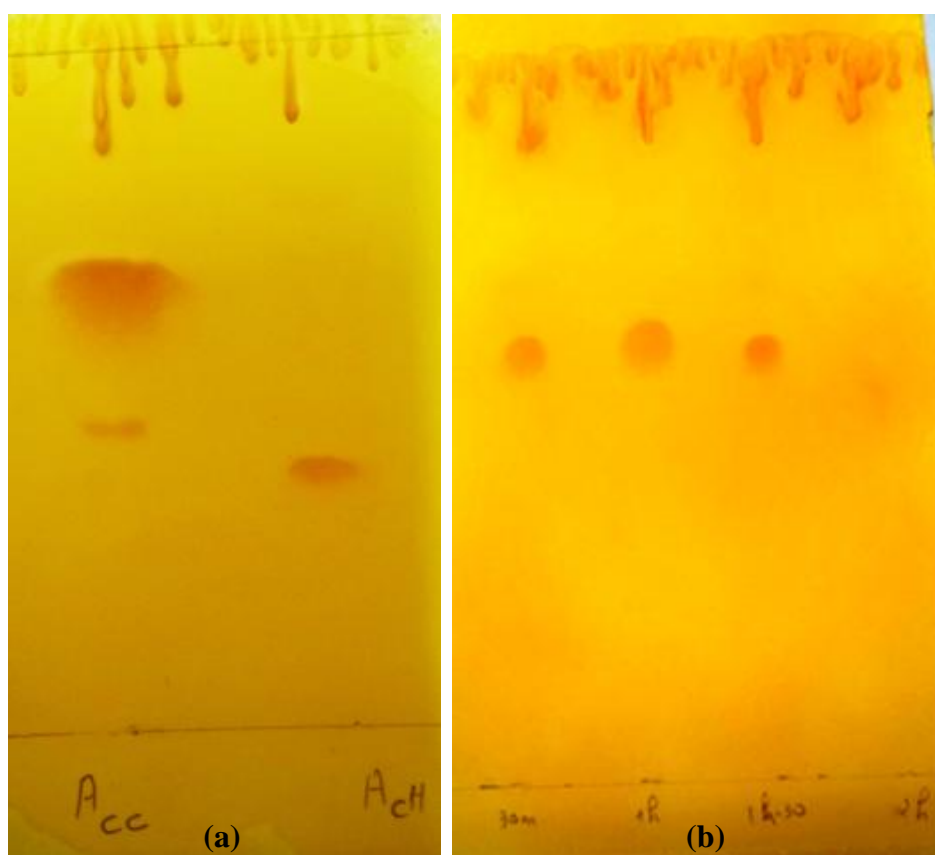


Figure 16 : Séparation par CCM des extraits d'alcaloïdes de *C. cheirifolium* obtenus par macération (a) et par sonication (b).

Les taches rouge-orange dans les plaques CCM révélées avec le système Dragendorff sont bien remarquables et significatives des alcaloïdes.

D'après la **figure 16-a**, on observe la présence de deux taches pour l'espèce *C. creticum* qui signifie la présence probablement de deux types ou plus d'alcaloïdes dont une tache est très importante (qui correspondent à une seule molécule ou un mélange dont le

système solvant n'assure pas la séparation). Pour l'espèce de *C. cheirifolium*, une seule tache est observée sur la plaque, ce qui signifie la présence d'un seul type d'alcaloïde séparé par notre système de choix.

Du fait que les niveaux de migration (R_f) des taches après révélation au Dragendorff sont différents, on peut déduire que la composition des feuilles des deux plantes en alcaloïdes est différente.

On remarque la présence d'une seule tache après la migration des extraits d'alcaloïdes de *C. cheirifolium* obtenus par sonication (**Figure 16-b**), ce qui confirme les résultats des mini-CCM de macération. L'effet de la sonication est très clair sur la plaque CCM, dont le rendement augmente en fonction du temps où la tache qui correspond à l'extrait d'une 1 h est plus importante que celle de 30 min et de 90 min. Par contre, on remarque l'absence totale d'une bande au niveau de l'extrait de 2 h de sonication probablement causée par la faible concentration des alcaloïdes spotée sur la plaque ou le rendement déduit ne correspond pas aux alcaloïdes puisque avec le même rendement on a obtenu une tache claire pour l'extrait de 30 min, ce qui confirme notre hypothèse de la dégradation des alcaloïdes par les ultrasons si on augmente le temps d'extraction.

III.5. Evaluation de l'activité antibactérienne

Face aux problèmes de la résistance bactérienne aux antibiotiques synthétiques, beaucoup de travaux ont été menés sur le pouvoir antimicrobien des produits naturels d'extraits des plantes.

Pour la deuxième partie de notre étude, nous avons testé l'action des quatre extraits d'alcaloïdes et des poly-phénols des deux plantes étudiées sur quelques souches bactériennes. En parallèle, nous avons testé l'effet des antibiotiques vis-à-vis de ces souches.

Les résultats obtenus indiquent que deux souches bactériennes montrent une sensibilité aux extraits de *C. creticum* ; par contre les extraits de *C. cheirifolium* ne présentent aucun effet sur les sept souches bactériennes testées. Les résultats de la sensibilité aux extraits de *C. creticum* sont représentés dans le **Tableau X** et la **Figure 17**.

Tableau X : Détermination des zones d'inhibition obtenues avec les extraits de *C. creticum*

Souche	La concentration de l'extrait ($\mu\text{g}/\text{disque}$)	Diamètre de la zone d'inhibition	
		Alcaloïdes	Poly-phénols
<i>Salmonella</i> <i>thyphimurium</i>	80	/	/
	100	/	/
	120	9mm	8mm
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>M</i>	80	/	/
	100	/	7mm
	120	/	8mm

7, 8,9 : légèrement inhibitrice ; (/) : Non inhibitrice.










Figure 17 : Exemple sur les zones d'inhibition obtenues, cas des poly-phénols de *C. creticum* sur *Staphylococcus aureus M*.

- **Résultats d'antibiogramme avec des antibiotiques synthétiques**

L'antibiogramme a pour but de prédire la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques. Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques (Tony et Paul, 1997), les mesures de celles-ci sont présentées dans le **Tableau XI**.

Tableau XI : Détermination de la zone d'inhibition des antibiotiques vis-à-vis des souches bactériennes testées.

Souches	Antibiotiques	Diamètre d'inhibition	Photographie des résultats
<i>Salmonella thyphimurium</i> ATCC13311	Tetracycline	10mm	
	Chloramphenicol	30mm	
	Gentamicin	23mm	
	Vancomycin	/	
	Cephalothin	/	
	Amoxiclav	/	
	Cefotaxine	15mm	
<i>Salmonella enterica</i> ATCC43972	Tetracycline	15mm	
	Chloramphenicol	30mm	
	Gentamicin	22mm	
	Vancomycin	/	
	Cephalothin	/	
	Amoxiclav	/	
	Cefotaxine	/	
<i>Staphylococcus aureus M</i> ATCC43300	Tetracycline	22mm	
	Chloramphenicol	30mm	
	Gentamicin	25mm	
	Vancomycin	20mm	
	Cephalothin	27mm	
	Amoxiclav	/	
	Cefotaxine	10mm	

<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	Tetracycline	/	
	Chloramphenicol	27mm	
	Gentamicin	35mm	
	Vancomycin	21mm	
	Cephalothin	/	
	Amoxiclav	/	
	Cefotaxine	/	
<i>E. coli</i> ATCC25922	Tetracycline	>25mm	
	Chloramphenicol	>25mm	
	Gentamicin	>25mm	
	Vancomycin	>25mm	
	Cephalothin	>25mm	
	Amoxiclav	>25mm	
	Cefotaxine	>25mm	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC700603	Tetracycline	>25mm	
	Chloramphenicol	>25mm	
	Gentamicin	>25mm	
	Vancomycin	>25mm	
	Cephalothin	>25mm	
	Amoxiclav	>25mm	
	Cefotaxine	>25mm	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	Tetracycline	>25mm	
	Chloramphenicol	>25mm	
	Gentamicin	>25mm	
	Vancomycin	>25mm	
	Cephalothin	>25mm	
	Amoxiclav	>25mm	
	Cefotaxine	>25mm	

Pour nos extraits dont les zones d'inhibition variant entre 7 et 9 mm, les résultats obtenus indiquent :

- ✓ Une sensibilité de la souche Gram⁺ *Staphylococcus aureus* M (ATCC43300) aux poly-phénols de l'espèce *C. creticum* à partir d'une concentration de 100µg/disque par contre elle est résistante à l'extrait d'alcaloïdes de la plante. Cette souche est sensible pour tous les antibiotiques testés sauf l'Amoxiclav.
- ✓ Egalement, la souche Gram⁻ *Salmonella thyphimurium* ATCC13311 présente certaines sensibilités à la concentration la plus élevée (120µg/disque) en alcaloïdes et poly-phénols de *C. creticum*. Par contre, la bactérie présente une résistance pour trois antibiotiques notamment la Vancomycin, Cephalothin et l'Amoxiclav.
- ✓ Les autres bactéries (*E. coli* ATCC25922, *Klebsiella pneumoneae* ATCC700603, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ATCC25923, *Salmonella enterica* ATCC43972) ne présentent aucune sensibilité pour les 4 extraits.

Les résultats révèlent des réponses variables en fonction des souches et du type de l'extrait testé où la sensibilité ou la résistance aux antibiotiques n'a aucun rapport avec celle des extraits.

Selon **Loziene et al., (2006)**, l'activité antibactérienne dépend de plusieurs facteurs à savoir : l'espèce de la plante, la préparation de l'extrait et la sensibilité des bactéries.

L'activité antibactérienne des poly-phénols d'*Anchusa Azurea* Mill (famille de *Boraginaceae*) qui sont extraits par chloroforme et l'acétate d'éthyle sont les plus actifs sur la plupart des bactéries testées (3 souches de Gram⁻ : *E. coli* ATCC25922, *Salmonella thyphimurium* ATCC1331, *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 et 2 souches de Gram⁺, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC10876) dont le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 8 et 11 mm par rapport à l'extrait de poly-phénols à base de méthanol (**Boussoualim, 2014**).

Une étude a été réalisée par **Achour, (2014)** sur l'activité antibactérienne d'extrait aqueux et éthanolique de l'espèce *C. cheirifolium* de la région de Tlemcen montre que des souches Gram⁺ (*Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* ATCC11778) et des Gram⁻ (*Klebsiella pneumoniae* ATCC27853, *E. coli* ATCC25922), présentent une sensibilité aux extraits dont le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 8 et 10 mm.

Une étude réalisée par **Tarle et al., (1982)** suggère la présence de substances à activité antimicrobienne dans les extraits méthanoliques obtenus à partir des feuilles de la consoude :

Symphytum officinale (famille de *Boraginaceae*) et qui sont capables d'inhiber la culture de trois microorganismes : *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* et *Candida nomosa* (**Recurt-Carrere, 2015**).

A partir de ces données, on conclut que les espèces de la famille de *Boraginaceae* ne possèdent pas une bonne activité antimicrobienne, ce qui indique que nos résultats se concordent avec les travaux déjà réalisés.

Plusieurs études ont mis en évidence la grande sensibilité des bactéries Gram⁺ par rapport aux Gram⁻ à l'action des antibiotiques et des extraits naturels des plantes médicinales (**Koné et al., 2004; Hayouni et al., 2007; Turkmen et al., 2007; Shan et al., 2007; Falleh et al., 2008**) qui est attribuée à la différence de la composition des parois des bactéries selon le type Gram.

Les bactéries Gram⁻, indépendamment de la membrane des cellules, possèdent une couche additionnelle, la membrane externe, qui se compose des phospholipides, des protéines et des lipo-polysaccharides. Cette membrane est imperméable à la plupart des molécules. Néanmoins, la présence des porines dans cette couche permettra la diffusion libre des molécules avec une masse moléculaire en-dessous de 600 Da.

Cependant, l'inhibition de la croissance des bactéries Gram⁻ a été rapportée, particulièrement en combinaison avec les facteurs qui peuvent déranger l'intégrité de la cellule et/ou la perméabilité de la membrane, telle que les basses valeurs du pH et les concentrations accrues en NaCl (**Georgantelis et al., 2007**).

Conclusion

Conclusion et Perspectives

Le présent travail a été lancé dans le but d'étudier les propriétés phytochimiques et biologiques de deux plantes médicinales : *C. creticum* et *C. cheirifolium* qui appartiennent à la même famille des *Boraginaceae* choisies sur la base de leurs usages traditionnels dans la région de Bouira.

La première partie de notre étude a été consacrée dans l'identification de la nature des différents principes chimiques contenus dans les feuilles et les racines des deux plantes, en se basant sur les réactions chimiques de criblage phytochimique. Il s'agit essentiellement des poly-phénols et des alcaloïdes avec la présence faible de saponosides, mucilages, coumarines et des anthocyanes.

La deuxième étape correspond à des expériences d'extraction des alcaloïdes et des poly-phénols à partir de la poudre des feuilles des deux plantes par macération en utilisant l'éthanol comme solvant d'extraction. Nous avons constaté à partir des calculs de rendements que *C. cheirifolium* est plus riche en poly-phénols (2,098%) par rapport à *C. creticum* (1,323%), tandis que c'est l'inverse dans le cas des alcaloïdes (0,1374% pour *C. creticum* par rapport à 0,0605% pour *C. cheirifolium*). L'utilisation du méthanol à la place d'éthanol dans la macération permet d'améliorer le rendement en poly-phénols extraits des feuilles de *C. cheirifolium* avec un facteur de 0,874.

La comparaison de deux méthodes d'extraction des alcaloïdes de la partie aérienne de *C. cheirifolium*, révèle que la sonication pendant 1 h de la matière végétale dans le même solvant d'extraction que la macération, assure le meilleur rendement (0,105%) par rapport à la macération pendant 2 h (0,0605%), dont l'augmentation du temps de sonication provoque la diminution du rendement en alcaloïdes.

En troisième lieu, on a trouvé que le dosage des poly-phénols totaux des extraits éthanoliques de deux plantes réalisés par le réactif de Folin-Ciocalteu, confirme les résultats des rendements calculés, où l'extrait de *C. cheirifolium* est plus concentré en poly-phénols avec une valeur de $25,424 \pm 2,235$ mg EAG/g de la poudre par comparaison à l'extrait de *C. creticum* ($11,586 \pm 2,35$ mg EAG/g de la poudre).

L'analyse qualitative par des chromatographies sur couche mince de gel de silice, réalisées après la détermination des meilleurs systèmes solvants pour la migration et la séparation des alcaloïdes et poly-phénols (effectuée par des mini-CCM); indique que :

- L'extrait de poly-phénols de *C. cheirifolium* comporte quatre bandes, détectées par les différentes méthodes de détection, alors celui de *C. creticum*, une seule bande a été observée après révélation à l'ammoniaque.
- La révélation des plaques CCM dans le cas des extraits d'alcaloïdes, montre que *C. creticum* est plus riche en alcaloïdes avec l'apparition de deux taches dont l'une est majoritaire. Tandis que, on a observé une seule bande dans l'extrait d'alcaloïdes de la deuxième plante avec un Rf différent, ce qui nous permet de conclure que la composition des feuilles de deux plantes en alcaloïdes est totalement différente.
- L'effet de la sonication sur l'extraction des alcaloïdes de *C. cheirifolium* a été élucidé grâce aux CCM réalisées, où on a confirmé que le meilleur rendement est obtenu après 1 h d'extraction et que l'augmentation du temps de sonication provoque la destruction des molécules en question.

La dernière étape de notre travail, a visé l'évaluation de l'activité antibactérienne des quatre extraits obtenus sur sept souches bactériennes référenciées selon la méthode de diffusion sur gélose. Les expériences effectuées montrent que seulement deux bactéries qui sont sensibles à l'action des extraits d'alcaloïdes et de poly-phénols de *C. creticum*, alors aucune sensibilité n'a été obtenus avec les deux extraits spécifiques à *C. cheirifolium*.

Pour conclure cette étude préliminaire, qui devra être complétée par d'autres travaux, nous suggérons de :

- Tester l'effet de la sonication sur l'extraction des poly-phénols totaux et comparer les rendements avec ceux obtenus avec la macération afin de choisir la meilleure méthode ;
- Evaluer le pouvoir antioxydant et l'activité antifongique des extraits d'alcaloïdes et de poly-phénols.
- Analyser les extraits obtenus par des méthodes plus performantes telles que l'HPLC, CPG-SM, pour déterminer la composition exacte et les teneurs en principes chimiques des extraits de deux plantes *C. creticum* et *C. cheirifolium* afin de confirmer les résultats obtenus.
- En dernier, l'extraction des huiles essentielles de la partie aérienne des deux plantes et évaluation de leurs activités biologiques.

*Références
Bibliographiques*

Références Bibliographiques

Abedini A. (2013). Evaluation biologique et phytochimique des substances naturelles d'*Hyptis atrorubens* Poit. (*Lamiaceae*), sélectionnées par un criblage d'extraits de 42 plantes. Thèse de doctorat, Université Lille 2 (France), 210.p.

Achour A. S. (2014). Criblage phytochimique, activité antioxydante et antibactérienne de la *Cynoglossum cheirifolium* (ouednine eljadienne). Mémoire de master, Université d'Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), 77p.

Anonyme (2003). Weed Management Guide – Blue Hound's Tongue – *Cynoglossum creticum*. CRC for Australian Weed Management and the Commonwealth, Department of the Environment and Heritage, Canberra, Australia, ISBN 1-920932-22-4.

Anonyme (2007). Conservation Management Network-Supporting landholders with native vegetation - A good season for bests, 7p.

Anonyme (2011). Guide illustré de la Flore Algérienne, W. d'Alger & Mairie de Paris, N° ISBN : 978-2-7466-4242-3, 95p.

Attard E. and Pacioni P. (2012). The phytochemical and in vitro pharmacological testing of Maltese Medicinal Plant, In *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, Edited by Prof. Iraj Rasooli. Ed In Tech, 93-112. Downloaded from: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine>

Badiaga M. (2011). Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea latifolia* Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali. Thèse de doctorat. Université de Bamako (Mali), 184p.

Barbier and Mathez. (1973). En fonction des antécédents. *Candollea* 28:306 Edition : librairie Moderne, Presse Med 1999, 195p.

Beddou F. (2015). Etude phytochimique et activités biologiques de deux plantes sahariennes *Rumex vesicarius* L. et *anvillea radiata* Coss. & Dur. Thèse de doctorat, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen), 164p.

Belda A., Zaragoza B., Belda I., Martinez J. and Seva E. (2013). Traditional knowledge of medicinal plants in the Serra de Mariola Naturel Park, South-Eastern Spain, *Afr. J. Tradit Complement Altern Med*, 10: 299-309.

Benamar H. (2016). Isolement et caractérisation d'inhibiteurs naturels de l'acétylcholinestérase. Thèse de doctorat, Université Ahmed Ben Bla (Oran), 325p.

- Benhamza L. (2008).** Effets biologiques de la petite Centauree *Eryhraea Centaurium (L) pers.* Thèse de doctorat, Université de Mentouri (Constantine), 266p.
- Bentabet Lasgaa N. (2015).** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux plantes *Fredolia arteioide* et *Echium vulgare* de l'ouest algérien. Thèse de doctorat, Université Abou Beker Bekkaide (Tlemcen), 126p.
- Boizot N. et Charpentier P. (2006).** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*, pp : 79-82.
- Bouakline R. (2015).** Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la plante locale : *Fumaria capreolata (L)*. Master académique, Université M'hamed Bougara (Boumerdès), 59p.
- Boudjouref M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris L.* Mémoire de magister, Université Ferhat Abbas (Sétif), 99p.
- Bougandoura N. (2011).** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèce végétale *Saturejaca la minthasspnepta* (nabta) et *ajugaiva L.* (chendgoura) de l'ouest d'Algérie. Mémoire de Magister, Université Abou bakr belkaid (Tlemcen), 125p.
- Boukri N. (2014).** Contribution à l'étude phytochimique des extraits bruts des épices contenus dans le mélange Ras-el-hanout. Mémoire de master, Université Kasdi Merbah (Ouargla), 99p.
- Bourgou S., Serairi Beji R., Medini F. and Ksouri R. (2012).** Effet du solvant et de la méthode d'extraction sur la teneur en composés phénoliques et les potentialités antioxydantes d'*Euphorbia helioscopia*. *Agriculture et biotechnologie*, 28p.
- Boussoualim N. (2014).** Activités biologiques de plantes médicinales *Anchusa azurea Mill.* et *Globularia alypum L.* Thèse de doctorat, Université de Ferhat Abbas (Sétif), 136p.
- Bowe L. M. and Yatskievych G. (2016).** *Cynoglossum creticum* in North America, *LUNDELLIA*, 19: 39-46.
- Bremer K., Bremer B. and Thulin M. (2003).** Introduction to Phylogeny and Systematics of Flowering Plants. *Uppsala University, Stockholm*, 102p.
- Bruneton J. (1999).** Phytochimie et plante médicinale. *J. pharmacognosie*. 3^{ème} Ed Lavoisier, Paris, 1120p.
- Brunton J. (2009).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 4^{ème} Ed Lavoisier, Paris, 1288p.
- Cabalion P. (1990).** Les substances naturelles végétales, leur intérêt biologique, leurs perspectives d'application. *Industrie Mulhouse*, 4 : 58-69 .

- Chebili S. (2012).** Extraction et caractérisation des alcaloïdes quinolizidiniques de *Cytisus triflorus* l'Hérit et l'étude de leurs activités antimicrobienne et antioxydante, 95p.
- Cheurba M. (2015).** Intérêt des biomolécules d'origine végétale sur la santé. Thèse de doctorat, Université Hassiba Ben bouali (Chlef), 102p.
- Delahaye T., Lequay A. et Prunier P. (2002).** Les découvertes botaniques de nos sociétaires en 2001. Départ./Région : 73, Bulletin de la Société Mycologique et Botanique de la Région Chambérienne, 1, N°7, pp : 28- 32.
- Djouahra D., (2012).** Alcaloïdes et polyphénols d'*Haplophyllum tuberculatum* (Forssk) : effet antimicrobien. Mémoire de Magister, Université de M'Hamed Bougara (Boumerdes), 110p.
- Ebrahimi N. S., Hadin J., Mirjalili M. H., Sonaboli A. and yousefzadi M. (2008).** Essentiel oil composition and antibactérien activity of *Thymus caramaniars* at différent phonological stages. *Food chemistry*, 110 : 927-931.
- Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray B., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C. (2008).** Phenolic composition of *Cynara cardunuculus* L. organs and their biological activities. *C. R. Biologies*, 331: 372-379.
- Gandini C. (2016).** Etude phytochimique d'une plante médicinale péruvienne *Cordia lutea* Lam. ayant démontré une activité biologique contre la bactérie *Helicobacter pylori*. Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier, 93p.
- Georgantelis D., Ambrosiadids I., Katikou P., Blekas G. and Georgakis A. (2007).** Effect of rosemary exact, chitoson and lipid oxidation of frechpork sausages stored at 4°C. *Meat Science*, 76:172-181.
- Gontier E. (2008).** Effets de l'environnement sur la croissance et l'accumulation de métabolites secondaires chez *Datura innoxia* Mill. Cultivé en conditions hors sol ; impact des facteurs biotiques et abiotiques. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de lorraine, 211p.
- Hamidi A. (2013).** Etude phytochimique et activité biologique de la plante *Limoniastrum guyonianum*. Mémoire de magister, Chimie organique, Université Kasdi Merbah (Ourgla), 111p.
- Hayouni A. E; Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M. (2007).** The effects of solvent and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. *Fruit extracts. Food. chem.*, 4: 45-58.

- Herouini A., Keassi A and Ould el hadj M. D. (2015).** Etude de l'activité biologique des extraits aqueux d'*Euphorbia guyoniana* (Euphorbiaceae) récoltée dans Oued Sebseb (Sahara Algérien). *Biologie*, 8: 15-25.
- Joshi K., Mehra D., Kumar N., Bisht M. and Sharma D. K. (2016).** *Cynoglossum* L.: A review on phytochemistry and chemotherapeutic potential. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5 (4): 32-39.
- Kebbab R. (2014).** Etude du pouvoir antioxydant des poly-phénols issus des margines d'olives de la variété Chamlal : Evaluation de l'activité avant et après déglycosylation. Mémoire de magister, Université Mouloud Mammeri (Tizi-Ouzou), 116p.
- Kebili Z. (2016).** Contribution à l'étude de quelques activités biologiques des extraits d'*Ephedra alata* de la région d'Ouargla. Mémoire de magister. Université Kasdi Merbah (Ouargla), 102p.
- Khater F. (2011).** Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse des composés phénoliques .Thèse de doctorat, Ecole doctorale (France), 198p.
- Khenfer S. and Medjouel M. (2016).** Optimisation des conditions d'extraction des composés phénoliques d'une plante médicinale de la région sud du Sahara Algérien. Mémoire de master, Université Kasdi Merbah (Ourgla), 99p.
- Kholkhal F. (2014).** Etude Phytochimique et activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de *Thymus ciliatus* ssp *coloratus* et ssp *eucliliatus*. Thèse de doctorat, université Abou bekr Belkaid, 164p.
- Koné W. M., Kamanzi Atindehou K., Terreaux C., Hostettmann K., Traoré D. and Dosso M. (2004).** Traditional medicine in Northe Cote –d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *Ethnofarmacol*, 93: 43-93.
- Krief S. (2003).** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : surveillance sanitaire et observations de l'alimentation de chimpanzés (pan troglodytes Schweinfurth) en Ouganda : activités biologiques et étude chimique de plantes consommées. Thèse de doctorat, 343p.
- Lamarck Candolle (1815).** Flore française ou descriptions succinctes de toutes les plantes qui croissent naturellement en France, 636p.
- Lanzelotti P. (2011).** Les alcaloïdes des miels. *Universidad Nacional de Luján*, 145 :14-15 .
- Le Centre technique de coopération agricole et rurale. (2007).** Les plantes médicinales. Les États du Groupe ACP (Afrique, Caraïbes, Pacifique) et les pays membres de l'Union européenne. 07/3:1.

- Leandro Galvan A. (2013).** Eco-procédés pour la récupération sélective d'antioxydants à partir d'*Aronia melanocarpa* et ses co-produits. Thèse de doctorat, Université Lille 1, 198p.
- Lee K. W., Kin J., Lee H. G. and Lee C. Y. (2003).** Cacao has more phenolic phytochemicals and a higher antioxydant capacity than teas and red wine. *Food chemistry*, 51 : 7292-7295.
- Michel M. (2011).** Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification: Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*). Thèse de doctorat, Université D'Orléans, 289p.
- Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture et Organisation mondiale de la santé. (2011).** Document de travail sur les alcaloïdes de pyrrolizidine. 86p.
- Owen P. and Johens T. (1999).** Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 149-160.
- Paris R. et Moyes H. (1971).** Matière médicale, Tome III. Ed. MASSON & C, Paris, 185p.
- Recurt- Carrere A. (2015),** La grande consoude. Sciences pharmaceutiques, Thèse de doctorat, Université Paul sabatier, 116p.
- René H., Robert E. et Claude L. (2004).** Physiologie végétale1. Nutrition. 6^{ème} Edition, Paris, 323p.
- Schmelzer H. et Gurib F. (2008).** Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(1). Plantes médicinales1 fondation Prota/Backhuys Publishers/CTA Wageningen, Pays-Bas, pp : 847-866.
- Seghiri R. (2002).** Recherche et détermination structurale des métabolites secondaires du genre *Centaurea*: *C. africana*, *C. nicaensis*. Thèse de doctorat, Université Mentouri (Constantine), 93p.
- Shan B., Cai Y., Brooks J. D. and Corche. (2007).** The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of microbiologie*, 117: 112-119.
- Singleton., Vernon L., Rudol.O., Rosa M. and Lamuel R. (1974).** Analysis of total phenols and other oxidation substances and antioxidants by means of folin ciocalteau. *Methodes in enzymologie*, 299 : 152-178.
- Su X., Duan J., Jian Y., Shi J. and Kakuda Y. (2006).** Effect of soaking conditions on the antioxidant potentials of oolong tea. *J. Food Composition Anal.*, 19: 348-353.
- Talbi H., Boumaza A., El-Mostafa K., Talbi J. and Hilal A. (2014).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical

composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L.). *Mater. Environ. Sci*, 6 (4) : 1111-1117.

Tarle D., Petritic J., and Kupinic M. (1982). Antimicrobial activity of common comfrey.

Telli A., Mahboub N., Boudjeneh S., Siboukeur O. E. K. et Moulti Mati F. (2010). Optimisation des conditions d'extraction des poly-phénols de dattes lyophilisées (*Phoenix dactylifera* L) Variété ghars. *Sciences Biologiques et Agronomiques*. pp : 107-114.

Tiwari S. (2008). Plants: a rich source of herbal medicine, *Journal of Natural Products*, 1: 27-35.

Tony H. et Paul S. (1997). Atlas de poche de microbiologie. 1^{ère} Ed Médecine-sciences Flammarion, Paris, 313p.

Turkmen N., Velioglu Y. S., Sari F. and Polat G. (2007). Effect of extraction conditions on measured total polyphenol contents and antioxidant and antibacterial activities of Black Tea. *Molécules*, 12: 484-496.

Vilkhu K., Manassé R., Mawson R. et Tremblay M. (2011). Ingrédients ultrasoniques de récupération et de modification de l'alimentation. Dans : Feng, Barbosa-Canovas, Weiss : Technologies ultrasons pour l'alimentation et les bioprocédés. Springer, New York, pp : 345-368.

Wiedenfeld H. and Edgar J. (2011). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochemistry Reviews*, 10: 137–151.

Zaaror B. (2012). Etude phyto-chimique de quelques extraits obtenus de la plante *Matricaria pubescens* (Astéracées) et évaluation de leur activité antioxydante. Mémoire de Master, Université Kasdi Merbah (Ourgla), 66p.

Zeghouane H. (2014). Essai de caractérisation phytochimique des extraits de quelques plantes médicinales du Sahara septentrional Est- Algérien. Mémoire master académique, Université Kasdi Merbah (Ouargla), 54p.

Annexes

Annexes I

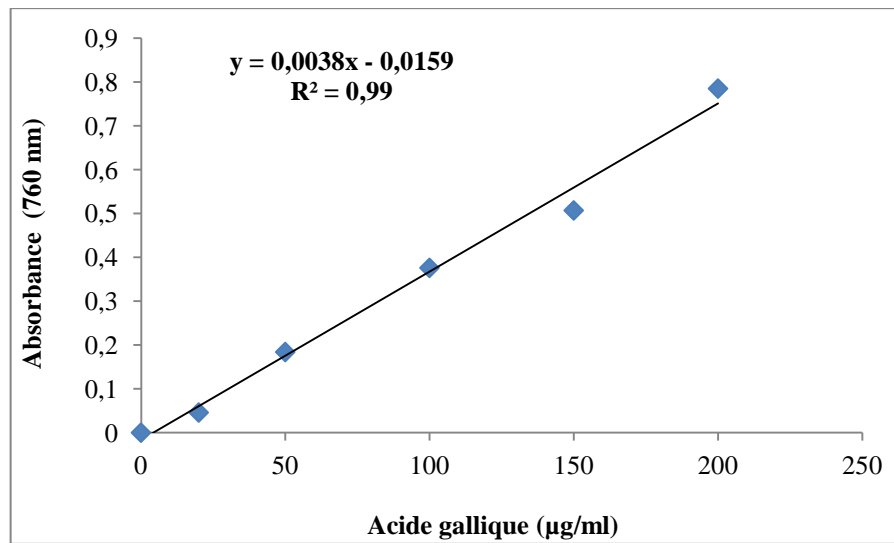
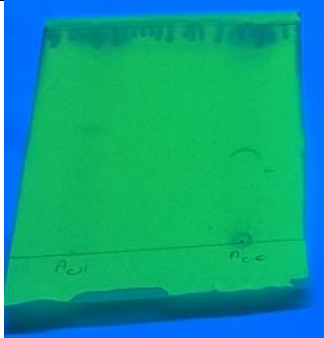
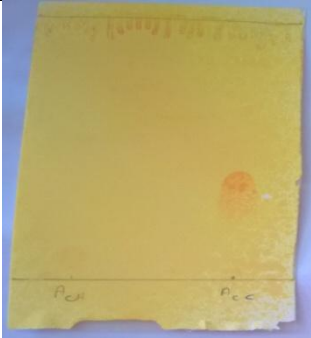
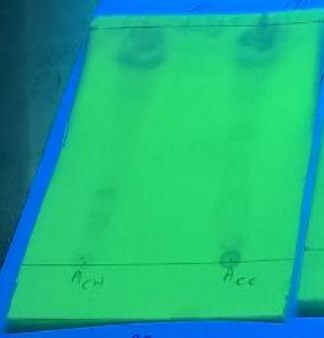

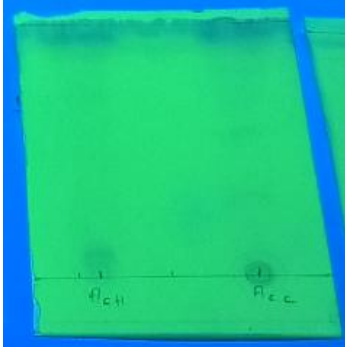

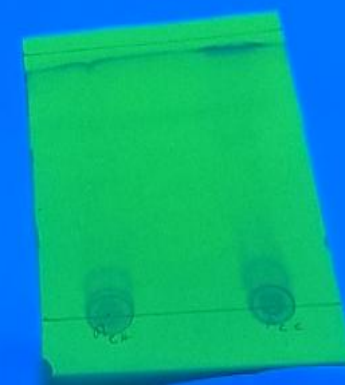
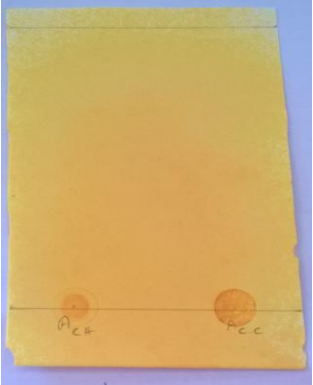
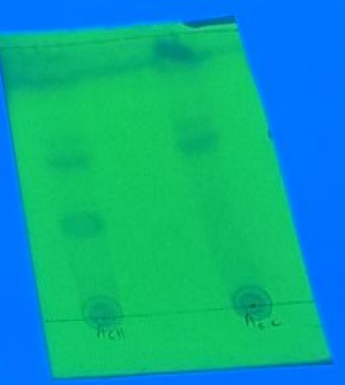
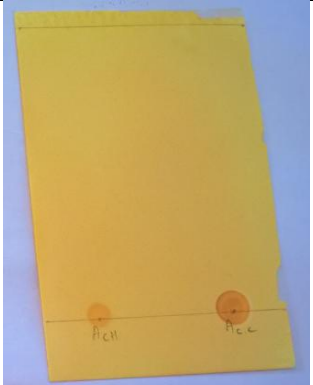
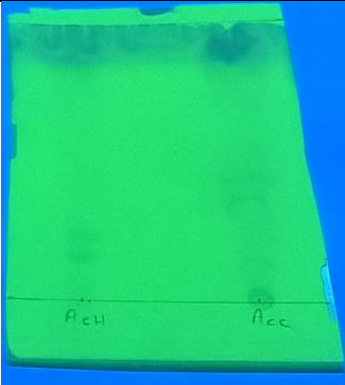



Figure A.1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

Tableau A.I : Les résultats des autres systèmes solvants pour les mini-CCM des extraits alcaloïdes des deux plantes (les feuilles).

Système	Révélation sous l'UV à 254 nm	Révélation par Dragendorff
S1		
S2		

S4		
S7		
S8		
S9		

Annexes 2

Quelques données sur les bactéries étudiées

- ***Escherichia coli*** : Bacille aérobie et Gram négatif que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud.
- ***Klebsiella pneumoniae*** : Bacille aéro-anaérobie, immobile et Gram négatif qui fait partie de la flore intestinale et peut être responsable d'infections urinaires et respiratoires.
- ***Staphylococcus aureus*** : Cocci à Gram positif, de forme sphérique, avec un diamètre de 0,8 à 1µm. Elles sont regroupés en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Ce type de bactéries sont immobiles, asporulés, habituellement sans capsule. Elles sont responsables d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires et sa résistance aux antibiotiques est parfois un grand problème pour le traitement des patients.
- ***Staphylococcus aureus M***: résistante à l'antibiotique spécifique qui est l'oxacilline (ou méthicilline).
- ***Bacillus cereus*** : est une bactérie gram positive mobile, aéro-anaérobie facultative. Elle peut se développer à des pH variant de 4,3 à 9,3. Sa tolérance au sel est relativement élevée puisqu'elle peut croître à des teneurs en NaCl atteignant 18%. Elle fait partie des pathogènes puisqu'elle produit deux toxines pouvant être à l'origine des toxi-infections alimentaires collectives. Les spores de *B. cereus*, bien que de résistance moyenne, sont capables de survivre aux températures utilisées lors de pasteurisation basses.
- ***Salmonella*** : appartenant à la famille des entérobactéries. Elles mesurent 0,7 à 1,5 µm de diamètre, pour 2 à 5 µm de longueur avec un flagelle. Elles provoquent chez l'espèce humaine des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la salmonellose, une des principales causes de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) (Tony et Paul, 1997).

Résumé

L'étude des espèces de *C. creticum* et *C. cheirifolium* appartenant à la famille des *Boraginaceae*, a porté sur un screening phytochimique visant à caractériser les différentes classes de composés chimiques contenus dans les feuilles et les racines des deux plantes.

Deux extraits bruts sont ciblés vue leur abondance, des alcaloïdes et des poly-phénols qui ont été récupérés à partir des feuilles de chaque plante, dont les premiers ont été extraits par deux méthodes : la macération et la sonication. Les résultats de rendement montrent que la sonication assure la meilleure extraction. Alors que l'extrait de *C. creticum* est plus riche en alcaloïdes (0,1374%) par rapport à *C. cheirifolium* (0,0605%), mais c'est l'inverse dans le cas des poly-phénols où cette dernière est plus riche (2,098%) par comparaison à l'extrait de *C. creticum* (1,323%). Le dosage des phénols totaux ainsi que la migration des extraits de poly-phénols par CCM confirment les résultats déjà obtenus. Les CCM des extraits d'alcaloïdes, ont révélé que leur composition est différente et confirment que *C. creticum* est la plus riches en ces composé.

L'effet antimicrobien a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton réalisée sur sept souches bactériennes référenciées. Les résultats indiquent que seulement les extraits de *C. creticum* manifestent une activité contre *Salmonella thyphimurium* et *Staphylococcus aureus M* avec l'absence de sensibilité pour les autres expériences réalisées.

Mot clés : *C. creticum*, *C. cheirifolium*, alcaloïdes, poly-phénols, sonication, CCM.

Summary

The study of *C. creticum* and *C. cheirifolium* species belong to the *Boraginaceae* family focused on the phytochemical screening to characterize the different classes of chemical compounds contained in the leaves and roots of the two plants.

Two crude extracts are targeted for their abundance, alkaloids and polyphenols which have been recovered from the leaves of each plant, where the first have been extracted by two methods: maceration and sonication. The yield results show that sonication provides the best extraction. While the *C. creticum* extract is richer in alkaloids (0.1374%) compared to *C. cheirifolium* (0.0605%), the reverse is true for polyphenols where the latter is richer (2.098%) compared to the *C. creticum* extract (1.323%). The determination of the total phenols and the migration of the polyphenols extracts by TLC confirm the results already obtained. The TLCs of the alkaloid extracts revealed that their composition is different and confirm that *C. creticum* is the richest in these compounds.

The antimicrobial effect was determined by the Mueller Hinton agar diffusion method performed on seven referenced bacterial strains. The results indicate that only the extracts of *C. creticum* show activity against *Salmonella thyphimurium* and *Staphylococcus aureus M* with the absence of sensitivity for the other experiments carried out.

Key words: *C. creticum*, *C. cheirifolium*, alkaloids, polyphenols, sonication, CCM.

ملخص

دراسة أنواع و من العائلة بوراجيناسي ركزت على الفحص الكيماي النباتي لتوصيف فئات مختلفة من المركبات الكيماية في أوراق وجذور *C. creticum* et *C. cheirifolium* النباتات على حد سواء .

وتستهدف اثنين من المستخلص الخام لوفرتها البولي فينول و الالكلويدات التي يتم استخراجها من أوراق النبتتين الالكلويدات استخرجت بطريقتين النقع و الصوتنة

تظهر النتائج أن الصوتنة توفر استخراج أفضل من النقع و أن تحتوى على كمية من الالكلويدات أوفر من ولكن العكس في حالة البولي فينولات حيث هذا الأخير أوفر مقارنة مع

تعبير البولي فينولات الكاملة و هجرتها عن طريق تثبت النتائج المتحصل عليها سابقا الالكلويدات تثبت أن المكونات مختلفة و ان تحتوى على كمية أوفر من هذه المكونات

تأثير مضاد للمكروبات و التي يحددها طريقة نشر على مولد هينتون اجار سبع سلالات بكتيرية المشار عليها و تشير النتائج إلى وجود نشاط ضد سلمونيلا التيفية و المكورات العنقودية الذهبية مع عدم ظهور أي نشاط فيما يخص البكتيريا الأخرى

الكلمات الرئيسية: الالكلويدات، البولي فينول، صوتنة، *C. creticum*، *C. cheirifolium*، الكروماتوغرافيا.