

Faculté des Sciences Exactes et d'Informatique
Département de chimie
Filière : chimie appliquée

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
Pour l'Obtention du Diplôme de Master en chimie
Option : **chimie appliquée**

THEME :

Caractérisation, extraction et identification de
certains métabolites actifs d'une plante médicinale

Etudiante : **Berrahal Malika**

Encadrant : Pr. Belouatek Aissa

Année Universitaire 2018-2019

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu « tout puissant » de m'avoir accordé la force, le courage et les moyens à fin de pouvoir accomplir ce modeste travail.

*J'adresse ensuite mes plus sincères remerciements à mon promoteur le professeur **Belouatek Aïssa** pour avoir accepté de m'encadrer et pour son caractère très compréhensif, sa patience, sa disponibilité, ses précieuses orientations, ses conseils hautement précieux ainsi que pour tout le temps qu'il m'a consacré pour diriger ce travail et pour m'avoir accueillies au sein du laboratoire de Structure, Elaboration et Application des Matériaux Moléculaires (SEAM)- Université AbdelHamid Ibn Badis Mostaganem.*

*Je remercie également le professeur **Ahmad Belhakem** pour l'honneur qu'il nous fait de présider le jury de ce mémoire.*

*Je tiens beaucoup à remercier aussi le docteur **AbdelNour Benguendouz** pour avoir accepté d'être l'examineur de ce travail.*

*Un grand merci aux membres des Labo de recherche (faculté FSEI), spécialement **Mme Hasna T**, **Mr Abdelgahni B**, et aux membres de labo pédagogique, ainsi que tous mes amis de la promotion, pour leur aide, leur amitié, leur gentillesse et leur soutien moral.*

Mes remerciements s'adressent aussi à tous les enseignants qui ont assuré ma formation.

Enfin mes sentiments de reconnaissance et remerciements vont à toutes les personnes qui ont participées de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avec ma gratitude et tous mon amour, je dédie ce travail à:

Mes très chers parents, qui ont consacré leur vie pour bâtir la mienne, qui ont toujours été là pour mes joies ainsi que pour mes peines. C'est avec émotion que je leurs exprime toute mon affection, mon admiration et mon profond respect, j'espère que par ce modeste travail, je vous rends un peu de ce sentiment de fierté que j'éprouve d'être votre fille.

*Mes très chers frères : **Nadir**, **Yassine**, ainsi que ma chère sœur **Aya** pour leurs encouragements.*

*A ma tendre et chère tante : **Kheira**.*

*A mes amis et collègues : **Sihem**, **Badro**, **Mohamed Amine**, **Salah**, **Ismail**,
Fatima*

A toute la promotion chimie appliquée « 2018-2019 »

Sihem

Résumé :

Les objectifs de la présente étude sont d'apporter des éléments de connaissances chimiques relatifs à un mélange synthétique entre la gomme et les tiges d'une plante à caractère thérapeutique « Accacia Horrida » par caractérisation qualitative et quantitative, l'extraction et identification de certains groupes chimiques bioactifs et leur effet inhibiteur sur les lithiases urinaires. Différentes méthodes d'extraction ont été étudiées. Les produits obtenus peuvent être utilisés en pharmacologie, cosmétique et en parfumerie.

Mots clés : Accacia Horrida, caractérisation, extraction, identification, inhibiteur

الخلاصة :

تهدف هذه الدراسة إلى توفير عناصر المعرفة الكيميائية المتعلقة بمزيج اصطناعي بين سيقان و صمغ نبات علاجي "أكاسيا هوريدا" عن طريق التوصيف النوعي والكمي ، واستخراج وتحديد هوية معينة من المجموعات الكيميائية النشطة حيويًا وتأثيرها المثبط على الحصى البولية. تمت دراسة طرق استخلاص مختلفة. يمكن استعمال المواد المتحصل عليها في مجال الصيدلة وصناعة مستحضرات التجميل والعطور.

الكلمات المفتاحية : أكاسيا هوريدا ، التوصيف ، الاستخراج ، التعريف، المانع

Abstract:

The objectives of the present study are to provide elements of chemical knowledge relating to a synthetic mixture between the gum and the stems of a therapeutic plant "Accacia Horrida" by a qualitative and quantitative characterization, extraction and identification of certain bioactive chemical groups and their inhibitory effect on urinary lithiasis. Different extraction methods have been studied. The obtained products can be used in pharmacology, cosmetics and perfumery.

Key words: Accacia Horrida, characterisation, extraction, inhibitor

Sommaire

Introduction

Chapitre I : Plantes médicinales et lithiases urinaires

I. Plantes médicinales	2
I. 1. La phytothérapie	2
2. Définition des plantes médicinales	2
3. Parties de plantes médicinales utilisées	3
4. Conseils et préparation des plantes médicinales	4
I.4.1. Récolte des plantes	4
I.4.2. Séchage et conservation des plantes	4
I.4.2.1. Séchage	4
I.4.2.1. Conservation	5
5. Méthodes d'extraction des métabolites secondaires	6
I.5.1. Extraction solide-liquide	6
I.5.1.1. Décoction	6
I.5.1.2. Infusion	6
I.5.1.3. Macération	6
I.5.1.4. Extraction par Soxhlet	7
I.5.2. Extraction par distillation	7
I.5.2.1. Hydrodistillation	7
I.5.2.2. Extraction par entraînement à la vapeur d'eau	8
I.6. Définition des métabolites secondaires	8
I.6.1. Classification des métabolites secondaires	8
I.6.1.1. Les composés phénoliques (polyphénols)	8
I.6.1.1.1. Définition	8
I.6.1.1.2. Les Flavonoïdes	9
I.6.1.1.3. Les Tannins	10
I.6.1.1.4. Tannins hydrolysables	11
I.6.1.1.5. Tannins condensés	11
I.6.1.1.6. Propriétés biologiques des polyphénols	12
I.6.1.2. Les alcaloïdes	13
I.6.1.2.1. Définition	13
I.6.1.2.2. Activités biologiques des alcaloïdes	13
I.6.1.3. Les terpénoïdes	13
I.6.1.3.1. Définition	13
I.6.1.4. Huiles essentielles	14
I.6.1.4.1. Définition	14
I.6.1.4.2. Activités biologiques des huiles essentielles	14
I.7. Méthodes d'identification des métabolites secondaires végétaux	14
I.7.1. Méthodes chromatographiques	14
I.7.1.1. Chromatographie sur couche mince	15
I.7.1.2. Chromatographie liquide à haute performance	16
I.7.1.3. Chromatographie en phase gazeuse	16
I.7.2. Spectrométrie d'infrarouge	17
II. Composition phytochimique et effet d'une plante médicinale sur la cristallisation	17

lithiasique phosphorique	
II.1. Analyse par spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (IRTF)	18
II.2. Données spectroscopiques IRTF sur la lithiase phosphocalcique	18
II.2.1. La carbapatite	18
II.2.2. L'hydroxyapatite	20
II.2.3. La withlockite	21
II.2.4. Phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)	22
II.2.5. La struvite	23
II.2.6. Le phosphate octocalcique pentahydraté (O.C.P)	24

Chapitre II : Méthodes et matériels

I. Matériel végétal : mélange entre les tiges d'Acacia Horrida et sa gomme	25
II. Caractérisation du matériau	25
II.1. Analyse IR	25
II.2. Point de fusion	25
II.3. Screening phytochimique	26
II.3.1. Détection des alcaloïdes	26
II.3.2. Détection des flavonoïdes leuco-anthocyanes	26
II.3.3. Détection des saponines	27
II.3.4. Détection des tannins	27
II.3.5. Détection des anthraquinones libres	27
II.3.6. Test de protéine	27
II.4. Etude de la solubilité en fonction des solvants	28
III. Extraction	28
III.1. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes	28
III.1.1. Décoction	28
III.1.2. Extraction au Soxhlet	29
III.1.3. Evaporation	30
III.1.4. Détermination du rendement	30
III.2.. Extraction des composés volatils et odorants (Hydro-distillation)	31
III.3. Analyse des concrètes par spectrophotomètre UV-visible	32
III.4. Mesure de L'indice de réfraction des concrètes	32
IV. Etude de la cristallisation des phosphates	33
IV.1. Inhibition de la cristallisation des phosphates de l'urine artificielle à pH=7	34

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Caractérisation chimique du matériau	36
I.1. Point de fusion	36
I.2. Screening chimique	36
I.3. Analyse IR	38
II. Etude de solubilité	39
III. Extraction	40
III.1. Décoction	40
III.1.1. Calcul du rendement	40
III.1.2. Caractérisation de l'extrait par spectroscopie IR	41
III.1.3. Caractérisation du produit de décoction	42
III.2. Soxhlet	42
III.3. L'hydro-distillation	43
III.3.1. Caractérisation de l'hydro-distillat par spectroscopie IR	43
III.4. L'indice de réfraction des fractions	44
III.5. Analyse des extraits par spectrophotomètre UV-visible	44
IV. Inhibition des phosphates calciques	45
IV.1. Cristallisation sans inhibiteur à pH= 7	45

IV.2. Cristallisation en présence d'inhibiteur en différents volumes à pH= 7	47
IV.2.1. PI. 4 :76	47
IV.2.2. PI. 12 :68	48
IV.2.3. PI. 20 :60	49
IV.2.4. PI. 28 :52	50
IV.2.5. PI.40 :40	51
Conclusion	
Références bibliographique	

Liste des abréviations

UV : Ultra-Violet

C : Carbone

HE : Huile Essentielle

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

Rf : Rapport Frontal

CLHP : Chromatographie Liquide Haute-Performance

SM : Spectroscopie de Masse

TR : Temps de Rétention

IR : Infrarouge

FTIR : infrarouge à transformée de Fourier

CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse

GC-MS : Chromatographie Gazeuse- Masse Spectroscopie

CA : Carbapatite

F : Forte

M : Moyenne

TF : Très Forte

AP : hydroxyapatite

WK : Withlockite

PACC : Phosphate de Calcium Amorphe Carbonaté

Str MAP : Struvite

O.C.P : Phosphate Pctocalcique Pentahydraté

R : Rendement

UV : Ultra-Violet

HCl : acide chloridrique

NaOH : hydroxyde de sodium

t : temps

SI : Sans Inhibiteur

PI : Présence d'Inhibiteur

Liste des tableaux

Tableau 1	Structure des squelettes de polyphénols	9
Tableau 2	Principales nombres d'ondes de vibrations de la carbapatite	18
Tableau 3	Principales nombres d'ondes de vibrations de l'hydroxyapatite	19
Tableau 4	Principales nombres d'ondes de vibrations de la withlockite	20
Tableau 5	Principales nombres d'ondes de vibrations des bandes du PACC	21
Tableau 6	Principales nombres d'ondes de vibrations de la struvite	23
Tableau 7	Principales nombre d'ondes de vibrations de l'O.C.P	24
Tableau 9	Les solvants organiques et les pourcentages de solvants utilisés en test de solubilité	28
Tableau 10	Composition de l'urine artificielle	33
Tableau 11	Tableau récapitulatif des tests phyto-chimique	37
Tableau 12	Fréquences de vibration des liaisons de l'extrait de la plante	38
Tableau 13	Bandes caractéristiques de l'extrait obtenu par décoction	41
Tableau 14	Bandes caractéristiques des groupements fonctionnels du produit de décoction	42
Tableau 15	Bandes caractéristiques des groupements fonctionnels de l'hydro-distillat	44
Tableau 16	les indices de réfractions de l'hydro-distillat et du produit obtenu par décoction	44
Tableau 17	Longueurs d'onde et absorbances maximales de l'hydro-distillat, du produit et d'extrait obtenus par décoction	44
Tableau 18	Principales nombres d'ondes de vibrations des bandes IRTF à pH=7	46

Liste des figures

Figure 1	Rendement des extraits d'alcaloïdes totaux en fonction de la température de séchage	5
Figure 2	Structure de base de flavonoïdes	10
Figure 3	Structure générique des flavonoïdes	10
Figure 4	Structure chimique de l'acide gallique	11
Figure 5	Structure chimique de l'acide ellagique	11
Figure 6	L'unité de base récurrente des tannins condensés	12
Figure 7	Développement chromatographique d'une plaque	15
Figure 8	Carbapatite	19
Figure 9	Hydroxyapatite	20
Figure 10	La whitlockite	21
Figure 11	Phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)	22
Figure 12	La Struvite	23
Figure 13	Phosphate octocalcique pentahydraté (O.C.P)	24
Figure 15	Matière végétale	25
Figure 16	Décoction	29
Figure 17	Montage de Soxhlet	29
Figure 18	Evaporateur rotatif	30
Figure 19	Montage d'extraction par hydro-distillation	31
Figure 20	Relargage	31
Figure 21	Réfractomètre	32
Figure 22	Bain thermostaté	35
Figure 23	Résultat du test de présence d'alcaloïdes (de Mayer)	36
Figure 24	Résultat du test de présence des flavonoïdes	36
Figure 25	Résultat du test de présence des saponines	37
Figure 26	Résultat de test des protéines	37
Figure 27	Spectre infrarouge de l'extrait de la plante	38
Figure 28	Résultats du test de solubilité	39
Figure 29	Extrait de la décoction	40
Figure 30	Spectre IR de l'extrait obtenu par décoction	41
Figure 31	Spectre IR du produit de décoction	42
Figure 32	Spectre IR de l'hydro-distillat	43

Figure 34	Evolution de la masse des cristaux formés à pH=7	45
Figure 35	Spectre IR du phosphate calcique sans inhibiteur à pH= 7	46
Figure 36	Graphique de comparaison SI avec PI.4/76	47
Figure 37	Spectre IR des phosphates PI.4/76	47
Figure 38	Graphique de comparaison SI avec PI.12/68	48
Figure 39	Spectre IR des phosphates PI.12/68	48
Figure 40	Graphique de comparaison SI avec PI.20/60	49
Figure 41	Spectre IR des phosphates PI.20/60	49
Figure 42	Graphique de comparaison SI avec PI.28/52	55
Figure 43	Spectre IR des phosphates PI 28/52	55
Figure 44	Graphique de comparaison SI avec PI.40/40	51
Figure 45	Spectre IR des phosphates PI 40/40	51

Introduction

Introduction

Au travers des âges, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et évolue avec l'histoire de l'humanité [1].

Les plantes médicinales contiennent un grand nombre de molécules actives d'intérêt multiple mis à profit dans l'industrie, alimentation, cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces molécules, on retrouve, les coumarines, alcaloïdes, acides phénoliques, tannins, lignines, terpènes et flavonoïdes [2]. Les flavonoïdes possèdent potentiellement des activités biologiques, anti-inflammatoires, anticancérigènes, antimicrobiennes et anti-oxydantes [3].

Dans le cadre de notre travail relatif aux plantes médicinales, nous avons réalisé une étude détaillée sur l'Acacia Horrida, extraction, identification, analyse qualitative et quantitative de certains groupes chimiques bioactifs, sa solubilité, et son effet sur l'urine artificielle.

Les principaux chapitres de notre travail sont traités selon le plan suivant:

➤ La première partie consiste en une revue bibliographique dans laquelle sont détaillés les chapitres suivants : les plantes médicinales, les métabolites secondaires et méthodes d'extraction ainsi que les lithiases urinaires.

➤ Dans la deuxième partie, nous avons envisagé la partie expérimentale qui se déroule en trois axes:

Dans le premier axe, nous avons réalisé l'extraction et l'analyse qualitative à l'aide de screening phytochimique de quelques composés bioactifs.

Dans le deuxième axe, nous avons étudié la solubilité de la plante.

Nous sommes intéressés à évaluer le pouvoir inhibiteur de notre plante dans le troisième axe.

➤ Dans la troisième partie, nous avons rapporté les résultats obtenus et l'étude du pouvoir d'inhibition de l'extrait de la plante médicinale.

Enfin nous achèverons ce travail par une conclusion générale.

Chapitre I

Plantes médicinales et lithiases urinaires

I. Plantes médicinales**I. 1. La phytothérapie**

Le mot phytothérapie provient de deux mots grecs qui signifient essentiellement « soigner avec les plantes » [4]. C'est un traitement ou prévention des maladies par l'usage de certaines parties de plantes médicinales telles que les racines, les tiges ou les feuilles. Elle fait partie des médecines parallèles ou des médecines douces [5].

D'après Zeghad [5], il y a différents types de phytothérapie :

- **Aromathérapie** : est une thérapeutique qui utilise les extraits aromatiques de plantes (essences et ou huiles essentielles), ce sont des produits complexes à utiliser souvent à travers la peau.
- **Gemmothérapie** : est une thérapeutique qui utilise les extraits alcooliques des tissus embryonnaires végétaux en croissance tel que jeunes pousses, bourgeons et les radicules.
- **Herboristerie** : consiste dans la préparation et la commercialisation de plantes médicinales ou de préparations dérivées. La préparation repose sur des méthodes simples, le plus souvent à base d'eau : décoction, infusion, macération.
- **Homéopathie** : elle consiste à traiter une maladie par des substances susceptibles de produire des troubles semblables à ceux déterminés par la maladie elle-même [6].
- **Phytothérapie pharmaceutique** : utilise des produits d'origines végétales obtenus par extraction et qui sont dilués dans de l'alcool éthylique ou un autre solvant.

Après transformation chimique, les plantes sont vendues sous forme de tisanes, de liquide, de sachets, ou de gélules [4].

I. 2. Définition des plantes médicinales

Les plantes médicinales regroupent toutes les plantes dont l'un de leurs organes contient une ou des substances chimiques qui sont destinées à produire une activité pharmacologique. Elles représentent la forme la plus ancienne et la plus répandue de médication [7].

Actuellement grâce au progrès scientifique considérables enregistrés depuis la fin du XIX^{ème} siècle (technique d'analyse et extraction... etc.) les plantes médicinales constituent des ressources inestimables qui ont été utilisées pour trouver de nouvelles molécules nécessaires à la mise au point de futurs médicaments [1].

D'après **Odile et Daniel [8]**, environ plus de 30% des médicaments contiennent des principes actifs d'origine naturelle.

I. 3. Parties de plantes médicinales utilisées

Les différentes parties de la même plante médicinale peuvent présenter des constituants chimiques très différents et qui n'ont pas la même action thérapeutique. Généralement, en médecine traditionnelle, la partie qui contient le plus de principes actifs est la plus employée.

Les différentes parties de plantes qui peuvent être employées chez la plupart des populations sont ceux qui ont été décrites par **Gurib Fakim [1]** :

Racine: Les racines peuvent être fibreuses, solide ou charnues.

Rhizome: Le rhizome est une tige ligneuse ou allongée charnue qui pousse généralement horizontalement en dessous du sol, formant des feuilles au-dessus du sol et des racines dans le sol.

Bulbe : Un bulbe est une pousse souterraine verticale disposant de feuilles modifiées utilisées comme organe de stockage de nourriture par une plante à dormance. Les bulbes les plus populaires en médecine traditionnelle sont l'oignon et l'ail.

Tubercule: Un tubercule est une structure charnue gonflée, généralement souterraine, qui assure la survie des plantes pendant la saison d'hiver ou en période de sécheresse.

Ces organes peuvent être formés sur les racines ou se développent sur les parties aériennes de la plante. La pomme de terre africaine *Hypoxis* de la famille *Hypoxidaceae* est un exemple bien connu.

Écorce: L'écorce est la couche protectrice externe d'un tronc d'arbre, elle est souvent riche en toxines (phénols) et principes amers (tanins) ce qui la rend plus protectrice. Exemple : *Cinchona*, *Rubiaceae*.

Bois: Le bois est la tige épaisse ou le bois lui-même. Exemple : *Santalum album* de la famille *Santalaceae*.

Feuilles: Les feuilles peuvent être utilisées seules ou mélangées avec leur pétiole. Exemple : *Ginkgo biloba* de la famille *Ginkgoaceae*.

Gommes: les gommes sont des composés solides constituent d'un mélange de polysaccharides. Ils sont solubles dans l'eau et partiellement digérés par les êtres humains. Exemple *Acacia Senegal*; *Terminalia*.

Huiles essentielles: Exemple *Mentha x piperita*; *Canangaodorata*.

Les parties aériennes: Toutes les parties de la plante qui se trouvent au-dessus du sol. Elles sont récoltées, très souvent, lors de la floraison. Exemple: *Hypericum perforatum* de la famille *Hypericaceae*.

Fleurs: Les fleurs sont très utilisées dans la médecine traditionnelle.

Fruits: Exemple *Punicagranatum* ; *Citrus sp.*

Graines: Exemple *Ricinus communis* ; *Foeniculum vulgare*.

I. 4. Conseils et préparation des plantes médicinales

I.4.1. Récolte des plantes

La récolte des plantes médicinales est une étape très importante, notamment en médecine traditionnelle. Elle doit être effectuée au moment le plus favorable afin de conserver l'efficacité des principes actifs.

Certaines plantes peuvent être cueillies toute l'année, mais la plupart doivent être récoltées à un moment précis de leur croissance pour être utilisées immédiatement ou conservées [9]. Les herboristes [9] ont proposés quelques conseils pour faire une meilleure récolte :

- Identifier les plantes, ne jamais cueillir une plante dont on n'est pas sûr.
- Ne pas cueillir les plantes sauvages rares ou inhabituelles.
- Ne pas ramasser de plantes au bord des routes, à proximité des usines ou dans les zones où sont vaporisés des insecticides sur les cultures.
- Utiliser, si possible, un panier ouvert pour y déposer les plantes, ce qui évite de les abîmer.
- Dans la nature, un sac à dos (évitez le Nylon) ou un sac en toile sera plus pratique.
- Récolter uniquement des plantes saines.
- Récolter les plantes par temps sec, plutôt par une matinée bien ensoleillée.

I.4.2. Séchage et conservation des plantes

I.4.2.1. Séchage

Le séchage des plantes médicinales est, normalement, effectué juste après la récolte, il permet de réduire la teneur en eau afin de limiter les dégâts dus aux enzymes et autres agents biologiques tels que les moisissures et les microbes.

Le séchage doit être rapide et dans un endroit bien aéré et à l'abri de la lumière [10].

Il existe également d'autres procédés de séchage : les procédés mécaniques (presse, décantation ou centrifugation), les procédés physico-chimiques (adsorption, absorption, réfrigération et séchage par évaporation) [11].

Kémajou A, Mba L, Bagda A [12] ont évalué l'influence de la température de séchage sur les principes actifs (alcaloïdes totaux) de la plante médicinale *Alstonia boonei* WILD, plante antipaludéenne. Ils ont trouvé que la teneur en alcaloïdes totaux est diminuée progressivement en fonction de la température de séchage des écorces (Figure 1). Cette diminution du rendement est en moyenne de 0,00091% par degré Celsius.

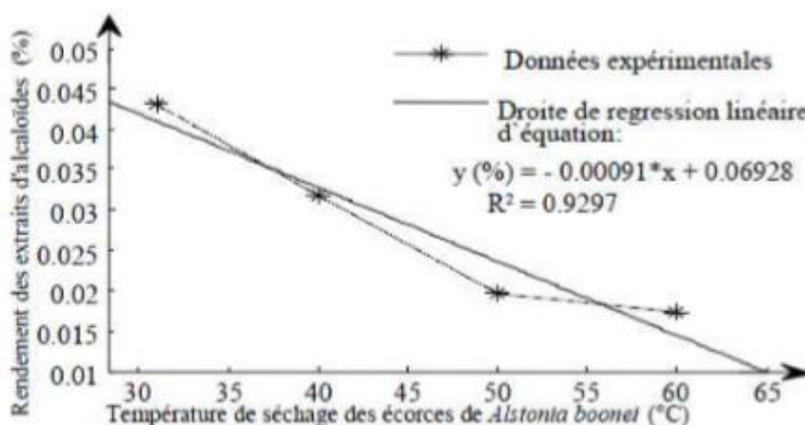


Figure 1. Rendement des extraits d'alcaloïdes totaux en fonction de la température de séchage

I.4.2.1. Conservation

Il existe diverses méthodes de conservation, les plus courantes et les plus simples étant le séchage à l'air ou au four [9].

Les plantes séchées sont coupées grossièrement et disposées dans des bocaux de verre ou dans des sacs en papier, à l'abri de l'air et de la lumière. Les boîtes en fer sont naturellement proscrites [10].

Les plantes séchées peuvent être conservées pendant une année dans de bonnes conditions. Au-delà de cette période, leur pouvoir diminue sensiblement et l'action thérapeutique disparaît. C'est pourquoi il faudra renouveler le stock de plants chaque année [10].

Il existe également d'autres méthodes pour la conservation des propriétés médicinales des plantes [9] telles que l'aspiration de l'humidité des plantes par un déshumidificateur ou la congélation dans des sacs en plastique.

I. 5. Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme végétal selon diverses techniques. Dans les domaines de la chimie des substances naturelles et de la chimie thérapeutique, l'extraction des métabolites secondaires ciblent est une phase primordiale [13].

Le choix de la méthode d'extraction est basé sur des données préalables sur les caractéristiques physicochimiques des métabolites à extraire. Mais, il est d'usage d'appliquer différentes procédés afin de savoir le plus adéquat.

I.5.1. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est une opération de transfert de matière entre une phase qui contient la matière à extraire «solide», et un solvant d'extraction «liquide». Le but de cette opération est d'extraire et de séparer un ou plusieurs composants mélangés à un solide dans un solvant [13].

I.5.1.1. Décoction

Les plantes sont versées dans l'eau froide et portées à ébullition un temps plus ou moins long, deux ou trois minutes pour les feuilles, les tiges et les fruits ; cinq minutes ou plus pour les écorces et les racines [14].

I.5.1.2. Infusion

Une infusion est préparée en versant de l'eau bouillante sur une quantité spécifique de matière végétale, en laissant reposer la mixture pendant 10-15 minutes [15].

I.5.1.3. Macération

Le liquide de macération peut être de l'eau, de l'alcool ou du vinaigre. Dans le cas de la macération à l'eau, les plantes doivent être versées dans le liquide froid ou tiède pendant quelques heures (10 ou 12 heures) [14]. Les macérations à l'eau ne doivent pas dépasser une douzaine heures par risque d'oxydation et de fermentation du liquide [14].

I.5.1.4. Extraction par soxhlet

Un extracteur soxhlet est une pièce de verrerie utilisée pour extraire les molécules aromatiques de la plante. Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvants passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'adducteur, faisant ainsi macérer les résidus dans le solvant. Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites. Le solvant contenu dans le ballon s'enrichit progressivement en composés soluble. La taille du corps en verre étant limitée, il peut être nécessaire de réaliser plusieurs extractions successives pour récupérer une quantité suffisante d'extrait [16].

I.5.2. Extraction par distillation

Selon **PIOCHON** [17], il existe 3 différents procédés utilisant le principe de la distillation. Il s'agit de l'hydro-distillation, l'hydro-diffusion et l'entraînement à la vapeur d'eau. Dans notre travail, on s'intéresse par seulement une méthode : l'hydro-distillation.

I.5.2.1. Hydro-distillation

L'hydro-distillation est la méthode la plus employée pour l'extraction des huiles essentielles. Le principe de l'hydro-distillation consiste à immerger la matière première dans un bain d'eau. L'ensemble est porté à ébullition et l'opération est généralement conduite à pression atmosphérique. Lors de la distillation des huiles essentielles, plusieurs phénomènes sont à la base d'échange de matière entre les phases solide, liquide et vapeur, d'où l'influence d'un grand nombre de paramètre sur la qualité et le rendement de la production [18]. Dans le cas où ces structures sont superficielles, la membrane externe ou la cuticule qui constituent les seules barrières à la libération de l'huile essentielle, est vite rompue à ébullition, les composés volatiles sont aussitôt évaporés. Lorsque les huiles essentielles sont sous-cutanées, Elles doivent d'abord diffuser à travers l'épaisseur du tissu végétal avant d'entrer en contact avec l'eau ou sa vapeur. Elles sont alors évaporées comme dans le cas des sécrétions superficielles. Ainsi durant la distillation, l'eau bouillant pénètre dans les cellules végétales et solubilise une partie de l'huile essentielle de l'appareil sécréteur interne. La solution aqueuse chargée de composés terpéniques, diffuserait ensuite à travers une épaisseur de tissu, plus ou moins dense, selon l'organe, vers la surface extérieure où l'huile essentielle serait vaporisée et entraînée sous forme d'azéotrope [16].

I.5.2.2. Extraction par entrainement à la vapeur d'eau

C'est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles. A la différence de l'hydro distillation cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse le libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange (eau+ huile essentielle). Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière végétale. Puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile [19].

I.6. Définition des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires végétaux peuvent être définis comme des molécules indirectement essentielles à la vie des plantes, par opposition aux métabolites primaires (protéines, lipides et glucides). Ces métabolites secondaires interviennent dans la structure des plantes (lignines et tannins) mais également, elles exercent une action déterminante sur l'adaptation des plantes à leur environnement [20]. Ils participent ainsi, d'une manière très efficace, dans la tolérance des végétaux à des stress variés : action anti-herbivore (menthe par exemple), inhibition des attaques pathogènes des bactéries et des champignons, prédation d'insectes, défense contre la sécheresse et lumière UV. Mais elles peuvent être antinutritifs. Beaucoup de métabolites secondaires sont toxiques, ils sont alors stockés dans des vésicules spécifiques ou dans la vacuole [21].

D'un point de vue appliqué, ces molécules constituent la base des principes actifs que l'on retrouve chez les plantes médicinales [20].

I.6.1. Classification des métabolites secondaires

On peut classer les métabolites secondaires en trois grands groupes : les composés phénoliques, les terpènes et les alcaloïdes. Chacune de ces classes renferme une très grande diversité de composés qui possèdent une très large gamme d'activités en biologie humaine [22].

I.6.1.1. Composés phénoliques (polyphénols)**I.6.1.1.1. Définition**

Les polyphénols constituent un groupes largement distribué des substances dans le royaume des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques présents dans tous les organes de la plante, ils

résultent bio génétiquement de deux voies synthétiques principales, la voie de shikimate et d'acétate [23]. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'un cycle aromatique (benzoïque) portant au moins un groupement hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction chimique (éther, méthylique, ester, sucre...) [24].

La structure de ces composés varie, des molécules simples (acides phénoliques simples) aux molécules hautement polymérisées (tanins condensés). Ils participent à la pigmentation des fleurs, des légumes et de quelques fruits (raisins, agrumes, etc...), certains d'entre eux sont responsables d'amertume et d'astringence [23].

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes (Tableau 1) : les acides phénoliques, les flavonoïdes, Les tanins, Les stilbènes, Les lignanes et les coumarines [23].

Tableau 1. Structure des squelettes de polyphénols [25].

Nombre de Carbones	Squelette	Classification	Exemple	Structure de base
7	C ₆ -C ₁	Acides phénols	Acide gallique	
8	C ₆ -C ₂	Acétophénones	Gallacetophénone	
8	C ₆ -C ₂	Acide phénylacétique	Acide <i>p</i> -Hydroxyphénylacétique	
9	C ₆ -C ₃	Acides hydroxycinamiques	Acide <i>p</i> -coumarique	
9	C ₆ -C ₃	Coumarines	Esculitine	
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinone	Juglone	
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiférine	
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbènes	Resveratrol	
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes	Naringénine	

I.6.1.1.2. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'une des classes de polyphénols les plus importants avec une abondance assez marquée dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et autres dérivés des plantes [26]. Ces molécules sont présentes dans toutes les cellules végétales vertes participant au processus photosynthétique [27] et jouent ainsi un rôle dans la régulation de l'expression des gènes, le métabolisme et la croissance [28].

À l'heure actuelle, environ 4000 structures flavonoïdiques ont été élucidées [29] présentant un même squelette de base carboné C6-C3-C6 et dérivant d'un composé parent, le 2-phényl chromane (Figure 02 et 03) [30].

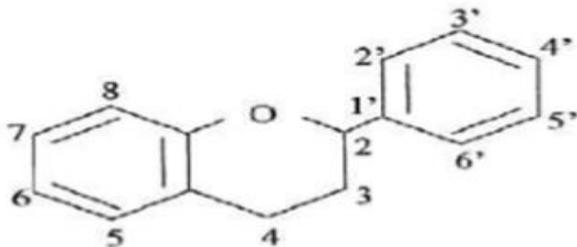


Figure 2. Structure de base des flavonoïdes

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, de leur degré d'hydroxylation et de méthylation, et du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C, impliquant la présence des doubles liaisons C2-C3, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo [30, 26].

En se basant sur le squelette des flavonoïdes, ces derniers peuvent être classés comme suit : anthocyanidines, flavonoles, isoflavonoles, flavones, isoflavones, flavanes, isoflavanes, flavanols, isoflavanols, flavanones, isoflavanones et aurones (Figure 03) [28, 29].

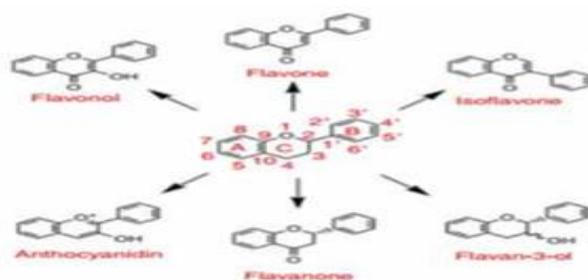


Figure 3. Structure générique des flavonoïdes [25]

I.6.1.1.3. Tannins

Les tannins représentent un groupe de substances phénoliques polymériques, ayant la capacité de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [31]. Les tannins sont trouvés dans toutes les différentes parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [32].

Les tannins se divisent en deux groupes qui se différencient de leur structure et de leur origine biologique.

I.6.1.1.4. Tannins hydrolysables

Ce sont des oligo ou bien des poly-ester d'un sucre (généralement c'est un D-glucose) et d'un nombre variable d'acide phénolique qui est l'acide gallique (Figure 4) [34] dans le cas des gallotannins, ou bien qui est l'acide ellagique (Figure 5) [35] dans le cas des ellagitannins [24, 33].

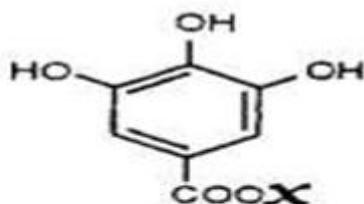


Figure 4. Structure chimique de l'acide gallique [34]

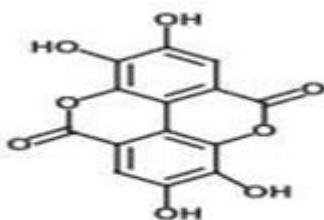


Figure 5. Structure chimique de l'acide ellagique [35]

I.6.1.1.5. Tannins condensés

Ce sont des oligo ou bien des polymères de flavane-3 ol dérivés de la catéchine ou des nombreux isomères [36], ce qui leur donne une structure voisine à celle des flavonoïdes (Figure 6) [37], contrairement aux tannins hydrolysables, les tannins condensés ne possèdent pas de sucre dans leur molécule [24].

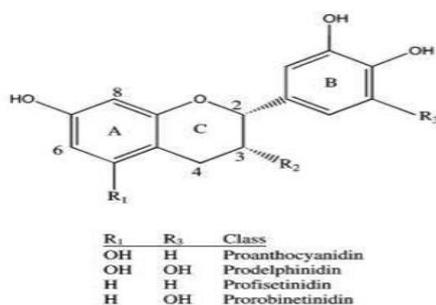


Figure 6. L'unité de base récurrente des tannins condensés [37]

I.6.1.1.6. Propriétés biologiques des polyphénols

Les recherches récentes sur les composés phénoliques en général et les flavonoïdes en particulier sont repoussés en raison de leurs diverses propriétés physiologiques comme les activités antiallergiques, anti-atherogéniques, anti-inflammatoires, hépatoprotectives, antimicrobiennes, antivirales, antibactériennes, anti-carcinogéniques, anti-thrombotiques, cardioprotectives et vasodilatatoires [38, 39]. Après plusieurs études sur l'impact positif de la consommation des polyphénols sur la santé ainsi que la prévention des différentes maladies, les industriels commercialisent en ce moment des aliments enrichis en polyphénols. De plus leur activité antioxydante empêche la peroxydation lipidique dans le but d'assurer une bonne conservation des denrées alimentaires. Dans l'industrie cosmétique, les composés phénoliques sont appliqués pour lutter contre la production des radicaux libres qui peuvent endommager la beauté de la peau.

En phytothérapie les propriétés vasculoprotectrices, sont par exemple aussi bien attribuées aux flavonoïdes qu'aux autres polyphénols, donc chaque classe chimique est utilisée pour des bénéfices spécifiques [40]. Les composés des flavonoïdes ont le pouvoir d'empêcher les dommages oxydatifs soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes [41], soit par chélation des métaux (fer et cuivre), ou bien par l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres [42, 43].

En ce qui concerne les tannins, le pouvoir antioxydant est une propriété très remarquable due à leurs noyaux phénols et la présence des groupes di- ou trihydroxyles sur le cycle B et les groupes

méta 5, 7 dihydroxyles sur le cycle A. Les tannins catéchiques chélatent les ions Cu^{2+} qui catalysent l'oxydation des lipoprotéines dans les macrophages *in vitro* [44].

I.6.1.2. Les alcaloïdes

I.6.1.2.1. Définition

Les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogène. Leurs caractéristiques communes sont la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique. L'atome d'azote accepte souvent un proton, ce qui leur confère un caractère légèrement basique en solution (d'où leur nom d'alcaloïde). Dans leur grande majorité, les alcaloïdes sont hétérocycliques, bien que quelque composé azoté aliphatique (non cyclique) comme la mescaline et la colchicine soient parfois classés dans les alcaloïdes. Globalement on a recensé quelque 10.000 alcaloïdes dans à peu près 20 pour 100 des plantes à fleurs essentiellement des dicotylédones herbacées [45].

I.6.1.2.2. Activités biologiques des alcaloïdes

Les alcaloïdes provoquent chez l'Homme diverses réponses physiologiques par ce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A forte dose la plupart des alcaloïdes sont très toxiques par contre à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. De la préhistoire jusqu'à nos jours, les alcaloïdes ou des extraits qui en renferment ont été utilisés comme médicaments relaxants musculaires, analgésique et tranquillisants [23].

I.6.1.3. Les terpénoïdes

I.6.1.3.1. Définition

Les terpènes sont des substances généralement lipophiles qui dérivent d'une unité simple à cinq atomes de carbone nommée isoprène. Leur grande diversité trouve son origine dans le nombre d'unités de base qui composent la chaîne, ainsi que dans les divers modes d'assemblage. La formation de structures cycliques, l'addition de fonction comprenant de l'oxygène et la conjugaison avec des sucres ou d'autres molécules peuvent rendre leurs structures complexes [23]. Selon le nombre d'unités isopréniques qui constituent les terpénoïdes on distingue les monoterpènes en C_{10} , les sesquiterpènes en C_{15} , les diterpènes en C_{20} , les triterpènes en C_{30} , les tétraterpènes en C_{40} et les polyterpènes qui comportent plus de 500 carbones. Les monoterpènes et les sesquiterpènes volatiles sont les principaux composants des huiles essentielles (HE) [46].

I.6.1.4. Huiles essentielles**I.6.1.4.1. Définition**

Selon la pharmacopée française (1965), les huiles essentielles (en d'autres nom, essences ou huiles volatiles) sont des produits de composition généralement assez complexe renferment les principes volatils contenu dans les végétaux. Les terpènes (principalement les monoterpènes) représentent la majeure partie (environ 90%) des huiles [24, 47].

I.6.1.4.2. Activités biologiques des huiles essentielles

Depuis leur découverte, les HE possèdent de nombreuses activités biologiques. Elles sont très utilisables dans de multiples domaines, alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques, elles ont une large application en phytothérapie en tant qu'agents antimicrobiens, antioxydants, relaxants et antispasmodiques [24] grâce aux diverse propriétés, les plants aromatiques et leur essences trouvent leur emploi dans multiples domaines, telles que le domaine alimentation, pour l'assaisonnement, coloration et la conservation des aliments ou des boissons, certaines sont aussi utilisées comme suppléments diététiques [24].

Les propriétés odoriférantes des huiles essentielles, leur confèrent une consommation importante en parfumerie et en cosmétique [24]. Certaines des huiles essentielles peuvent avoir un intérêt médicinal en particuliers dans le domaine des antiseptiques externe mais qui majoritairement sont surtout destinées à l'aromatisation des formes médicamenteuses destinées à la voie orale [24].

I.7. Méthodes d'identification des métabolites secondaires végétaux**I.7.1. Méthodes chromatographiques**

Les méthodes chromatographiques sont des méthodes permettant de séparer les éléments d'un extrait végétal en solution plus ou moins complexe. Le mélange à chromatographie entraîné par une phase mobile circule au contact d'une phase stationnaire liquide ou solide. Des interactions physique ou chimique s'établissent entre la phase stationnaire, qui possède une très grande surface de contact, et les molécules à séparer. Des échanges rapides et réversibles se produisent dont la force dépend de la nature chimique des molécules à séparer. Celles-ci sont plus ou moins retenus selon l'importance de leur interaction avec la phase stationnaire. Les molécules sont alors entraînées chimiquement, ce qui permet leur séparation. Cette séparation peut être effectuée dans un but analytique quantitatif ou qualitatif ou dans un but préparatif [48].

I.7.1.1. Chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur couche mince est une technique couramment utilisée pour séparer des composants dans un but d'analyse (CCM analytique) ou de purification (CCM préparatrice).

Cette technique (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption et d'interaction. La phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium.

Après que l'échantillon ait été déposé, les substances migrent essentiellement par capillarité. La vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. Généralement, en CCM, les substances de faible polarité migrent plus rapidement que les composants polaires [49].

Le constant de migration caractéristique de chaque espèce chimique dans un système de phase stationnaire /phase mobile donné est appelée facteur de rétention R_f (rapport entre la distance parcourue par la tâche et la distance parcourue par le front du solvant de puis la ligne de dépôt) la comparaison des R_f entre les taches d'extrait avec des témoins connus permet l'identification de la nature des composés [48]. Dans la chromatographie préparatrice, La bande qui contient le produit purifié est grattée, la silice est dissoute dans un solvant, puis filtré, le filtrat obtenu il est ainsi à l'état pur.

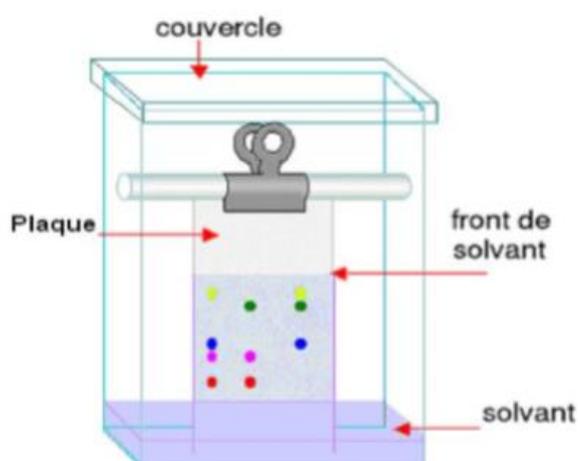


Figure 7. Développement chromatographique d'une plaque

I.7.1.2. Chromatographie liquide à haute performance**Principe**

La chromatographie liquide haute-performance (CLHP) est une puissante technique de séparation utilisée pour l'identification, la quantification et/ou la purification (chromatographie semi-préparative ou préparative) des composés dans un mélange. Ce dernier est mis en solution dans la phase mobile (solvant) puis est injecté sous haute pression en tête de la colonne (tube en acier inoxydable contenant la phase stationnaire) [50, 51]. Il existe plusieurs types de phases stationnaires mettant en jeu des mécanismes de rétention variés les temps de rétention diminuent avec la polarité des analytes [52] et peuvent être ajustés en utilisant un gradient d'élution combinant l'eau et un solvant organique (notamment le méthanol et l'acétonitrile) comme phase mobile. Cette méthode détriment de la phase normale du fait d'une meilleure reproductibilité des temps de rétention. Ceux-ci, spécifiques de chaque constituant, sont fortement dépendants de la nature de la phase stationnaire, de la composition de la phase mobile et des conditions opératoires (débit, pression et température).

Les couplages CLHP/SM en utilisant un spectromètre de masse par désorption de champ dont les multiples inconvénients – notamment ceux liés à la préparation de l'échantillon – en ont restreint l'utilisation. L'une des avancées majeures a été le développement de l'ionisation chimique directe avec cette technique, l'échantillon déposé sur un émetteur chauffé est placé directement dans le gaz réactant. Les ions générés sont résorbés et accélérés jusqu'au spectromètre de masse.

I.7.1.3. Chromatographie en phase gazeuse**Principe**

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique permettant de séparer et d'identifier (technique couplés GC-MS) les composés d'un mélange. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Dans la CPG la phase mobile est gazeuse. Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne. La phase stationnaire dans la colonne peut être solide ou liquide. Le mélange est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres après un certain intervalle de temps dépendant de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est le détecteur. Il évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux et envoie un signal électronique vers un enregistreur [53].

I.7.2. Spectrométrie d'infrarouge**Principe**

La spectrométrie infrarouge est une méthode utilisée pour identifier les différents groupes de métabolites secondaires des plantes. La méthode est basée sur l'excitation des molécules par des radiations infrarouge. L'absorption des rayonnements de nombres d'ondes comprises entre 4000 et 400 cm entant qu'énergie de vibration moléculaire modifie à la fois les états de rotation et de vibration des molécules [54].

La spectrométrie d'IR est basée sur l'absorption ou la réflexion par l'échantillon des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 50 μm .

Dans le proche et moyen IR, l'absorption de la lumière par la matière a pour origine l'interaction entre les radiations de la source lumineuse et les liaisons chimiques. Les atomes situés aux deux extrémités d'une liaison sont animés d'un mouvement de vibration l'un par rapport à l'autre et s'ils sont différents ils forment un dipôle électrique oscillant à cette même fréquence.

Si on irradie à cette même fréquence, il y aura absorption (accord entre fréquence mécanique et électromagnétique) [54].

II. Composition phytochimique et effet d'une plante médicinale sur la cristallisation lithiasique phosphorique

La formation d'un calcul est une succession d'étapes dont le déroulement dépend de plusieurs facteurs tels que la sur saturation.

Dans les urines la pression et température peuvent être considérées comme constantes, le pH est le principal modificateur de la solubilité des substances qui y sont sensibles. Le rein produit donc des urines sursaturées en plusieurs solutés cristallisables dont la concentration est supérieure au produit de solubilité, c'est le cas de phosphocalcique. Ceci ne conduit pas nécessairement à la formation des cristaux car les urines contiennent des substances qu'on appelle "inhibiteurs de cristallisations" qui contrebalance l'action des promoteurs donc la formation de calculs apparaît comme une rupture d'équilibre permanente intermittente ou occasionnelle entre deux groupe de substances: les promoteurs et les inhibiteurs de cristallisation. Les promoteurs les plus importants sont les ions calcium, oxalate, phosphate et acide urique.

La première conséquence de la rupture d'équilibre entre promoteurs et inhibiteurs est une augmentation de la fréquence de la cristallisation, aisément constatée par l'examen périodique des urines du réveil des sujets lithiasiques récidivants. En plus des substances chimiques comme inhibiteurs, il a aussi les inhibiteurs naturels (les plantes médicinales) qui font l'objet de notre étude.

II.1. Analyse par spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier (IRTF)

Cette technique permet l'analyse de composés en observant les nombres d'ondes des résonances des différents atomes. Chacun ayant un nombre d'onde propre, la connaissance de ces nombres d'ondes permet de déduire la nature du produit étudié. Pour cela, on balaye la gamme des nombres d'ondes de 4000 à 400 cm^{-1} et on observe l'intensité du signal transmis. Lorsque le nombre d'onde émise correspond à celle d'un des oscillateurs, le signal est plus ou moins absorbé.

Le choix d'une technique d'analyse à mettre en œuvre pour la caractérisation qualitative du principal témoin de la maladie qui est le calcul est une caractérisation par spectrophotométrie IRTF.

II.2. Données spectroscopiques IRTF sur la lithiase phosphocalcique

Les phosphates de calcium englobent plusieurs familles de molécules dont les structures ne sont pas toujours parfaitement définies. Cinq constituants différents sont observés dans les calculs urinaires : deux sont fréquents, l'apatite et la struvite. La brushite est rare. Les deux autres constituants sont exceptionnels : whitlockite et newberyite.

Les apatites ou phosphates de calcium basiques cristallisent dans le système hexagonal [55]. Les apatites, à l'exception de la whitlockite sont caractérisées par une bande large entre 3600 et 3100 cm^{-1} correspondant à l'absorption des groupements OH. La vibration de valence de l'ion PO_4^{3-} , s'exprime sous la forme d'une large bande épaulée vers 1095 cm^{-1} et pointée entre 1035 et 1025 cm^{-1} . Les apatites existent sous plusieurs formes cristallines.

II.2.1. La carbapatite

La carbapatite est caractérisée par la présence d'ions carbonates peu nombreux incorporés dans le réseau cristallin. Elle très souvent associée au phosphate amoniac-magnésien. Ces est derniers créent sur le spectre infrarouge l'apparition de bandes supplémentaires à celles observées pour les apatites simples : ce sont les nombres d'ondes de valence de l'ion carbonate observables à : 1460 et 1419 cm^{-1} [56].

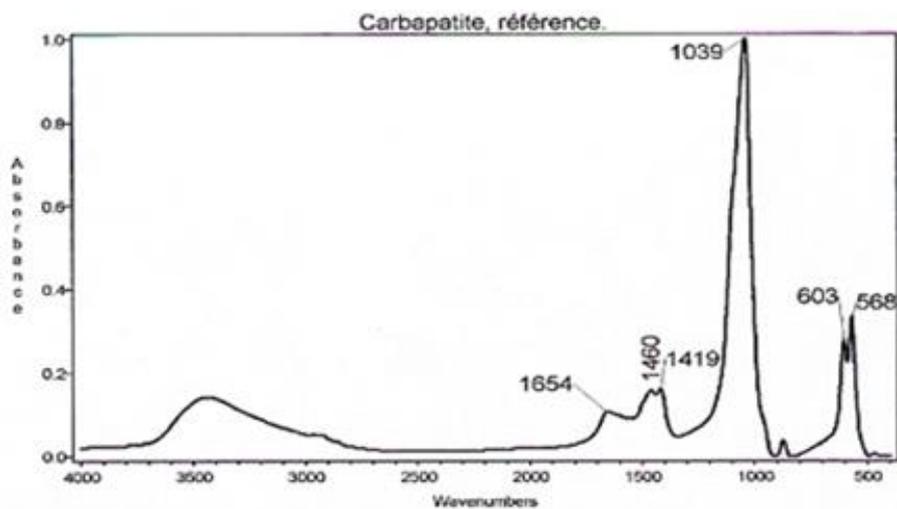


Figure 8. La carapatite

Tableau 2. Principales nombres d'ondes de vibrations de la carapatite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques (cm ⁻¹)
Carapatite	$\text{Ca}_{10-x+y}\text{M}_x\text{y}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2+2y-x}(\text{CO}_3)_x$	CA	F: 1039 F: 603; f: 1460, 1419.
Pics observés (cm⁻¹)			
3436f; 1654f; 1460f; 1419f; 1039TF; 603m; 568m.			
Identification du constituant			
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Valence asymétrique des PO_4^{3-} à 1039cm⁻¹ forte, asymétrique à gauche, épaulée à 1100cm⁻¹. ✓ Bandes symétriques faible de PO_4^{3-} à 960 cm⁻¹ ✓ Valence carbonate 1460 et 1419 cm⁻¹ 			

II.2.2. L'hydroxyapatite

L'hydroxyapatite est plus commun des phosphates de calcium. Il a la propriété importante de précipiter rapidement à pH alcalin. Il existe peu de calculs purs d'apatites. Les apatites forment plutôt des masses granuleuses dans les calculs d'oxalate de calcium ou de la struvite [57].

L'hydroxyapatite est souvent un constituant minoritaire qui apparaît sous forme de dépôt superficiel dans des calculs d'acide urique ou cystinique ou encore dans le nucleus de calculs oxaliques [57].

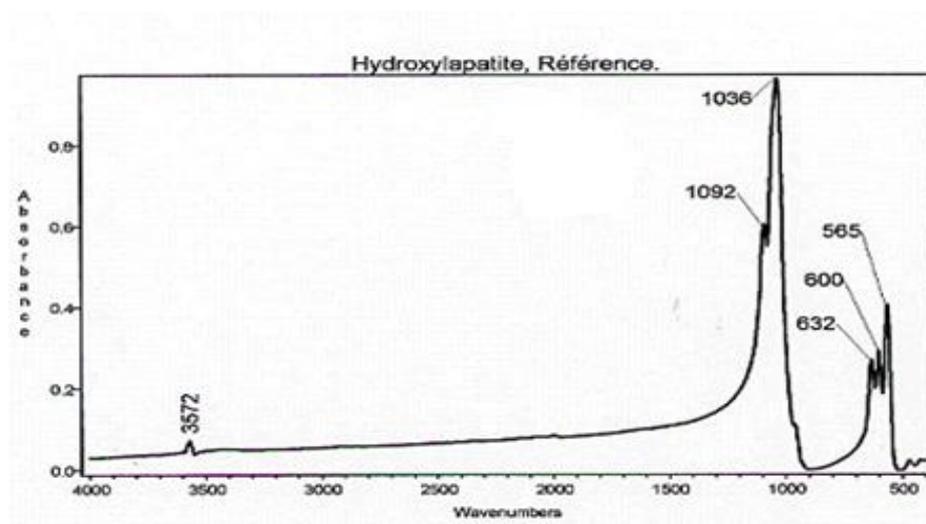


Figure 9. Hydroxyapatite

Tableau 3. Principales nombres d'ondes de vibrations de l'hydroxyapatite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques (cm ⁻¹)
hydroxyapatite	Ca ₉ Mg(PO ₄) ₆ HPO ₄ .nH ₂ O	AP	TF: 1036 ; 1044 M : 1092
Pics observés (cm⁻¹)			
3572 f-1092m -1044 TF -1036TF -962f -632m -600m -565m			
Identification du constituant			
✓ Valence asymétrique PO ₄ ³⁻ à 1033 forte et large, asymétrique à gauche épaulée à 1100 cm ⁻¹			

II.2.3. La withlockite

La withlockite appartient à la famille des apatites et cristallise dans le système hexagonale [58]. C'est le phosphate tricalcique anhydre. Il proviendrait de la déshydratation in situ de l'hydroxyapatite. Elle est peu fréquente sa structure est très voisine de celle des apatites. Elle est surtout connue par dédoublement à 1076 cm^{-1} et 1027 cm^{-1} [60].

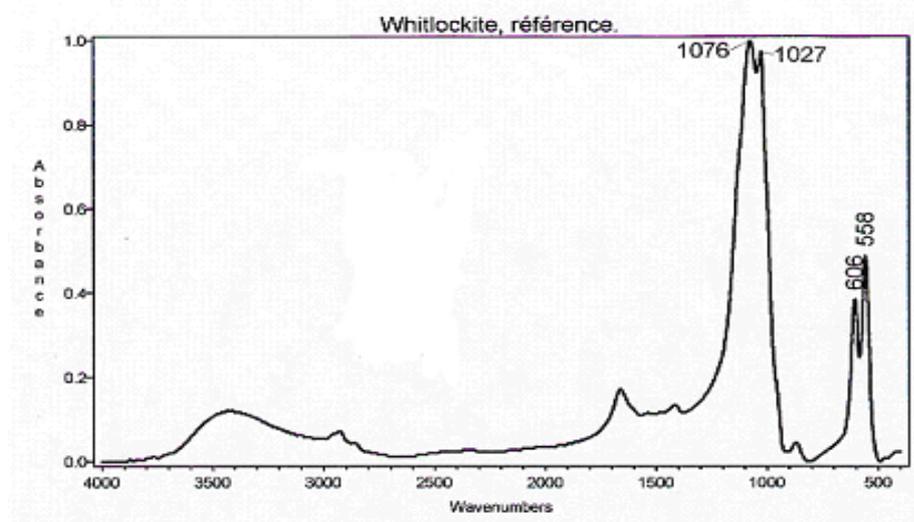


Figure 10. La Whitlockite

Tableau 4. Principales nombres d'ondes de vibrations de la withlockite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques (cm^{-1})
Withlockite	$\text{Ca}_2\text{Mg}(\text{PO}_4)_6\text{HPO}_4$	WK	Double pics TF: 1076 et 1027.
Pics observés (cm^{-1})			
3420f; 1662f; 1076F; 1027f; 992f; 606m; 558m.			
Identification du constituant			
✓ Bande large bifide des PO_4^{3-} à 1027 et 1076 cm^{-1} épaulée à 992 cm^{-1}			

II.2.4. Phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)

Le phosphate de calcium amorphe carbonaté est un constituant friable. Il n'a pas une signification particulière chez les sujets sains. En revanche, chez les lithiasiques, c'est un indicateur d'un risque de récurrence. Il se distingue de la carbapatite sur les spectres IRTF par l'absence d'une bande fine à 600 cm^{-1} [60].

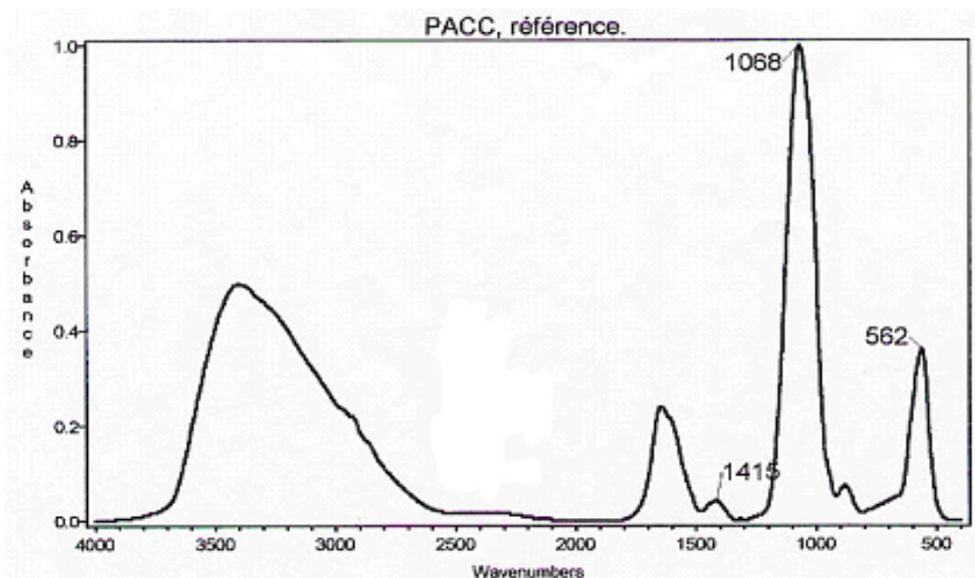


Figure 11. Phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)

Tableau 5. Principales nombres d'ondes de vibrations des bandes du PACC

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques (cm^{-1})
Phosphate de calcium amorphe carbonaté	$\text{Ca}(\text{PO}_4)_x(\text{OH})_y(\text{CO}_3)_{2,5}\text{H}_2\text{O}$	PACC	TF: 1068 cm^{-1} F: 1415 cm^{-1}
Pics observés (cm^{-1})			
3405m; 1645m; 1415f; 1068TF; 880f; 562m.			
Identification du constituant			
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bande phosphate, arrondi, forte, asymétrique, centrée sur 1068 cm^{-1} ✓ Pas de bandes fines à 600 cm^{-1}. 			

II.2.5. La struvite

La struvite est le phosphate ammoniaco-magnésien hexahydraté. Elle cristallise dans le système orthorhombique [61]. On ne l'observe jamais sous forme pure, mais elle s'associe dans les calculs hétérogènes dont les plus fréquents sont constitués par des phosphates ammoniaco-magnésien, de la carbapatite et de l'oxalate de calcium. Dans les calculs mixtes comportant de la struvite, la carbapatite est souvent le constituant majoritaire. Il est probable que d'autres facteurs importants interviennent pour expliquer la prédominance de la struvite ou de la carbapatite selon les cas.

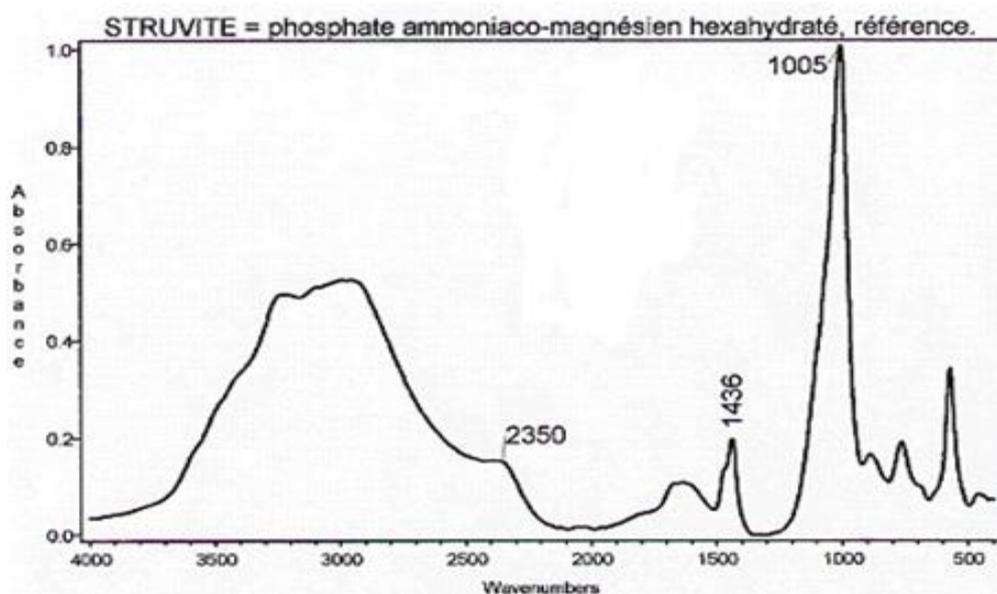


Figure 12. La Struvite

Tableau 6. Principales nombres d'ondes de vibrations de la struvite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques (cm ⁻¹)
Struvite	MgNH ₄ PO ₄ ·6H ₂ O	Str ou MAP	TF: 1005 ; m:2350 (plateau) m : 1436
Pics observés (cm⁻¹)			
2350m; 1638m; 1436m; 1005TF; 764f; 572m.			
Identification du constituant			
<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bande phosphate à 1005 cm⁻¹, concave à gauche ✓ Déformation de l'ion ammonium à 1436 cm⁻¹ ✓ Plateau des molécules H₂O + ion NH₄⁺ à 2350 cm⁻¹. 			

II.2.5. Le phosphate octocalciquepentahydraté (O.C.P)

Le spectre de référence du phosphate octocalciquepentahydraté (O.C.P) est donné par la figure 13.

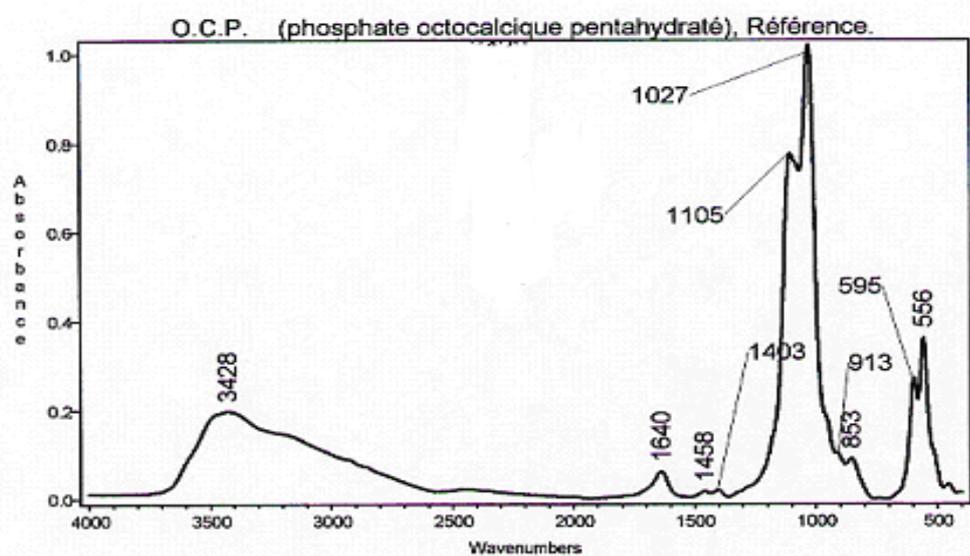


Figure 13. Phosphate octocalciquepentahydraté (O.C.P)

Tableau 7. Principales nombre d'ondes de vibrations de l'O.C.P

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques (cm ⁻¹)
Phosphate octocalcique pentahydraté	Ca ₈ (PO ₄) ₄ (HPO ₄) ₂ ·5H ₂ O	O.C.P	TF: 1105 cm ⁻¹ m: 1027 cm ⁻¹ m : 913 cm ⁻¹
Pics observés (cm⁻¹)			
3428F; 1640f; 1105F; 1027TF; 913TF; 595m; 556m.			
Identification du constituant			
✓ Valence phosphate à 1027cm ⁻¹ , asymétrique à gauche, épaulement à 1105 cm ⁻¹			

Chapitre II

Méthodes et matériels

I. Matériel végétal : mélange entre les tiges d'Acacia Horrida

Acacia horrida (L.) Willd (ou Gommier du Cap) est un arbuste ou arbre indigène dans la brousse sèche ou humide des zones tropicales à subtropicales de l'Afrique de l'Est [62] de la famille des Mimosacée. Il est appelé communément Gommier du Cap et, au Maroc, talh roumi.

Il peut atteindre 4 à 6m de haut quand son développement est laissé libre. Il est très communément doté d'épines stipulaires de 9.5cm de longueur sur les tiges et les rameaux. Les feuilles sont bipennées, de couleur vert pâle, glauques, composées, alternes, avec de nombreux folioles.

Les glomérules de fleurs jaunes groupées en courtes grappes donnent ensuite des gousses aplaties et oblongues, contenant des graines de couleur noire [62, 63].



Figure 15. Matière végétale

II. Caractérisation de l'extrait de la plante médicinale

III. 1. Analyse IR

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été réalisée dans l'intervalle 400 - 4000 cm^{-1} , grâce à un spectromètre du type IR-Prestige 21 SHIMADZU.

II. 2. Point de fusion

La prise du point de fusion du matériau au banc Kofler. Pour effectuer la mesure, on commence par déposer une pointe de spatule de matériau sec et finement broyé à l'extrémité froide de la plaque. On commence alors à déplacer le solide vers la zone chaude. Pour cela on utilise la pointe de la petite

spatule fournie avec le banc. Il faut que le déplacement du solide soit assez lent pour laisser à l'équilibre thermique entre le solide et la plaque le temps de s'établir. On repère la température de fusion à l'apparition de la première goutte de liquide. On la relève en déplaçant horizontalement le chariot jusqu'à ce que le curseur soit à la frontière entre solide et liquide. La température de fusion est alors indiquée par l'index mobile [64].

II. 3. Screening phytochimique

Les techniques de détection utilisables pour un screening des substances actives doivent être rapides, simples, reproductibles et sensibles afin de ne mettre en œuvre qu'une faible quantité de matière végétale la détection de quelques groupes chimiques. Elles n'ont d'ailleurs qu'une valeur indicative, et une confirmation ultérieure par des méthodes plus précises et plus sélectives est indispensable [65].

II. 3.1. Détection des alcaloïdes

1g de l'organe végétal laissé en décoction dans 10ml d'eau distillée pendant 10 minutes. Le macéré est filtré et testé avec quelques gouttes de réactif de MEYER et de WAGNER. Les alcaloïdes forment avec un précipité blanc avec le réactif de MEYER, tandis qu'ils forment un précipité brun avec le réactif de WAGNER [66].

Réactif de MEYER

Le réactif de MEYER est constitué de deux solutions

Solution A : 1,355g de chlorure de mercure dissoute dans 20ml d'eau distillée.

Solution B : 5g d'iodure de potassium dissoute dans 20ml d'eau distillée.

Réactif de WAGNER : c'est un mélange composé de 1.27g d'iode et 2g d'iodure de potassium dissout dans 75ml d'eau distillée. Ce mélange est jaugé jusqu'à l'obtention de 100ml de la solution.

II. 3.2. Détection des flavonoïdes leuco-anthocyanes

Une pesée de 5 à 10g de drogue fraîche, grossièrement broyée sont portés à l'ébullition pendant 5 minutes dans 100ml d'eau. Après refroidissement et filtration à 5ml du filtrat, on ajoute 5ml d'alcool chlorhydrique (5ml d'alcool éthylique à 95%, 2ml d'eau distillée, 2ml d'acide chlorhydrique HCl 32%), 0,5g environ de copeau de magnésium et quelques gouttes d'alcool iso amylique.

L'apparition de la coloration rose, orange ou rouge dans la couche surnageant d'alcool iso amylique indique la présence des flavonoïdes. La même réaction effectuée sans ajout de magnésium et en chauffant pendant 2 minutes au bain-marie permet la caractérisation de leuco anthocyane. Elle est positive s'il y a apparition d'une coloration rouge [67, 68].

II. 3.3. Détection des saponines

5g de matière végétale grossièrement broyée on fait une décoction dans 50ml d'eau pendant 15 minutes, on prélève dans un autre tube à essai 10ml de filtrat qu'on agite vigoureusement, on laisse reposer le tube pendant 10 minutes, la persistance de mousse après 10 minutes indique, la présence de saponines dans l'échantillon [67].

II. 3.4. Détection des tannins

A 5ml du décocté précédant, on laisse tomber quelques gouttes de chlorure ferrique 1%. L'apparition d'une coloration particulière ou d'un précipité indique la présence de tanins dans la drogue [69, 70].

II. 3.5. Détection des anthraquinones libres

Extrait chloroformique : on ajoute une pesé de 1g de poudre de la plante à 10ml de chloroforme. On filtre après chauffage du mélange au bain marie pendant 3 minutes. On complète à 10ml si nécessaire. Le mélange est agité après l'introduction de 1ml d'extrait chloroformique et 1ml de NH_4OH dilué.

Le virage de la couleur de la phase aqueuse au jaune, rouge ou violet indique la présence des quinones libres.

II. 3.6. Test de protéine

Le nom de la méthode vient du fait que le 'biuret' est la plus petite molécule qui puisse réagir pour ce test caractéristique.

Cette réaction caractérise la liaison peptidique ; elle s'applique donc à l'analyse qualitative des protéines et des peptides (à condition que ces derniers comportant au moins quatre acides aminés afin d'obtenir trois liaisons peptidiques).

Protocole :

A une solution peptidique, ajouter de l'hydroxyde de sodium (Na^+ , OH^-) et du sulfate de cuivre (Cu^{2+} , SO_4^{2-}). Le test est positif lorsqu'une couleur violette (ou rose) apparait.

Nous avons effectué un tube à essais témoin, il n'est composé que des réactifs : la solution de soude (Na^+ , OH^-) à 0,113 mol/L et la solution de sulfate de cuivre (Cu^{2+} , SO_4^{2-}) à 1%.

II. 4. Etude de la solubilité en fonction des solvants

La solubilité d'un composé peut être définie de la façon suivante : une quantité maximale (g ou mol) de soluté dissous dans 1 litre de solution saturée selon des conditions précises de température, de la nature du solvant et du soluté.

Pour cela, on a procédé au mode opératoire suivant :

Prendre une masse du produit de 0,174g et l'introduire dans un volume de solvant égal à 5 ml, on changeant à chaque fois le solvant ou les mélanges de solvants avec des différents pourcentages, sous une agitation constante et à la température ambiante et voir le temps nécessaire pour une solubilité totale.

Tableau 9. Les solvants organiques et les pourcentages de solvants utilisés en test de solubilité

Le solvant	Cyclohexane/acétate d'éthyle		Acétate d'éthyle/acétone	Toluène/acétate d'éthyle	
Le pourcentage	50/50	20/80	50/50	50/50	80/20

Dichlorométhane/acétone	Acétone	Acétate d'éthyle
20/80	100%	100%

III. Extraction

III. 1. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes

Les composés phénoliques et flavonoïdes ont été extraits à partir des feuilles de cette plante par la méthode préconisée en médecine traditionnelle (décoction) et par la méthode de soxhlet.

III. 1.1. Décoction (figure 16)

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par KONKON [71] en y apportant quelques modifications.

Le protocole de cette extraction est le suivant :

On ajoute 10 gramme de la poudre de la plante à 200ml eau distillée. Le mélange est chauffé pendant 30 minutes. Après refroidissement, le mélange est filtré sur un papier filtre Wathman1.

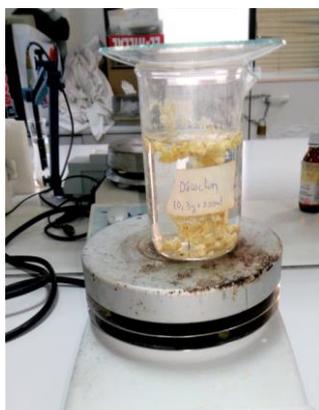


Figure 16. Décoction

III. 1.2. Extraction au Soxhlet (figure 17)

La poudre de la plante 5g est introduite dans la cartouche en papier filtre, cette dernière sera placée dans le Soxhlet surmonté d'un réfrigérant. En premier lieu, verser 150ml d'acétate d'éthyle dans le ballon et porté à ébullition. Après une douzaine de siphonages, le solvant s'enrichi en substances solubles. Le ballon contenant le résidu sec est pesé avant et après extraction afin de déterminer le rendement [72].



Figure 17. Montage au soxhlet

III. 1.3. Evaporation (figure 18)

La solution obtenue a été évaporée à l'aide d'un évaporateur rotatif, ou rotavap qui permet a éliminé le solvant sous vide.

Le principe du rotavapeur est basé sur la distillation du macérât sous vide.

Le mode d'emploi de cet appareil est le suivant [73] :

Placer le macérât à évaporer dans le ballon d'évaporation et mettre sous rotation. Ouvrir le robinet d'eau froide relia au réfrigérant et fermer ensuite la vanne reliant le montage à la pression extérieure (vanne de fermeture) et faire le vide à l'intérieur de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau.

Si l'évaporation n'est pas assez rapide, plonger le ballon d'évaporation contenant le macérât à évaporer dans le bain marie d'eau chaude et procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant. En fin, Ouvrir la vanne de fermeture pour remettre la pression atmosphérique à l'intérieur du dispositif et Fermer ensuite la vanne reliant le montage à la pression extérieure (vanne de fermeture) et faire le vide à l'intérieur de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau.



Figure 18. Evaporateur rotatif

Détermination du rendement

Le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein (après évaporation) et le poids du ballon vide (avant évaporation) [74].

Le rendement R en huile essentielle est déterminé par rapport à 100g de matière végétale.

$$R\% = \frac{\text{masse d'extract sec}}{\text{masse de la matière végétale}} \times 100$$

III. 2. Extraction des composés volatils et odorants (Hydro-distillation) (figure 19 et 20)

Les composés volatils et odorants de cette plante ont été extraits par la méthode de l'hydro-distillation.

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par KONKON [71] en y apportant quelques modifications :

Réaliser le montage ci-dessous et placer, dans le ballon, 200mL d'eau déminéralisée et 12,6g de clous de la plante préalablement broyés et mettre en fonction le réfrigérant en réglant le débit d'eau et mettre le contenu du ballon à chauffer (ébullition douce). Après que la distillation termine, recueillir 60mL de distillat. Celui-ci présente deux phases : Une phase huileuse, riche en huile essentielle et une phase aqueuse formée à partir de l'eau issue de l'hydro-distillation.

Ces deux phases sont intimement mélangées car l'huile essentielle et l'eau ont des densités très voisines. Pour recueillir l'huile essentielle, il est nécessaire d'alourdir la phase aqueuse. Pour cela, procéder à l'étape de relargage.

Pour cela, ajouter au distillat 30g de chlorure de sodium et agiter doucement jusqu'à dissolution complète du sel (tiédir la solution si nécessaire) et verser ensuite le distillat dans l'ampoule à décanter et laisser décanter pendant une nuit. L'huile essentielle se rassemble à la surface. Au final, éliminer lentement la phase aqueuse par le bas de l'ampoule.



Figure 19. Montage d'extraction par hydro-distillation



Figure 20. Relargage

III. 3. Analyse des concrètes par spectrophotomètre UV-visible

Dans les composés, chaque fonction absorbe la lumière à une longueur d'onde bien déterminée, appartenant au domaine UV-visible. Dans notre des concrètes et confirmer ainsi la réussite de l'extraction. Cette technique a été utilisée pour déterminer la présence de groupements fonctionnels actifs soumis à un balayage en spectrophotométrie entre 220 et 800nm.

III. 4. Mesure de L'indice de réfraction des concrètes

La mesure de l'indice de réfraction a été faite par un réfractomètre d'Abee de maque carl Zeiss

Principe

On place l'échantillon (en chimie liquides seulement) dont on veut déterminer l'indice de réfraction sur un prisme organique, on mesure, en pratique, l'indice de réfraction des de verre d'indice très élevé et supérieur à celui mesuré, on illumine ce dernier par un éclairage diffus et on lit directement sur l'appareil.

L'indice de réfraction du liquide étant inférieur à celui du verre du prisme, il existera dans le prisme une zone totalement obscure.



Figure 21. Réfractomètre

IV. Etude de la cristallisation des phosphates

Nous avons adopté pour l'étude de la cristallisation des phosphates le modèle classique, il présente en plus de sa simplicité, une reproductibilité très satisfaisante.

Ce modèle comporte l'étude de la cristallisation sans inhibiteur et avec inhibiteur afin d'apprécier quantitativement l'effet du pouvoir d'inhibition de chaque substance chimique étudiée.

Mode opératoire

La précipitation de la phase solide des phosphates à partir de l'urine artificielle a fait l'objet de nos investigations à $\text{pH} = 7$. L'urine artificielle est préparée en mélangeant deux volumes égaux de deux solutions A et B (Tableau 10). Le mélange des deux solutions donne l'urine artificielle à un $\text{pH} = 7$. Pour ajuster le pH , on procède à l'addition de HCl ou NaOH à la solution B.

Dans un premier temps, les deux solutions sont ramenées à 37°C dans un bain thermostaté, 80 ml de la solution A sont versés dans un Erlen Meyer sous agitation à une température constante de 37°C , puis 80ml de solution B sont versés dans le même Erlen Meyer qui est ensuite couvert afin d'éviter l'évaporation. L'agitation du mélange pour chaque expérience est maintenue constante dans le but d'empêcher la sédimentation.

L'évolution de la masse des cristaux est suivie par la pesé des filtrats à différents intervalles de temps.

Après chaque temps de cristallisation, le volume entier du mélange est filtré, le précipité récupéré, séché à l'air libre, ensuite soumis aux analyses infrarouges.

Tableau 10. Composition de l'urine artificielle

Composition de solution A		composition de solution B	
Composé	Concentration (g/l)	Composé	Concentration (g/l)
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	11.02	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.65
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.46	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	18.82
NH_4Cl	4.64	NaCl	13.05
Ca^{2+}	0.24	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0
KCl	12.13	$\text{C}_2\text{H}_5\text{O}_4$	0.05

IV. 1. Inhibition de la cristallisation des phosphates de l'urine artificielle à pH=7

Afin de mettre en évidence des inhibiteurs potentiels pour les phosphates d'une part, et essayer de comprendre les mécanismes d'action de ces inhibiteurs sur les étapes de la cristallisation des phosphates (nucléation, croissance, agrégation) d'autre part, nous avons testé des inhibiteurs naturels, en l'occurrence, les plantes médicinales. La même procédure que dans le cas sans inhibiteur est suivie. Toutefois, Il faut ajouter des volumes correspondant aux concentrations physiologiques à la solution B avant de mélanger les solutions (A et B) à 37°C. Les courbes d'évolution de la masse des cristaux en fonction du temps obtenues sont du même type que celles sans inhibiteur.

Le modèle de cristallisation des phosphates avec inhibiteur adopté dans notre travail est le même que sans inhibiteur. Nous avons déterminé la masse des cristaux en fonction du temps et en présence de l'inhibiteur (plante médicinale) pour apprécier l'effet de ce dernier.

Une série d'expériences correspondant aux concentrations physiologiques de 4, 12, 20, 28 et 40mL en plante médicinale été réalisée afin de couvrir la plage d'excrétion physiologique. Cette opération a été effectuée en ajoutant seulement des volumes des plantes médicinales à la solution B.

Le pH du mélange est ajusté au début de chaque expérience avec de l'acide chlorhydrique ou la soude selon le besoin. A la fin de chaque manipulation, le pH est mesuré, car la cristallogénèse dans ces conditions dépend du pH.

Nous avons adopté une durée d'expérience de cent cinquante minutes pour un pH = 7. Le suivi de la masse des cristaux par prélèvement de 20mL, filtration, et la pesé du produit a été effectué à des intervalles de temps de 15, 30, 60, 90,120 et 150 minutes.

A la fin des expériences, les précipités collectés sont soumis aux analyses IRTF pour déterminer la structure des composants formés ou éventuellement disparus.

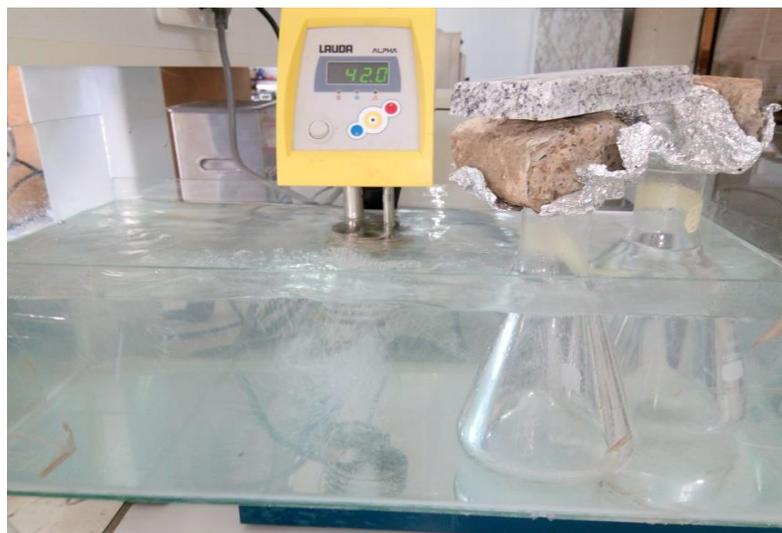


Figure 22. Bain thermostaté

Références bibliographiques

- [1] GURIBFAKIM A., 2006 Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine, Vol. 27: 193
- [2] Bahorun, T. (1997). Substances Naturelles active s. La flore Mauricienne .une source d'approvisionnement potentielle. Food and Agricultural Research council Mauritiias. p8394.
- [3] Atik Bekkara F., Bousmaha L., Taleb Bendiab S.A., Boti J.B. Et Casanova J., 2007 Composition chimique de l'huile essentielle de Rosmarinus officinalis L poussant à l'état spontané et cultivé de la région de Tlemcen. Biologie & Santé, 7 : 611
- [4] [www.passeportsante.net/santé au naturel/thérapies](http://www.passeportsante.net/santé%20au%20naturel/thérapies)
- [5] Zeghad N.(2009) Etude du contenu polyphénolique de 2 plantes médicinales d'intérêt économique Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne . Thèse de magister. Université Mentouri Constantine
- [6] (<http://sante.lefigaro.fr/sante/specialite/homeopathie/quest-ce-que-cest> consulter le 11/02/2019)
- [7] (HALBERSTEIN Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. 2005 Oct;15(9):686-99
- [8] Odile C and Daniel R. (2007) Botanique Pharmacognosie Phytothérapie. 3eme Edition, Wolters Kluwer France: 141
- [9] (Larousse des plantes médicinales, 2001)
- [10] Berton H. (2001) Sorcellerie en Auvergne : Sorciers, guérisseurs, médecine magiques et traditionnelles. Editions De Borée (Clermont-Ferrand), France : 288
- [11] Classification décimale universelle: Classes 6 à 9, 2004
- [12] Kémajou A., Mba L., Bagda A .A (2012) Effet du séchage sur les principes actifsCdes plantes médicinales: cas des alcaloïdes totaux des écorces de Alstonia boonei Wild, plante antipaludéenne. Nature & Technologie. N° 07
- [13] CHEMAT F., 2011- Eco-extraction du végétal procédés innovants et solvants alternatifs. Dunod, Paris.
- [14] Pierre M., Lis .M (2007) Secrets des plantes. Editions Artemis, Paris 1: 463 Proksch P. (2002) Artemisia herba-alba. In: Wright CW (ed.) Artemisia, London & New York: Taylor & Francis: 81-86
- [15] Sofowera A. (2010) Plantes médicinales et médecine traditionnelle d'Afrique. Karthala, Economie et Développement. Paris: 384
- [16] ELKALAMOUNI C., 2010 - Caractérisation chimique et bio organiques d'extraits de plantes aromatiques. Thèse de doctorat en sciences des agroressources université de Toulouse.375p
- [17] PIOCHON M., 2008- Etude des huiles essentielles d'espèce végétale de la fiore laurentinne : composition chimique activités pharmacologique et hémisynthèse mémoire de magistère, université du quebec à chicoutimi canada
- [18] HAJJI S., BELIVEA J., SIMON D., 1985- Comparative study of an essential oil obtained according to two different extraction procedures: stean distillation and hydro diffusion (Actes – colloq. Int. plant. aromat.med .maroc.pp229.230
- [19] NAIT ACHOUR K., 2012- Etude de la composition chimique des essences de quatre espèces eucalyptus poussent dans la région de tizi ouzou. mémoire de magistèr.université mouloud Mammeri tizi ouzou
- [20] MANSOUR A., 2009- Investigation photochimique de l'extrait n- butanol de l'espèce centaurea AFricanai

- [21] SANDRINE L., 2004- Lyon ; Diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de Légumineuses. Thèse de doctorat
- [22] Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, thèse doctorat, muséum national d'histoire naturelle. 32p
- [23] HOPKINS. WILLIAM G., 2003 - Physiologie végétale de bock université 2^{ème} édition. p276.268
- [24] BRUNETON J., 1999- Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 3^e édition revue, Paris. extraits des graines de *Nigella sativa*. Mémoire de magister .Setif
- [25] Crozier, A., Clifford, M. N., et Ashihara, H. (Eds.). (2008). Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. John Wiley & Sons
- [26] Tsimogiannis, D. I., et Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1): 140-146
- [27] Mukohata, Y., Nakabayashi, S., et Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS letters*, 85 : 215-218
- [28] Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2): 67-202
- [29] Edenharter, R., et Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 540(1): 1-18
- [30] Yao, L. H., Jiang, Y. M., SHI, J., Tomas-Barberan, F. A., Datta, N., Singanusong, R., et Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)*, 59: 113-122
- [31] Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of natural products*, 59(2): 205-215
- [32] Scalbert, A., Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130, 2073-2085
- [33] Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4): 564-582
- [34] Aruoma, O. I., Murcia, A., Butler, J., et Halliwell, B. (1993). Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(11): 1880-1885
- [35] Seeram, N. P., Lee, R., et Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinica Chimica Acta*, 348(1): 63-68
- [36] Macheix J J, Fleuriet A et Jay-Allmand C. (2005). Nature et diversité des composés phénoliques. IN : les composés phénoliques des végétaux, un complexe de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, CH-105 Lausanne. 1-3
- [37] Schofield, P., Mbugua, D. M., et Pell, A. N. (2001). Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 91(1): 21-40
- [38] Middleton, E., Kandaswami, C., et Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, an cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4): 673-751
- [39] Ksouri, R., Megdiche, W., Debez, A., Falleh, H., Grignon, C., et Abdelly, C. (2007). Salinity effects on polyphenol content and antioxidant activities in leaves of the halophyte *Cakile*

- maritima. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(3): 244-249
- [40] Hennebelle, T., Sahpaz, S., et Bailleul, F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 2(1): 3-6
- [41] Hodek, P., Trefil, P., et Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*, 139(1): 1-21
- [42] Van Acker, S. A., van Balen, G. P., van den Berg, D. J., Bast, A., et van der Vijgh, W.J. (1998). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical pharmacology*, 56: 935-943
- [43] Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., et Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12): 4505-4515
- [44] Yoshida, H., Ishikawa, T., Hosoi, H., Suzukawa, M., Ayaori, M., Hisada, T., et Nakajima, K. (1999). Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochemical pharmacology*, 58: 1695-1703
- [45] SOUTHERN I.W.J. BUCKING (EDS) 1989-dictionary of alkaloids London and hall.in livre Hopkins WG P281
- [46] LAMARTI A., BADOUC A., DEFFIEUX G., CARDE J. P., 1994- Biogenèse des monoterpènes : la chaîne isoprénique, *bull. soc. Pharm. bordeaux*, 133, 79 – 99
- [47] SMALLFIELD B., 2011- Introduction to growing herbs for essential medicinal and culinary purposes. *Crop & food research*.p.45.4
- [48] HAINQUE B. BRUNO B. ET PHILIPPE L.,, 2008- appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire.
- [49] ANDRIAMIALIHARISOA R.F., 2011- Métabolites secondaires particuliers des feuilles de cinq populations de mascarocoffea Et des endophytes des feuilles de Coffea sp A315, mémoire magister, Université D'Antananarivo
- [50] DONG M.W., 2006- Modern HPLC for practicing scientists. 1ère éd. Wiley, 304 pages.
- [51] DONG M.W., 2006- Modern HPLC for practicing scientists. 1ère éd. Wiley, 304 pages.
- [52] ROSSET R., CAUDE M., JARDY A., 1991- Chromatographie en phase liquide et supercritique. Paris: éd. Masson, 919 page
- [54] BERTRAND D., DUFOUR E., 1987- La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques .Ed. Tec et doc, Paris. PP 55-193
- [53] PENCHEV P.I., 2010- Étude des procédés d'extraction et de purification de produits bioactifs à partir de plantes par couplage de techniques séparatives à basses et hautes pressions, thèse de doctorat université Toulouse
- [55] [10 Boyer H. Infrared spectrometry and raman microprobe in the analysis of urinary calculi. *Kedny Int* (1983), 23:842-850
- [56] Arora B., Selby P.H., Norman R.W., Peacock M., Robertson W.G. The effect of an increased of various constituents of a high animal protein diet on the risk of calcium Oxalate stone formation in men. In Schwille P.O., Smith L.H., Robertson W.G., Vahlensieck W (eds) *Urolithiasis and related chemical research*. New York, Plenum Press (1985), p: 85, 88.
- [57] Robertson W.G. Diet and calcium stones. *Miner electrolyte metab* (1987), 13: 228-234
- [58] Schwille P.O., Hanisch E., Scholz D. Postprandial hyperoxaluria and intestinal Oxalate absorption in idiopathic renal stone disease. *J.Urol* (1984), 132 : 650-655
- [60] [14] Wainer L., Resnick V.A., Resnick M. Nutritional aspects of stone disease in renal

stone disease PAK CYC (ed). Boston - Dordrecht, Martinus Nyhoff Publ (1987), p: 85-120.

- [61] [15] Kaid-Omar Z, Belouatek A, Drouich A, Taleb-Bendiab, Lacour B, Addou A, Daudon M. Effets de la cure diurèse sur l'expulsabilité spontanée des calculs urinaires, le pH urinaire et la cristallurie des patients lithiasiques. Progrès en Urologie (2001), 11, 450-457.
- [62] Nadjma Dharani, Field Guide to Accacias of East Africa, Struik Publishers, janvier 2006
- [63] Select Extra-tropical Plants Readily Eligible for Industrial Culture Or Naturalization By Ferdinand von Mueller
- [64] <http://culturesciences.chimie.ens.fr>
- [65] Wagner H., and Blatt S. (2001) Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography
- [66] WOME, 1985 : Recherche ethnopharmacologique sur les plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle à Kisangani. Tom I, Thèse inédit, Faculté des sciences, Université libre de Bruxelles. P 164. 306
- [67] FOURNET, A., 1979 : plantes médicinales congolaises
- [68] MABIKA, K., 1983 : plantes médicinales et médecine traditionnelle au Kasai-Occidental, thèse inédite, Fac. Sc, UNIKIS, 510p
- [69] DISASI, A., 1988 : étude phytochimiques et activité antibactérienne de quelques plantes médicinales de Kisangani (haut-zaire), mémoire inédit, Fac. Sc., pp1416
- [70] DELAUDE ,1969 : contribution à l'étude de la structure d'une saponine extraite d'une securidaceae Longipedunculata, thèse inédite, Université de Liège.
- [71] Konkon N G., Simaga D and Adjoungova A. (2006) Etude phytochimique de mitragyna inermis (willd.) o. ktze (rubiaceae), plante a feuille antidiabetique», Pharm Méd Trad Afr. Vol. 14, pp 73-80
- [72] [19] William, B.J., "The original of the soxhlet extractor", Journal of Chemical Education, Volume 84, n°12, Canada, (2007), pp 1913
- [73] <http://www.lachimie.fr/materiel/evaporateur.php>
- [74] Mohammedi Z. (2005) Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen. Thèse de Magistère. Université Abou Bakr Belkaïd, Tlemcen
- [75] Lafont, R., " Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules ", (2005), "<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html>