



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM

Faculté des Sciences exactes & informatique

Département de chimie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de : MASTER

Spécialité : chimie appliquée

Par

BOUZIANE KARIMA

GRIB FATIHA

Le thème

**Identification et caractérisation du principe
active d'une plante médicinale**

Soutenu le .../2022 devant le jury composé de :

Encadrant : Belouatek Aissa

.... Université Mostaganem

Co-encadrant : Bentedlaouti Kaouter

... Université Mostaganem

Président : Benmalti Mohamed el amine

... Université Mostaganem

Examineur : Hamiani Abdelkader

Université Mostaganem

Année universitaire: 2021/2022

Remerciement

Tout d'abord, Nous remercions bon **Dieu**, le tout puissant de nous avoir accordé le courage et la volonté pour accomplir ce modeste travail.

Nous adressons ensuite nos plus sincères remerciements à notre promoteur le professeur **Belouatek Aïssa** pour avoir accepté de nous 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 nous a consacré pour diriger ce travail et pour nous avoir accueillies au sein du laboratoire université Abdelhamid ibn Badis Mostaganem.

Nous remercions également le doctorant **K.Bentedlaoui** et **S.Baroudi** pour sa patience et ses conseils, Nous exprimons particulièrement toutes nos reconnaissances pour nous avoir fait bénéficier de ces compétences scientifiques, ses qualités humaines et sa constante disponibilité.

Nous remercions les membres de **jury** qui ont bien voulu accepter d'examiner ce mémoire et à cet égard nous leurs présentons nos Profonds respects, et notre grande gratitude.

Aussi, nous remercions les ingénieurs du laboratoire **HMIDA, TOUATI** et **TOUATIA** nos maîtres de travaux pratiques qui nous a formé et accompagné tout au long de cette expérience professionnelle avec beaucoup de patience et de pédagogie.

Nous rendons grâce à tous **les enseignants** du département De chimie, qui nous ont suivis durant notre cursus, et tous ceux qui ont contribué, à ce que ce travail prenne forme.

Dédicace

À nos chers parents, pour leurs sacrifices, et leurs conseils judicieux.

A nos frères et sœurs, nos famille.

*À tous nos amis à l'université de Abdelhamid ibn Badis de
Mostaganem et ailleurs, pour moment agréable que nous avons
passés ensemble.*

À tous ceux qui nous aidés durant notre formation.

Fatiha

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mon dieu

A mes chers parents

*Ma mère ; merci pour ton encouragement et ta bonne foi de
m'avoir donné tant de conseils pour parvenir à réaliser ce
travail*

*Mon père : merci pour ta volonté de me pousser à acquérir
plus de savoirs et de connaissance*

A mes sœurs : Asma, IKRAM, Fatima

A mes frères : Mohamed, Abdelkrim

Et toute la famille : Bouziane

A mes amies (CHACHO Fatima, CHIDADI djazya)

KARIMA

Résumé

Les plantes aux propriétés curatives sont utilisées depuis longtemps dans différents systèmes de médecine traditionnelle à travers le monde pour soigner de nombreuses maladies et troubles. Ces propriétés thérapeutiques sont dues à la présence d'une grande variété de métabolites secondaires actifs.

Nous avons effectué une étude détaillée sur cette plante pour évaluer ces différentes activités phytochimiques et biologiques et leur caractérisation. Pour atteindre nos objectifs, nous avons réalisé et comparé plusieurs méthodes d'extraction, effectué une caractérisation physique chimie et spectroscopique sur notre matière végétale, évalué des tests quantitatifs sur quelques métabolites secondaires, ensuite on a étudié les propriétés biologiques de notre plante tel que l'activité antioxydante, l'activité antibactérienne et la capacité d'inhibition des cristaux lithiasiques urinaires.

Les mots clés : plante, extraction, cristaux, antioxydant, antimicrobienne

الخلاصة

لطالما استخدمت النباتات ذات الخصائص العلاجية في أنظمة مختلفة من الطب التقليدي في جميع أنحاء العالم لعلاج العديد من الأمراض والاضطرابات. تعود هذه الخصائص العلاجية إلى وجود مجموعة متنوعة من المستقبلات الثانوية النشطة. لقد أجرينا دراسة مفصلة على النبة لتقييم مختلف الأنشطة، الكيمائية النباتية والبيولوجية وتوصيفها. لتحقيق أهدافنا، قمنا بتقييم ومقارنة عدة طرق للاستخراج، وإجراء توصيف فيزيائي وكيميائي وطيف على مادتنا النباتية، وتقييم الاختبارات الكمية على بعض المستقبلات الثانوية، ثم درسنا الخصائص البيولوجية على نباتنا مثل نشاط مضادات الأكسدة والنشاط المضاد للبكتيريا والقدرة على تثبيط بلورات تحص بولي.

الكلمات المفتاحية : نبات، استخلاص، بلورات، مضاد للأكسدة، مضاد للميكروبات

Abstract:

Plants with healing properties are used for a long time in different systems of traditional medicine around the world for treat many diseases and troubles. These therapeutic properties are due to the presence a wide variety of secondary metabolites assets.

We carried out a detailed study on this plant to assess these different activities Phytochemical and biological and their characterization. To achieve our goals, we have carried out and compared several methods extraction, carry out physical characterization chemistry and spectroscopic on our material vegetable, assess quantitative tests on some secondary metabolites, then we studied the biological properties of our plant such as antioxidant activity, antibacterial activity and the inhibition capacity of lithiasis crystals urinary.

Keywords: plants, extraction, crystals, antioxidant, antimicrobial

Liste des abréviations

UV: Ultra-violet

IR: Infra-Rouge

FTIR : infra-Rouge à transformée de Fourier

CA: Carbapatite

AP: hydroxyapatite

WK: Withlockite

PACC: phosphate de calcium amorphas carbonate

Str Map: Struvite

O.C.P: Phosphate pctocalcique pentahydraté

R : Rendement

°C : Degré Celsius

d : densité

µl : micro litre

% : Le pourcentage

Ic50 : La concentration inhibitrice médiane (50%)

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

DMF : N, N-Diméthylformamide

DMSO : Diméthyles

Liste des Figures

Figure 01 : Les classes des métabolites primaires	3
Figure02 : Structures chimiques des acides phénoliques	6
Figure 03 : Structures générale du flavonoïde.....	6
Figure 04 : Classification des tanins selon leur structure chimiques.....	7
Figure 05 : Classification des alcaloïdes.....	8
Figure 06 : les composés terpéniques	9
Figure 07 : La carapatite.....	15
Figure 08 : Hydroxyapatite.....	16
Figure 09 : Whitlockite.....	17
Figure 10 : La Brushit.....	18
Figure 11 : Phosphate de calcium amorphe carbonaté.....	19
Figure 12 : La struvite.....	20
Figure 13 : Phosphate octocalcique pentahydraté (O.C.P).....	20
Figure 14 : Différentes expérimentations.....	23
Figure 15 : Banc Kofler.....	24
Figure 16 :Test se solubilité.....	24
Figure 17 :La décoction.....	25
Figure 18 : Infusion	25
Figure 19 : Macération.....	26
Figure 20 : Appareillage de Soxhelt.....	26
Figure 21 : Extraction par micro-onde.....	27
Figure 22 : Extraction par ultrasons	27
Figure 23 :Rota vapeur	28
Figure 24 : Spectroscopie infrarouge IR.....	28
Figure 25 :Le pycnomètre.....	29
Figure 26 : Réfractomètre.....	30
Figure 27 : PH mètre.....	30
Figure 28 : Protocole de test les tanins.....	30
Figure 29 : Protocole de test les coumarines.....	31
Figure 30 : Protocole de test les flavonoïdes.....	31
Figure 31 : Protocole de test l'antraquinone	31
Figure 32 : Protocole de test les saponines.....	31
Figure 33 : Protocole de test les alcaloïdes.....	32
Figure34 : Protocole de test les glycosides	32
Figure 35 : Le protocole d'extraction des alcaloïdes	34
Figure 36 : Ampoule à décantes et l'extrait.....	35
Figure37 : La réduction du radical DPPH	36
Figure 38 : La solution DPPH	37
Figure 39 : Réduction de radical DPPH et UV-Vis.....	37
Figure 40 : Souches bactériennes utilisées et les boîtes de pétries	38

Figure 41 : Principe de diffusion sur disque	39
Figure 42 : Les boites de pétries contenant les disques séchés	39
Figure 43 :Bain thermostaté.....	41
Figure 44 : Spectre d'absorption IR de la plante végétal.....	44
Figure 45 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux.....	47
Figure 46 : Dosage des phénols totaux.....	47
Figure 47 : Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes totaux	48
Figure 48 : Dosage des flavonoïdes	48
Figure 49 : Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des tanins.....	49
Figure 50 : Dosage des tanins	49
Figure 51 : les alcaloïdes totaux	50
Figure 52 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique.....	51
Figure 53 : Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait	51
Figure 54 :Activité antibactérienne de l'extrait végétale sur les souches microbienne.....	53
Figure 55 : Spectre IRTF des phosphates à pH =6.5.....	54
Figure 56 : Spectre IRTF des phosphates à pH=8.....	55
Figure 57 : Spectre IRTF des phosphates à pH=7.....	57
Figure 58 : Spectre IRTF en présence de 5 ml de la plante (1h).....	58
Figure 59 : Sceptre IRTF en présence de 10 ml de la plante (2h).....	59
Figure 60 : Sceptre IRTF en présence de 20 ml de la plante (2h)	59
Figure 61 : Spectre IRTF en présence de 30ml de la plante (2h).....	60

List des Tableaux

Tableau.01 :Les propriétés biologiques des composés phénoliques.....	5
Tableau02 : Principaux activités biologiques.....	10
Tableau03 : Principales Fréquences de vibrations de carbapatite.....	16
Tableau 04 : Principales fréquences de vibrations de l'hydrox apatite.....	17
Tableau05 : Principales fréquences de vibration de la withlockite.....	18
Tableau06 : Principales fréquences de vibrations de la Brushite.....	18
Tableau07 : Principales fréquences de vibrations des bandes PACC.....	19
Tableau08 : Principales fréquences de vibrations de la struvite.....	20
Tableau 09 : Principales fréquences de vibrations de l'O.P.C	21
Tableau 10 : Tableau de matériels	22
Tableau 11 : Les souches pathogènes utilisées.....	38
Tableau 12 : Composition de l'urine artificielle.....	40
Tableau 13 : Le rendement (%) de l'extrait de la plant par différentes méthodes.....	42
Tableau 14 : Résultats de quelques paramètres physico-chimiques.....	43
Tableau 15 : Résultats des solubilités du plant.....	44
Tableau 16 : Principales bandes caractéristiques des groupes fonctionnels de l'extrait de plant.....	45
Tableau 17 : Résultats des tests de présences des métabolites secondaires.....	46
Tableau 18 :Pourcentage de concentration de phénols totaux (mg. ES Acide gallique /100g M.S) dans l'extrait	47
Tableau 19 : Pourcentage de concentration de flavonoïdes totaux (mg .EQE /100g MS) dans l'extrait	48
Tableau 20 : Pourcentage de concentration de tanins (mg.ES catéchine /100 g.MS) dans l'extrait.....	49
Tableau 21 : Concentration de l'acide ascorbique.....	51
Tableau 22 : Zone d'inhibitions (mm) de la souche pathogène sous l'effet de l'extrait de plante	52
Tableau 23 : Evaluation de taux de dépôt à pH=6.5	53
Tableau 24 : Principales fréquences de vibrations des bandes à pH=6.5.....	54
Tableau 25 : Evaluation de taux de dépôt à pH=8.....	55
Tableau 26 : Principales fréquences de vibrations des bandes IRTF de struvite à pH=8.....	56
Tableau 27 : Evaluation de taux dépôt à pH =7.....	56
Tableau 28 :Principales fréquence de vibration des bandes IRTF à pH=7	57
Tableau 29 : Evaluation des cristaux de struvite et Brushite en présence de la plante.....	58

Sommaire

Introduction

Chapitre I : les plantes médicinales

I. Historique	1
II. Les plantes médicinales	1
1. Définition d'une plante médicinale	1
2. Les différentes parties de la plante	2
III .la phytothérapie	2
1. Evaluation et origine de phytothérapie	2
IV. Phytochimie	3
V. Métabolites	3
1. Les métabolites primaires	3
2. Les métabolites secondaires	4
2.1.1. Les composés phénoliques	4
2.1.2. Classification	5
• Acides phénoliques	5
• Flavonoïdes	6
• Les tanins	6
2.2.1 .Les composés alcaloïdes	7
2.2.2. Le rôle biologiques des alcaloïdes	8
2.2.3. Classification	8
2.2.4. Propriétés physico-chimiques	9
2.2.5. Propriétés pharmaceutiques	9
2.3.1 .Les composés terpéniques	9
2.3.2. Classification des composés terpènes	10
2.3.3. Les propriétés des composés terpéniques terpènes	10

Chapitre II : les méthodes d'analyses

Introduction	11
I.Extraction solide-liquide	11
I.1.La décoction	11
I.2.L'Infusion	11
I.3.Macération	11
I.4.Extraction par Soxhlet	11
I.5.Extraction assistée par ultrasons	11
I.6.Extraction assistée par micro-onde	12

II. Les analyses physiques chimiques	12
II.1. Les analyses physique	12
1.1. La densité	12
1.2. Indice de réfraction	12
II.2. Les analyses chimiques	12
2.1. Le test de Ph mètre	12
2.2. La solubilité	12
III. Les tests phytochimiques	13
IV. Les analyses Biologiques	13
IV.1. L'activité antioxydant	13
IV.2. L'activité antibactérienne	13
V. Méthodes d'analyse spectroscopiques	13
V.1. Le spectroscopie visible (UV)	13
V.2. Le spectroscopie infrarouge (IR)	14
VI. Inhibition de la cristallisation des phosphates de l'urine artificielle	14
VI.1. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformé de fourrier	14
VI.2. Données spectroscopiques IRTF et rayons X sur la lithiase phosphocalcique	15
2.1. La carapatite	15
2.2. L'hydroxyapatite	16
2.3. La Whitlockite	17
2.4. La Brushite	18
2.5. Phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)	19
2.6. La struvite	19
2.7. Les phosphate octocalcique pentahydraté	20

Chapitre III : Matériels et Méthodes

I. Matériels et méthodes	22
I.1. Objectifs et l'étude	22
I.2. Matériels et produits utilisés	22
I.3. Méthode	23
II. Caractérisation chimique de la plante végétale	24
• Point de fusion	24
• La solubilité	25
II.1. Méthodes d'extraction utilisées	25
1.1. La décoction	25
1.2. L'infusion	26
1.3. Macération	26
1.4. Extraction par Soxhlet	27
1.5. Extraction par micro-onde	27
1.6. Extraction par ultrasons	27
2.1. L'évaporation	27

2.2. Rendement des extraits	28
III.1.Caractérisation de l'extrait de la plante médicinale	28
• Analyse IR	28
• Caractérisation physique et chimique	29
Analyse physique :	29
❖ La densité	29
❖ Indice de réfraction	29
Analyse chimique :	30
❖ Le ph	30
IV.1.Screening phytochimique	30
1. Les tanins	30
2. Les coumarines	31
3 .Les flavonoïdes	31
4. Anthraquinones	31
5. Saponines	31
6. Alcaloïdes	32
7. Les glycosides cardiaques	32
IV.2. Dosage des composés phytochimique	32
2.1. Dosage des phénols totaux	33
2.2. Dosage des flavonoïdes totaux	33
2.3. Dosage des tanins	33
IV.3. Extraction de quelque métabolite secondaire	33
1. Extraction des alcaloïdes	33
• Extraction solide-liquide	34
• Extraction liquide-liquide	35
2. Extraction des flavonoïdes	35
V.1. Evaluation de l'activité antioxydant	36
➤ Piégeage du radical liber DPPH	36
➤ La préparation de la solution DPPH	36
➤ Préparation des échantillons	37
VI.1.Activité antimicrobienne	37
1.1. Origine des souches	37
1.2. Réactivation des souches	37
VI.2. Méthode de diffusion en puits AWDT	38
VI.3.Méthode de diffusion sur disque	39
• Préparation des disques	39
• Ensemencement et dépôt des disques	39
VII.1. Etude de la cristallisation des phosphates sans inhibiteurs	40
VII. 2. Etude de cristallisation des phosphates en présence d'inhibiteur à pH = 7	41

Chapitre IV : Résultats et discussion

I.1. Le rendement d'extraction	42
--------------------------------	----

II.1.Résultat se la caractérisation physico-chimiques et spectroscopique de la plante médicinale	43
II. 2. Résultat de test de la solubilité	43
II. 3. Résultat du groupement fonctionnel par l'infra-Rouge	44
III.1.Screening phytochimique de l'extrait	45
III.2. Dosage des composés phytochimique	47
A) Dosage des composés phénoliques totaux	47
B) Dosage flavonoïdes	48
C) Dosage des tanins	49
III.3. Extraction des métabolites secondaires	50
3.1. Extraction des alcaloïdes et flavonoïdes	50
IV.1. Evaluation de l'activité antioxydant	50
IV.2. Détermination Ic50	51
V. Activité antibactérienne de l'extrait	5
VI. Etude de la cristallisation sans inhibiteurs	53
VI .1. Cristallisation à pH=6.5	53
VI.2.Cristallisation à pH =8	54
VI.3.Cristallisation à pH = 7	56
VI.4.Etude de la cristallisation en présence d'inhibiteur à pH =7	58
Conclusion	
Références bibliographique	

Introduction

Depuis plusieurs années, l'utilisation des plantes médicinales ou des préparations base des plantes connaît un succès croissant. Ainsi, d'après les estimations, 80% de la population mondiale dépend principalement de la médecine traditionnelle [1]. Et près de 25 % des prescriptions sont à base de plantes [2], tandis que environ 60% de prescriptions en Europe proviennent directement ou indirectement des plantes [1]. En effet, les substances naturelles d'origine végétale sont douées de plusieurs activités biologiques comme l'activité anti oxydante, anti- inflammatoire, anticancéreuse, antimicrobienne ... etc. [2].

Au cours des dernières décennies, les recherches scientifiques n'ont fait que confirmer les effets sanitaires bénéfique des fruits, des légumes et des plantes en général [3]. Plusieurs études épidémiologiques ont fortement suggéré qu'une forte ingestion de produits végétaux est associée à une diminution significative du risque de nombreuses maladies. Ces derniers représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques.

C'est dans ce cadre que ce travail est effectué. L'objectif principal de cette étude est la caractérisation (phytochimique, biologique) d'une plante médicinale ainsi l'extraction de Principe actifs et leurs analyses.

❖ Nous avons adopté un plan classique pour la présentation de notre travail :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique sur les plantes médicinales et la phytothérapie.

Par contre le second chapitre donne une description détaillée sur les différentes techniques d'analyse.

Le troisième chapitre est consacré aux différents tests établis pour l'indentification de la plante médicinale.

Le dernier chapitre présente les interprétations des résultats obtenus.

Ce travail est achevé par une conclusion générale résumant l'essentiel des résultats obtenus.

Chapitre I :

I. Historique

L'homme utilise les plantes médicinales pour traiter les maladies depuis des millénaires. Il semble qu'il y environ 60 000 ans, les Néandertaliens appréciaient les vertus thérapeutiques des plantes. Les chercheurs ont pu tirer cette conclusion après avoir examiné un lieu de sépulture en Iran dans lequel ils ont trouvé du pollen de huit plantes médicinales (Solecki et shanidar, 1975). L'une des plantes médicinales prétendument utilisées à l'époque est l'achillée millefeuille qui est décrite dans le présent ouvrage comme une plante médicinale moderne. Depuis la préhistoire, les chamans ainsi que les sorciers et les sorcières d'Eurasie et d'Amérique ont acquis des connaissances très poussées sur les plantes médicinales [4].

En Moyen- Orient, notamment l'ère Arabo-musulmane a aussi connu ses lettres de noblesse dans la pratique de la médecine par les plantes. Nous pouvons citer quelques noms de savants célèbres comme ABU BAKR AL-RAZI ou RHAZES (865-925), persan d'origine, qui fut l'un des grands médecins de son temps et aussi le précurseur de la psychothérapie. Il fut suivi par IBN-SINA ou AVICENNE (980-1037) qui écrit à Téhéran une œuvre qui s'intitule Canon de la médecine. Mais le plus grand d'entre eux fut sans aucun doute IBN AL-BAYTAR (1197-1248) qui rédige, en Orient, le très complet Somme des Simples (livre qui contenait une liste de 1400 préparations et plantes médicinales [5].

Vers le XV^{ème} siècle, Christophe Colomb et Vasco De Gama, rapportent de leurs expéditions des plantes médicinales. On parle des "Plantes de la Découverte ". Au XVI^{ème} siècle, Paracelse définit la notion de principe actif. Des recherches se font sur la morphologie des plantes pour expliquer leur activité thérapeutique. On parle de la "Théorie des signatures".

Depuis, l'homme n'a cessé de poursuivre sa quête vers la connaissance des plantes, leurs secrets et leurs vertus bénéfiques. Aujourd'hui, les progrès de la science sont tels que de nouveaux horizons s'ouvrent pour la phytothérapie : nouvelles méthodes scientifiques de pointe pour connaître les principes actifs des plantes, découverte de nouvelles propriétés, nouvelles formes d'utilisation plus pratiques, conçues pour s'adapter aux besoins de la vie actuelle. Désormais les plantes sont devenues d'authentiques médicaments [6].

II. Les plantes médicinales

Les vertus de la plus grande partie des plantes médicinales encore utilisées aujourd'hui furent découvertes dès l'antiquité. Nombre d'entre elles sont même connues depuis la préhistoire. C'est en Inde et surtout en Chine que les plantes médicinales sont les plus utilisées, les plus étudiées et font même l'objet d'une culture réglementée [7].

II.1. Définition d'une plante médicinale

Une plante médicinale est une plante utilisée pour ses propriétés thérapeutiques. Cela signifie qu'au moins une de ses parties (feuille, tige, racine, etc...) peut être employée dans le but de

se soigner. Les PAM sont utilisées depuis au moins 7000 ans avant notre ère par les Hommes et sont à la base de la phytothérapie.

Leur efficacité relève de leurs composés, très variés en fonction des espèces qui sont autant de principes actifs différents [8].

II.2. Les différentes parties de la plante

Les aromates proviennent de plantes dont on peut employer différentes parties :

- **Feuilles** : basilic, cerfeuil, estragon, marjolaine, menthe, persil, etc.
- **Fleurs** : capucine, etc.
- **Graines** : aneth, anis, carvi, coriandre, moutarde, etc.
- **Fruits** : genévrier, piment, etc.
- **Racines** : raifort, etc.
- **Tiges** : angélique, ciboulette, sarriette, sarriette, serpolet, etc.
- **Bulbe** : ail, oignon, etc [9].

III. La phytothérapie

La phytothérapie est définie comme l'utilisation de plantes médicinales à des fins thérapeutiques. En santé publique, elle est considérée comme un type de médecine alternative, dans laquelle l'automédication par les plantes est courante.

Le concept de phytothérapie dans le monde est unique, mais son développement dans les différents pays n'est pas identique et influencé par plusieurs facteurs tels que la richesse de la flore, ainsi que par les aspects sociaux et économiques. Pour cette raison, chaque pays a adopté une réglementation et gère le sujet de la phytothérapie selon sa propre vision [10].

III.1.Évolution et origine de phytothérapie

Depuis toujours, l'homme a utilisé les ressources naturelles à sa disposition pour combattre ce qui menaçait son bien-être. La plus ancienne référence à ce sujet se trouve en Chine, dans les écrits de l'empereur Cho Chin Ken, datant d'environ 3 000 ans avant J-C. On trouve des références à environ 1700 plantes médicinales dans un papyrus égyptien, ainsi que des données provenant de peuples tels que les Assyriens, les Grecs et d'autres encore. Certaines régions du monde, en particulier celles qui disposent de moins de ressources économiques, adoptent encore les mêmes pratiques qu'à l'époque [11].

En 2002, l'OMS a défini des stratégies pour inclure les médecines complémentaires et alternatives dans la santé publique, en se concentrant sur des aspects tels que l'efficacité, la qualité, l'accès et l'utilisation rationnelle, en exhortant les gouvernements à tirer parti de la contribution de ces options thérapeutiques et les intégrer dans les systèmes de santé au niveau mondial [10].

Selon l'OMS plus de 80 % de la population mondiale ont recours à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de la santé [12].

Dans les pays méditerranéens, la phytothérapie aujourd'hui a connu un développement très remarquable en raison des conditions économique difficiles. En Algérie, l'utilisation de plantes médicinales comme médicaments anti- inflammatoires est une pratique courante, bien que dans la plupart des cas les principes actifs des plantes soient inconnus. Par conséquent, l'étude de l'espèce végétale devrait toujours être considérée comme une stratégie de recherche logique, à la recherche de nouveaux médicaments anti-inflammatoires. La variété des conditions climatiques et géographiques en Algérie offre une riche source de végétation, comprenant de nombreuses espèces de plantes [13].

IV. PHYTOCHIMIE

On définit la phytochimie (chimie des substances naturelles) par la science qui étudie le métabolisme, la structure et le rôle des substances produites par les végétaux [14].

Le but final d'une étude phytochimique des plantes médicinales est souvent d'isoler un ou plusieurs constituants responsables de l'activité particulière de la plante [15].

Extraction, criblage biologique des extraits puis fraction purification, identification et caractérisation de structurale évaluation chimique et biologique des molécules isolées.

V. METABOLITES

Les métabolites sont les molécules issues du métabolisme des végétaux ou d'animaux, on distingue deux classes de métabolites : métabolite primaire et métabolite secondaire [16].

V.1.Métabolites primaires

Les Métabolites primaires sont des molécules organiques qui stimulent la croissance et la reproduction normale de la cellule .Ils sont classés en trois grandes catégories 'les glucides, les lipides, et les protéines' Comme le montre le schéma ci-dessous :

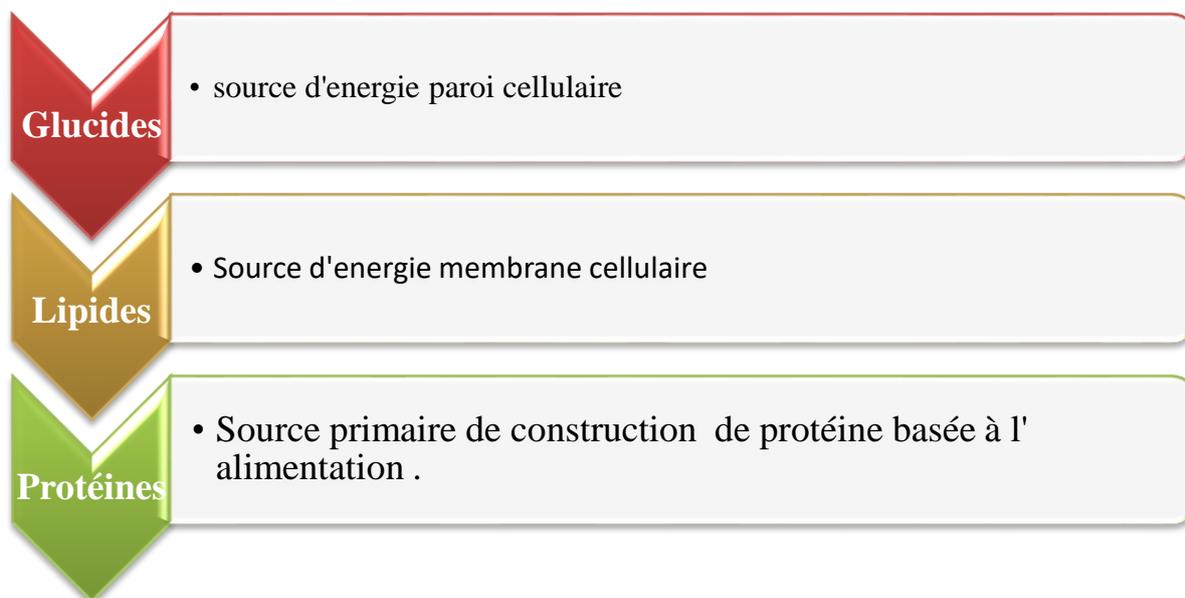


Figure01. Classes des métabolites primaires

V.2. Les métabolites secondaires

Le terme «métabolite secondaire », qui a probablement été introduit par Albrecht Kossel en 1891, est utilisé pour décrire une vaste gamme de composés chimique dans les plantes, qui sont responsables des fonctions périphériques indirectement essentielles à la vie des plantes, telles que la communication intercellulaire, la défense et la régulation des cycles catalytiques [17].

Ces molécules sont réparties en trois grands groupes.

- ✓ Les composés phénoliques.
- ✓ Les composés alcaloïdiques.
- ✓ Les composés terpéniques.

2.1.1. Les composés phénoliques (les polyphénols)

Les poly phénols constituent le groupe de métabolites le plus large et le plus répandu du règne végétal et font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale [18].

Les composés phénoliques possèdent des propriétés biologiques diverses d'où leur utilisation en thérapeutique.

Ils participent dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leur propriétés antioxydants [19].

En outre, Un certain nombre de molécules poly phénolique ont été testés cliniquement comme des antiagrégants plaquettaires, ou hypotenseurs avec des résultats moins probants [18].

- Le tableau.1 montre les propriétés biologiques des composés phénoliques [20].

Tableau01. Etude les propriétés biologiques des composés phénoliques

Poly phénols	Propriétés biologiques
Acides phénoliques (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes Antifongiques Antioxydants
Coumarines	Protectrices vasculaires et antiedémeuses
Flavonoïdes	Anti tumorales Anti carcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydants
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyaninides	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydants Anti tumorales Antifongique Anti-inflammatoires
Tannins galliques et catécchiques	Antioxydants

2.1.2. Classification des composés phénoliques

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes, les plus importants sont cités ci-dessous :

+ Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites aromatiques secondaires des plantes largement distribués dans tout le règne végétal. Le terme « acide phénolique » désigne les phénols qui possèdent une fonctionnalité acide carboxylique. Il existe deux principales structures d'acides

phénoliques : les structures d'acide hydroxycinnamique et d'acide hydroxybenzoïque. Bien que le squelette de base reste le même, le nombre et la position des groupes hydroxyle sur l'anneau aromatique font la différence [21].

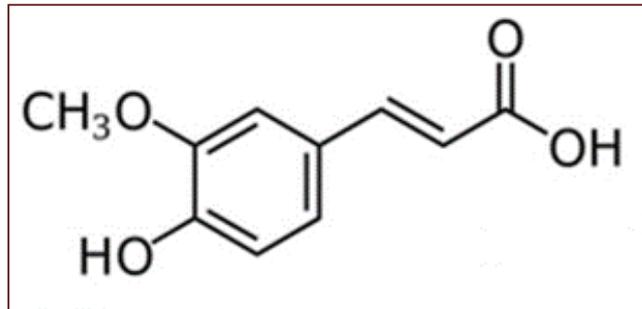


Figure 02. Structures chimiques des acides phénoliques [22].

✚ Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des substances phénoliques hydroxylées qui sont synthétisées par les plantes en réponse à une infection microbienne. Les flavonoïdes sont une subdivision d'un grand groupe de composés polys phénoliques. Ces dernières ayant plusieurs effets biochimiques et antioxydants qui sont associés à diverses maladies telles que le cancer, la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose [23].

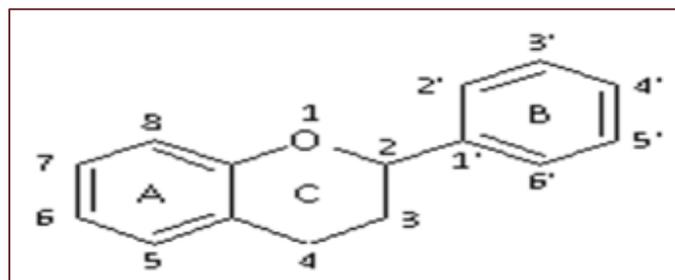


Figure03. Structure générale des Flavonoïdes [24].

✚ Les tanins

Les tannins (ou tanins) sont des substances poly phénoliques hydrosolubles de structure variée, de saveur astringente [25]. Naturellement produits par les plantes qui ont la propriété de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible : le cuir. Cette propriété de tannage provient de la création de liaisons entre les molécules de tannins et les fibres de collagène de la peau, et à leur aptitude à se combiner à des macromolécules (protéines, polysaccharides...) et à d'autres polymères organiques tels que des glucides, des acides nucléiques, des gélatines, des stéroïdes et des alcaloïdes pour former un précipité.

On distingue habituellement chez les végétaux supérieurs trois groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables, les tanins non hydrolysables (condensés) et les tanins complexes [26].

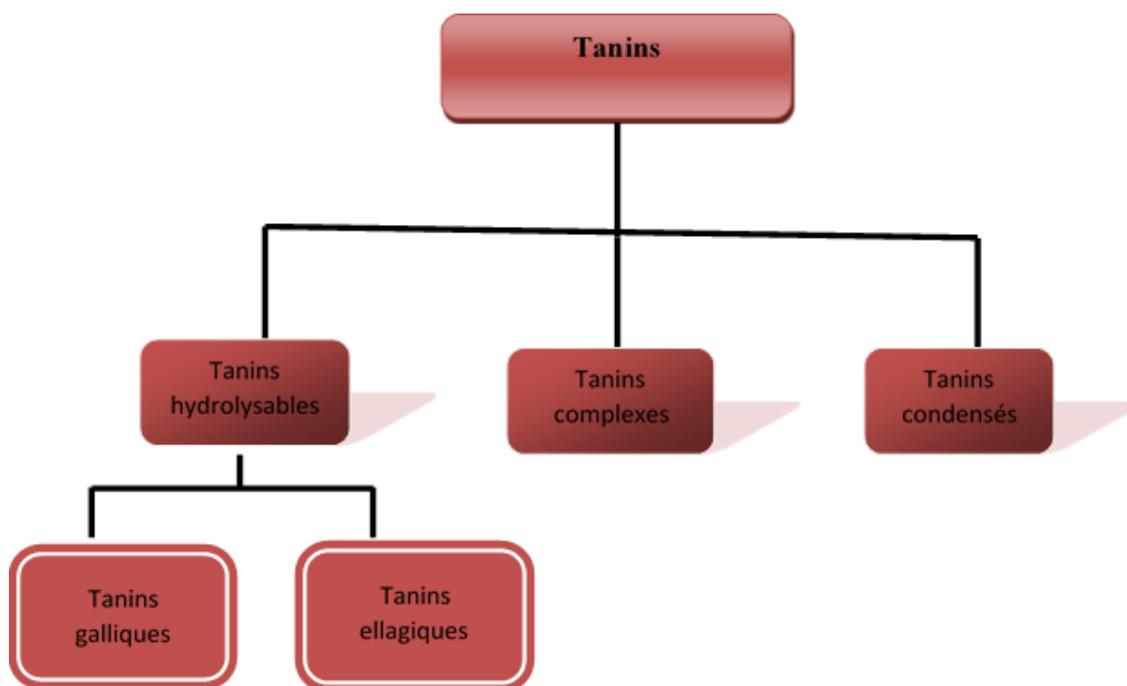


Figure 04. Classification des tanins selon leur structure chimiques [27].

2.2.1. Composés alcaloïdiques

Les alcaloïdes sont des composés cycliques contiennent un ou plusieurs atome d'azote dans leur structure chimique. Sont stockés dans les plantes en tant que produits de différentes voies biosynthétiques. Quelques structures sont relativement simples, tandis que d'autres sont tout à fait complexes.

Les alcaloïdes peuvent se trouver dans les parties du plant et la partie dans laquelle les alcaloïdes s'accumulent n'est pas forcément celle où ils synthétisés [28].

Nous pouvons les trouver dans nombreuses familles des plantes, et la plupart des alcaloïdes sont solubles dans l'eau et l'alcool [29] [30].

Ils sont amers et apéritifs, ils sont à la base de nombreuses molécules thérapeutiques [31].

2.2.2. Rôle biologique des alcaloïdes

Le rôle des alcaloïdes est très important dans les métabolismes de la plante. A forte dose la plupart des alcaloïdes sont très toxiques, par contre à faible dose ils peuvent avoir une valeur thérapeutique, les caractéristiques des alcaloïdes consistent en :

- ❖ Un arsenal chimique de défense des plantes contre l'attaque des herbivores et des micro-organismes.
- ❖ Produits d'excrétion du métabolisme azoté parfois.
- ❖ Substances de réserve.
- ❖ Protègent les plantes contre les dommages provoqués par la lumière UV [28].

2.2.3. Classification

Les alcaloïdes sont classés selon leur biogénèse et la position de l'azote :

- ✚ Les alcaloïdes vrais : l'azote inclus dans un hétérocycle. Ce groupe représente la majorité.

Exemple : la strychnine dérivée du tryptophane.

- ✚ Les proto-alcaloïdes : qui dérivent d'acides aminés mais pour lesquels l'azote est en dehors des structures cycliques.

Exemple : la cochimine

- ✚ Les pseudo-alcaloïdes : qui ne dérivent pas d'acides aminés.

Exemple : la caféine [32].

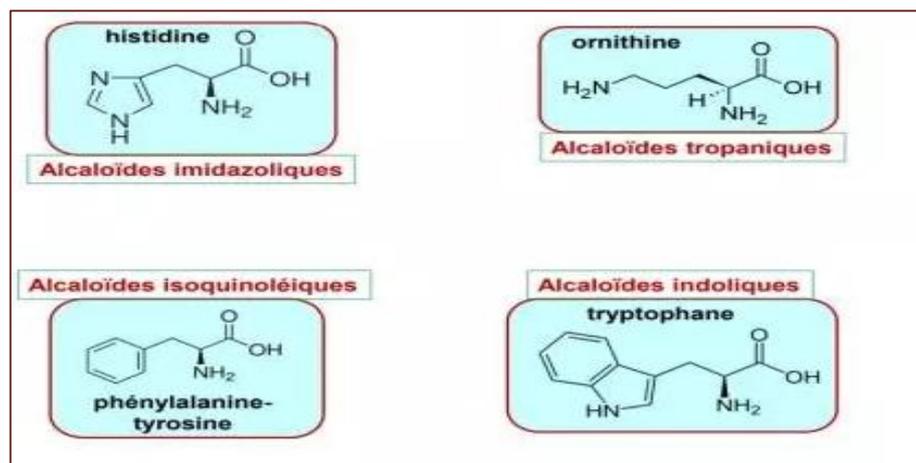


Figure 05. Classification des alcaloïdes [33].

2.2.4. Propriétés physico-chimiques

- ✚ Bases non oxygénées , sou forme liquides à température ambiante Ex : micotine , saprtéine , coniine .
- ✚ Masse moléculaire entre 100 et 900 g /mol.
- ✚ Bases oxygénées : sous forme solides cristallisables ,rarement colorés .
- ✚ Pouvoir rotatoire : capble de dévier la lumière polarisée .
- ✚ Insolubles ou très peu solubles dans l'eau, si une base.
- ✚ Solubes dans l'eau cas de sel [34].

2.2.5. Propriétés pharmaceutiques

Les alcoides ont des propriétés sont généralement variées et dépendent de leurs composantes chimiques . Il est utilisé comme :

- Dépresseurs au niveau du système nerveux central (morphine , scopolamine) .
- Stimulannts (caféine , strychine) .
- Anesthésiques locaux (cocaïne) .
- Ganglioplégiques (Spartine, nicotine) .
- Parasympathomimétique (physostigmine ou ésérine , pilocarpine) [35].

2.3.1. Composés terpéniques

Les terpènes ou isoterpénoides sont des composés issus de la condensation de l'isoprène cyclique ou acycliques. Ils peuvent être classés en fonction du nombre de carbone en mono terpène, sesquiterpène di terpène et tetraterpènes, au –delà on parle de poly terpène. Ils jouent des rôles très variés pour les plantes. Ce sont des composés protecteurs des végétaux face aux stress [36].

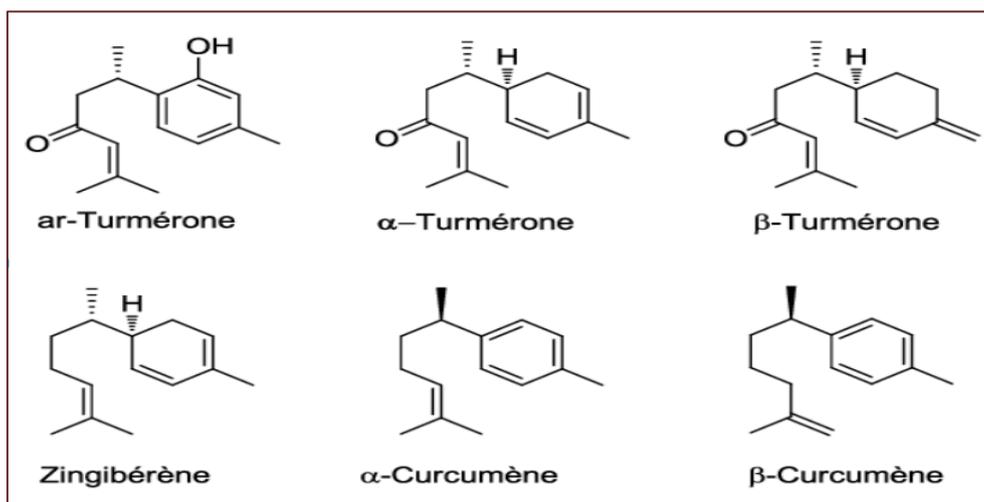


Figure 06 . les composés terpéniques [37].

2.3.2. Classification des composés terpéniques

La synthèse d'une grande variété de terpènes, cycliques et non cycliques, dans les plantes, fait intervenir un nombre variable d'éléments isopréniques. Suivant le nombre entier d'unités penta carbonés (C5) x n ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène, on peut faire la classification suivante :

- ✓ Pour n=2 ⇔ les mono terpènes (C10)
- ✓ Pour n=3 ⇔ les sesquiterpènes (C15)
- ✓ Pour n=4 ⇔ les di terpènes (C20)
- ✓ Pour n=5 ⇔ les ses terpènes (C25)
- ✓ Pour n=6 ⇔ le tri terpènes (C30)
- ✓ Pour n=8 ⇔ le caoutchouc naturel : les poly terpènes

2.3.2. Les propriétés des composés terpéniques

Les terpènes sont généralement lipophiles .ils sont universellement présents en faible quantité dans les organismes vivants, ou' ils jouent de nombreux rôles essentiels dans la physiologie des plantes [38].

En outre les terpènes ont des diverses propriétés biologiques indiqués dans le tableau mentionné ci-dessous

Tableau 02. Principaux activités biologiques des terpènes

Terpènes	Activités biologiques
Mono-terpènes	Biologiquement actifs (bactériostatiques, signalisation plantes insectes).
Tri-terpènes	Ils peuvent être utilisés comme des cardiotoniques, des sapogénines qui constituent les squelettes de base des contraceptifs, ou comme anti-inflammatoires.
Tétra-terpènes	Des pigments aux propriétés anti oxydantes comme le lycopène de la tomate.
Sesquiterpènes	De nombreuses lactones sesquiterpéniques sont antibactérien antifongiques, certaines structures sont antiparasitaires

Chapitre II :

Introduction

La valorisation des plantes médicinales se fait par la recherche de leurs principes actifs qui sont responsables de leurs effets pharmacologique et biologique. L'obtention de ces métabolites nécessite tous d'abord leurs extractions puis leurs purification et une analyse permet de les identifiés et les caractérisés. Il existe une multitude de techniques d'extractions et de purification. Elles peuvent être classées suivant la nature liquide ou solide de l'échantillon.

I. Extraction solide-liquide

L'extraction liquide-solide est un processus lent qui consiste à extraire un matériau d'un solide et à le faire passer dans un solvant liquide. Les approches d'extraction solide-liquide comprennent la macération, l'injection et la décoction. Il est pratiquement difficile de dissoudre un seul composé car d'autres composantes de la phase solide sont pris avec lui, quel que soit le solvant utilisé. Dans le laboratoire de chimie organique, des instruments plus puissants tels que les extracteurs Soxhlet et Kumagawa, qui fonctionnent en continu, sont également utilisés [39].

Parmi les méthodes d'extraction, nous avons choisis les méthodes suivantes :

1.1. La Décoction

Cette méthode s'applique essentiellement aux parties souterraines de plante et écores, qui lièrent difficilement leurs principes actifs lors d'une infusion. Elle consiste à extraire les propriétés des plantes en les laissant infuser dans l'eau qu'on porte à ébullition, laisser refroidir et filtrer [40].

1.2. L'Infusion

Une infusion se fait essentiellement avec les fleurs et les feuilles des plantes, en versant de l'eau bouillante sur la plante et en laissant infuser entre 10 et 20 minutes [40].

1.3. La macération

Afin de réaliser cette opération on fait tremper une certaine quantité d'herbes sèches ou fraîches dans un liquide et en laissant en contact pendant un temps plus ou moins long. Cette méthode particulièrement indiquée pour les plantes riches en huiles essentielles pour profiter pleinement des vitamines et minéraux qu'elles contiennent [40].

1.4. Extraction par Soxhlet

C'est une extraction par solvant organique à chaud, Le principe de cette méthode consiste à faire tremper les plantes dans un solvant organique volatil à chaud, soit pour obtenir des produits que l'on ne peut extraire par un autre procédé, soit en vue de rendements plus élevés [41].

1.5. Extraction assistée par ultrasons

Elle consiste à détruire les cellules par des ultrasons qui sont des vagues de même nature que le son mais dont la gamme de fréquence est comprise entre 20 kHz et plusieurs centaines de mégahertz. Cette gamme est trop élevée pour que l'oreille humaine la perçoive [42].

I.6. Extraction assistée par micro-onde

C'est une alternative intéressante qui permet la réduction du temps d'extraction. Dans la matière végétale les micro-ondes sont absorbées par l'eau et convertit en chaleur. Il en résulte une soudaine augmentation de la température à l'intérieur du matériel, jusqu'à ce que la pression interne dépasse la capacité d'expansion des parois cellulaires ce qui améliore la récupération des produits naturels [43].

II. Les analyses physico-chimiques

La caractérisation physico-chimique reste indispensable pour mieux connaître la composition d'une espèce végétale.

II.1. Les analyses physiques

II.1.1. La densité

Cette méthode basée sur la détermination de la masse du matériel testé qui est placé dans une petite coupe (pycnomètre) d'un volume connu à une température donnée. Pour calculer la densité : le poids obtenu est divisé par le volume du liquide testé [44].

Elle est donnée par la relation suivante :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m_0 : masse (g) de pycnomètre vide(g).

m_1 : masse (g) de pycnomètre rempli d'eau (g).

m_2 : masse (g) de pycnomètre rempli d'huile.

II.1.2. Indice de réfraction

C'est une grandeur sans dimension caractéristique d'un milieu, décrivant le comportement de la lumière dans celui-ci, il dépend de la longueur d'onde mesurée mais aussi des caractéristiques de l'environnement (notamment pression et température). L'indice de réfraction est parfois appelé « constante optique » d'un matériau, ce qui est un abus de langage, puisqu'il est à la fois variable selon des grandeurs qui lui sont extérieures, et non unique pour un milieu donné, car lié aux propriétés optiques, cristallographiques ou encore diélectriques de la matière, qui ne sont pas nécessairement isotropes [45].

II.2. Les analyses chimiques

II.2.1. Test de pH

Le pH influe sur la plupart des phénomènes chimiques et biologiques de l'eau, les valeurs de pH varient entre 6 et 8,5 dans les eaux naturelles [46].

II.2.2. La solubilité

C'est la capacité d'une substance, appelée soluté, à se dissoudre dans une autre substance, appelée solvant, pour former un mélange homogène appelé solution. La solubilisation désigne ce processus de dissolution [47].

III. Les tests phytochimiques (screening phytochimique)

C'est une technique rapide basée sur l'analyse qualitative des substances végétaux actives de certains métabolites secondaire telle que les Flavonoïdes, les tanins, Saponosides et Les coumarines, ces constituants sont détectés soit par la formation de complexes insolubles en utilisant les réactions de précipitation, soit par la formation de complexes colorés, en utilisant des réactions de coloration [48].

IV. Les analyses biologiques

IV.1. L'activité antioxydant

Les antioxydants sont classés selon leurs modes d'action : éliminateurs de radicaux libres, chélateurs d'ions métalliques, piègeurs d'oxygène dans des systèmes fermés. Les polyphénols, naturellement présents dans les aliments ou formés au cours des procédés de transformation sont considérés comme éliminateurs des radicaux libres [49].

IV.2. L'activité antibactérienne

Les polyphénols sont doués d'activité antibactérienne importantes et diverses, probablement dû à leurs diversités structurales. Les sites et le nombre des groupes hydroxyles sur les groupes phénoliques sont supposés être reliés à leurs relatives toxicité envers les microorganismes, avec l'évidence que le taux d'hydroxylation est directement proportionnel à la toxicité [50]. Il été aussi rapporté que plus les composés phénoliques sont oxydés plus ils sont inhibiteurs des microorganismes [51]. Les flavane-3-ols, les flavonols et les tanins ont reçu plus l'attention du à leur large spectre et forte activité antimicrobienne par rapport aux autres polyphénols [52].

Ces composés jouent un rôle inhibiteur, ils n'agissent pas sur la paroi bactérienne mais plutôt sur un mécanisme interne. Ces composés sont supposés agir sur l'ADN, l'ARN et la synthèse protéique [53]. Ils possèdent une capacité de supprimer un nombre de facteurs de virulence microbienne tell que l'inhibition de la formation de bio films, la réduction et l'adhésion aux

ligands de l'hôte et la neutralisation des toxines bactériennes ainsi qu'à leur capacité d'établir une synergie avec certains antibiotiques [52].

V. Méthodes d'analyse spectroscopique

V.1. La spectroscopie UV-visible

○ Définition

La spectrométrie UV-Visible repose sur l'interaction de la matière et du rayonnement électromagnétique dans le domaine 180-800 nm [54], [55]. Elle permet de déterminer les propriétés optiques (transmittance, réductance et absorbance) des liquides et des solides et déterminer la concentration d'une substance [56].

○ Principe

Une transition électronique correspond au passage d'un électron d'une orbitale moléculaire fondamentale occupée vers une orbitale moléculaire excitée vacante, par absorption d'un photon dont l'énergie correspond à la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité [56].

V.2. La spectroscopie Infrarouge (IR)

○ Définition

La spectroscopie infrarouge est l'une des méthodes utilisées pour l'identification des molécules organiques et inorganiques à partir de leurs propriétés vibrationnelles (en complément d'autres méthodes, la RMN et la spectrométrie de masse). En effet, le rayonnement infrarouge excite des modes de vibration (déformation, élongation) spécifiques de liaisons chimiques. La comparaison entre rayonnement incident et transmis à travers l'échantillon suffit par conséquent à déterminer les principales fonctions chimiques présentes dans l'échantillon. Le proche infrarouge peut être utilisé pour déterminer la teneur en lipides d'aliments ou d'animaux vivants (ex : saumon atlantique d'élevage vivant) par une technique non destructive [57].

○ Principe

La spectroscopie infrarouge (IR) est basée sur l'absorption du rayonnement électromagnétique à des longueurs d'onde comprises entre 780 et 2500 nm. Différents groupes fonctionnels absorbent les fréquences caractéristiques puis le rayonnement infrarouge excite des modes de vibration. Le spectre est constitué des bandes que l'on appelle bandes d'absorption [58].

VI. Inhibition de la cristallisation des phosphores de l'urine artificielle

La formation d'un calcul est une succession d'étapes dont le déroulement dépend de plusieurs facteurs tels que la sur-saturation. Le rein produit des urines sur-saturées en plusieurs solutés cristallisables dont la concentration est supérieure au produit de solubilité, c'est le cas les urines contiennent des substances qu'on appelle « inhibiteurs de cristallisation » qui contrebalancent l'action des promoteurs donc la formation de calculs apparaît comme une rupture d'équilibre permanente intermittente ou occasionnelle entre deux groupes 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 y a aussi les inhibiteurs naturels (les plantes médicinales) qui font l'objet de notre étude.

VI.1. Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Cette technique permet l'analyse de composés en observant les fréquences des résonances des différents atomes. En effet, au-dessus du zéro absolu, la matière est en mouvement permanent avec des rotations autour de certaines liaisons et l'oscillation autour d'une valeur d'équilibre des distances interatomiques ainsi que les angles entre ces liaisons. Chacun ayant une fréquence propre, la connaissance de ces fréquences permet de déduire la nature du produit étudié. Pour cela, on balaye la gamme des fréquences de 4000 à 400cm^{-1} et on observe l'intensité du signal transmis. Lorsque la fréquence émise correspond à celle d'un des oscillateurs, le signal est plus ou moins absorbé. Pour le domaine inférieur à 4000cm^{-1} on vérifie la présence du phosphate amorphe de calcium carbonaté et d'autres phosphates tels que la brushite ou la carbapatite.

VI.2. Données spectroscopiques IRTF et rayons X 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 [59]. Les apatites, à l'exception de la whitlockite sont caractérisées par une bande large entre 3600 et 3100cm^{-1} correspondant à l'absorption des groupements OH. La vibration de valence de l'ion PO_4^{3-} est pointée entre 1035 et 1025cm^{-1} . Les apatites existent sous plusieurs formes cristallines.

VI.2.1. La carbapatite

La carbapatite est caractérisée par la présence d'ions carbonates peu nombreux incorporés dans le réseau cristallin. Elle est très souvent associée au phosphate ammoniac-magnésien. Ces derniers créent sur le spectre infrarouge l'apparition de bandes supplémentaires à celles observées pour les apatites simples : ce sont les fréquences de valence de l'ion carbonate observables à : 1460 et 1419cm^{-1} [60].

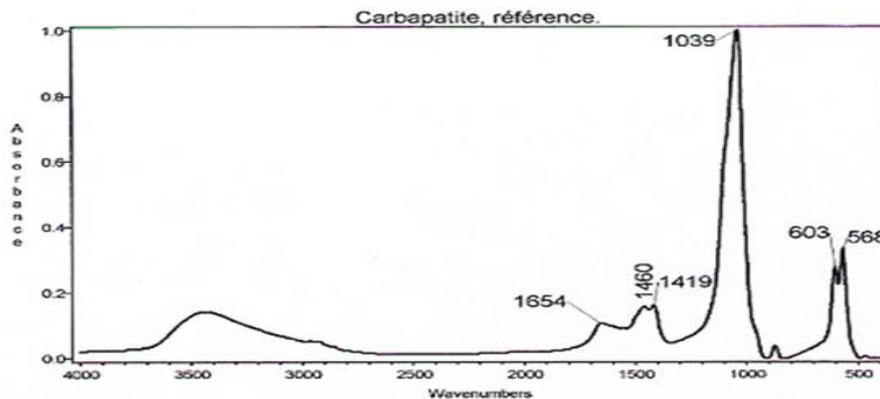


Figure 07. La carapatite.

Tableau 03. Principales fréquences de vibrations de carapatite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques(cm^{-1})
Carapatite	$Ca_{10-x+y}M_{X-Y}(PO_4)_{6-x} \cdot (OH)_{2+2y-x}(CO_3)_x$		F : 1039 F : 603 ; 1460 ; 1419.
Pics observés (cm^{-1})			
3436f ; 1654f ; 1460f ; 1419f ; 1039TF ; 603m ; 568m.			
Identification du constituant			
✓	Valence asymétrique des PO_4^{3-} à 1039 cm^{-1} forte, asymétrique à gauche, épaulée à 1100 cm^{-1} .		
✓	Bandes symétriques faible de PO_4^{3-} à 960 cm^{-1}		
✓	Valence carbonate 1460 et 1419 cm^{-1}		

VI.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 struvite.

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 [61].

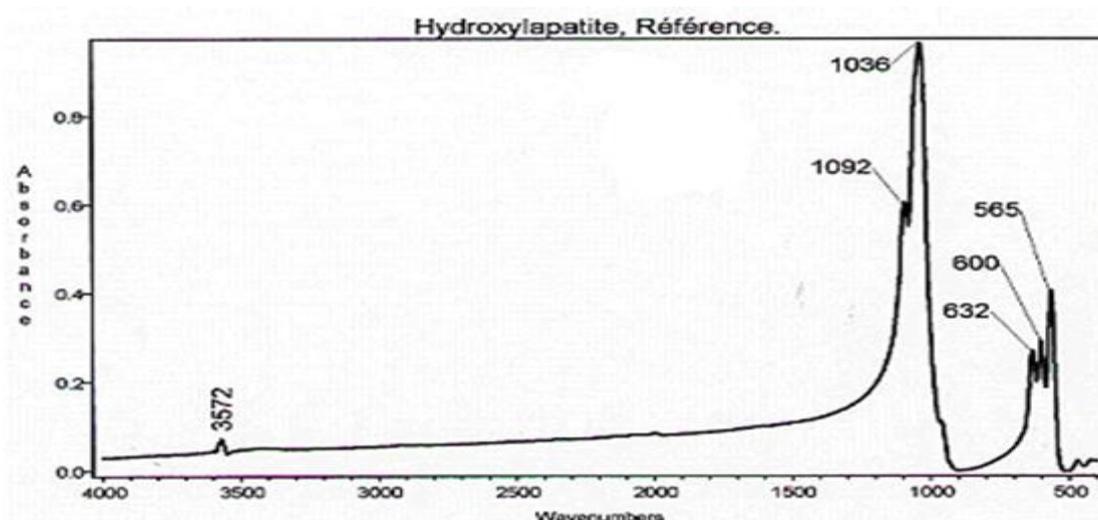


Figure 08. Hydroxyapatite

Tableau 04. Principales fréquences de vibrations de l'hydroxyapatite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques(cm^{-1})
Hydroxyapatite	$Ca_9Mg(PO)_4HPO_4 \cdot nH_2O$		TF : 1036 ; 1044 M : 1092
Pics observés(cm^{-1})			
3572f-1092m-1044TF-1036TF-962f-632m-600m-565m			
Identification du constituant			
✓	Valence asymétrique PO_4^{3-} 0 1033 forte et large, asymétrique à gauche épaulée à $1100cm^{-1}$		

VI.2.3. La withlockite

La withlockite appartient à la famille des apatites et cristallise dans le système hexagonal [59]. 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 déboulement à $1076cm^{-1}$ et $1027cm^{-1}$ [62].

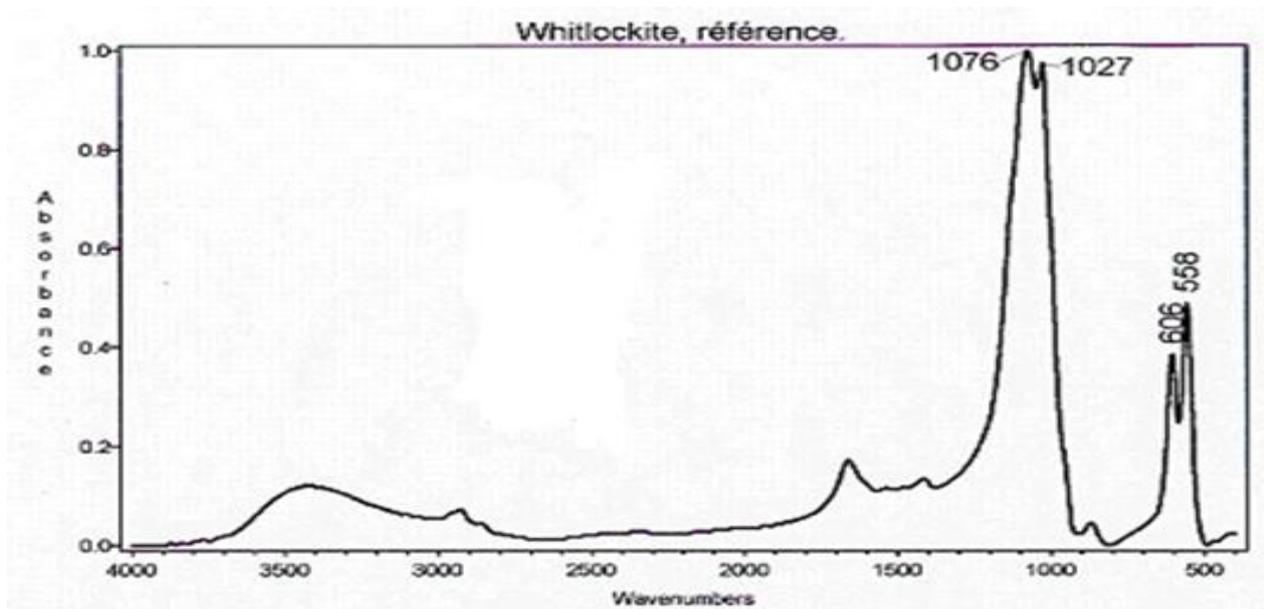


Figure 09 .Whitlockite

Tableau 05. Principales fréquences de vibration de la withlockite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques
Withlockite	$Ca_9Mg(PO_4)_6HPO_4 \cdot nH_2O$	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-} 0 1027 ET 1076 cm^{-1} épaulée à 992 cm^{-1}			

VI.2.4. La Brushite

La Brushite ou phosphate monoacide de calcium di hydraté cristallise dans le système monoclinique [63]. Elle est rare à l'état pur et en tant que constituant majoritaire des calculs urinaires. Elle fréquemment associée a l'apatite ou à l'oxalate de calcium dont elle peut constituer le noyau central ou une couche interne [64]. PAK [65].Lui attribue un rôle important dans la nucléation de nombreux calculs oxalocalciques. Elle présente des bandes d'absorption assez larges et fortes dans la zone 1250-1295 cm^{-1} . Elle est peu fréquente, se distingue aisément des autres phosphates de calcium par le nombre et la position de ces bandes [60].

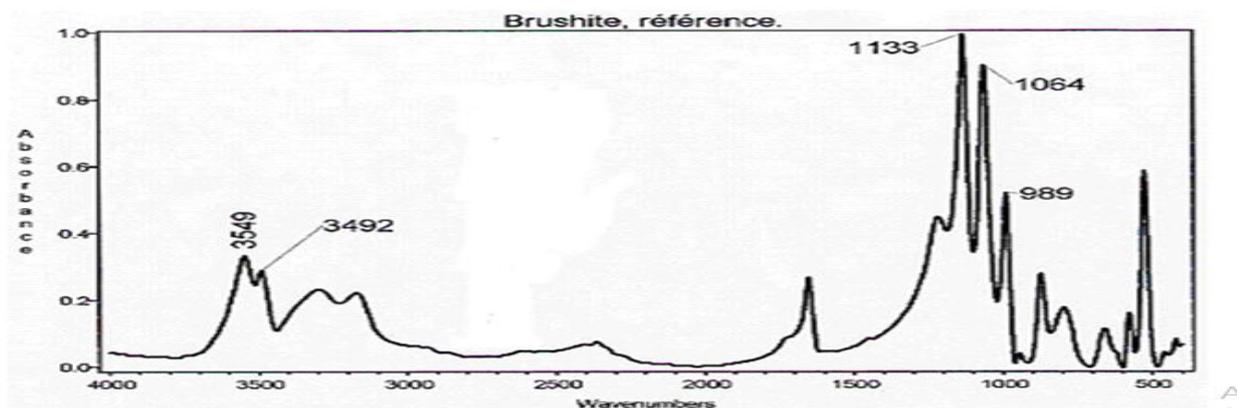


Figure 10.la Brushite

Tableau 06. Principales fréquences de vibrations de la Brushite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques(cm^{-1})
Brushite	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	Bru ou DCDP	TF : 1133-1064 F : 989
Pics observés (cm^{-1})			
3541F ; 3490m ; 1650m ; 1218m ; 1060TF ; 1135TF ; 985F ; 872m ; 577m ; 524F.			
Identification du constituant			
✓ Valence des molécules H_2O à $3549-3492\ cm^{-1}$			
✓ Valence asymétrique des PO_4^{3-} à $1133 ; 1064 ; 989\ cm^{-1}$			
✓ Bandes secondaires des PO_4^{3-} à 1650 (fine) ; 1218 et épaulement à $1000\ cm^{-1}$ de la bande à $985\ cm^{-1}$			

VI.2.5. Phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)

Le phosphate de calcium amorphe carbonaté est un constituant faible. 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 carapatite sur les spectres IRTF par l'absence d'une bande fine à $600\ cm^{-1}$ [62].

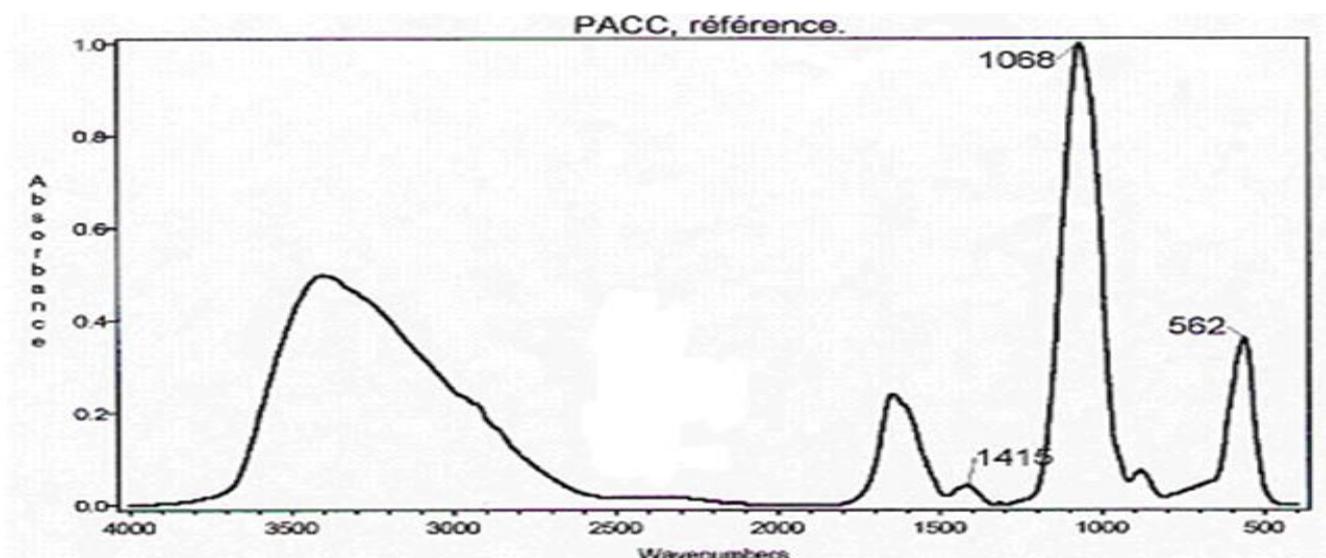


Figure 11. Phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)

Tableau 07. Principales fréquences de vibrations des bandes du PACC

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques(cm^{-1})
Phosphate de calcium amorphe carbonaté	$Ca(PO_4)_x(OH)_y(CO_3)_2, 5H_2O$	PACC	TF : $1068\ cm^{-1}$ F : $1415\ cm^{-1}$
Pics observés (cm^{-1})			
3405m ; 1645m ; 1415f ; 1068TF ; 880f ; 562m.			
Identification du constituant			
✓ Bande phosphate, arrondi, forte, asymétrique, centré sur $1068\ cm^{-1}$			
✓ Pas de bandes fine à $600\ cm^{-1}$			

VI.2.6. La struvite

La struvite est le phosphate amoniac-magnésien hexa hydraté. Elle cristallise dans le système orthorhombique [59]. 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 amoniac-magnésien, de la carbapate et de l'oxalate de calcium. Dans les calculs mixtes comportant de la struvite, la carbapate est souvent le constituant majoritaire. Il est probable que d'autres facteurs importants interviennent pour expliquer la prédominance de la struvite ou de la carbapate selon les couches [60].

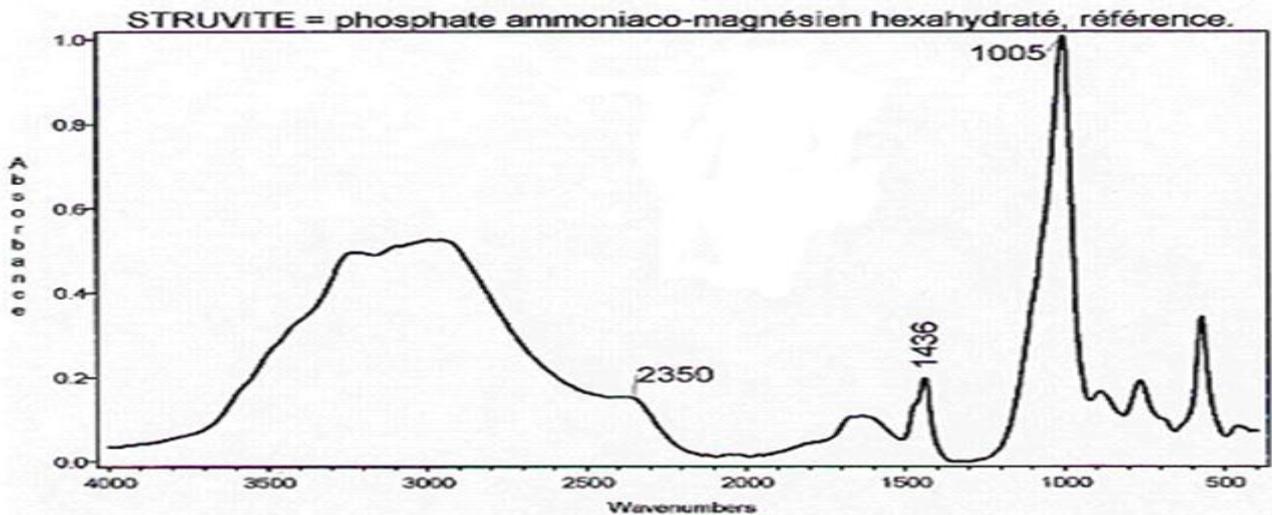


Figure 12. La struvite

Tableau 08. Principales fréquence de vibrations de la struvite

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques(cm^{-1})
Struvite	$MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$	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 H_2O + ion NH_4^+ à 2350 cm^{-1}. 			

VI.2.7. Les phosphates octocalcique pentahydraté (O.C.P)

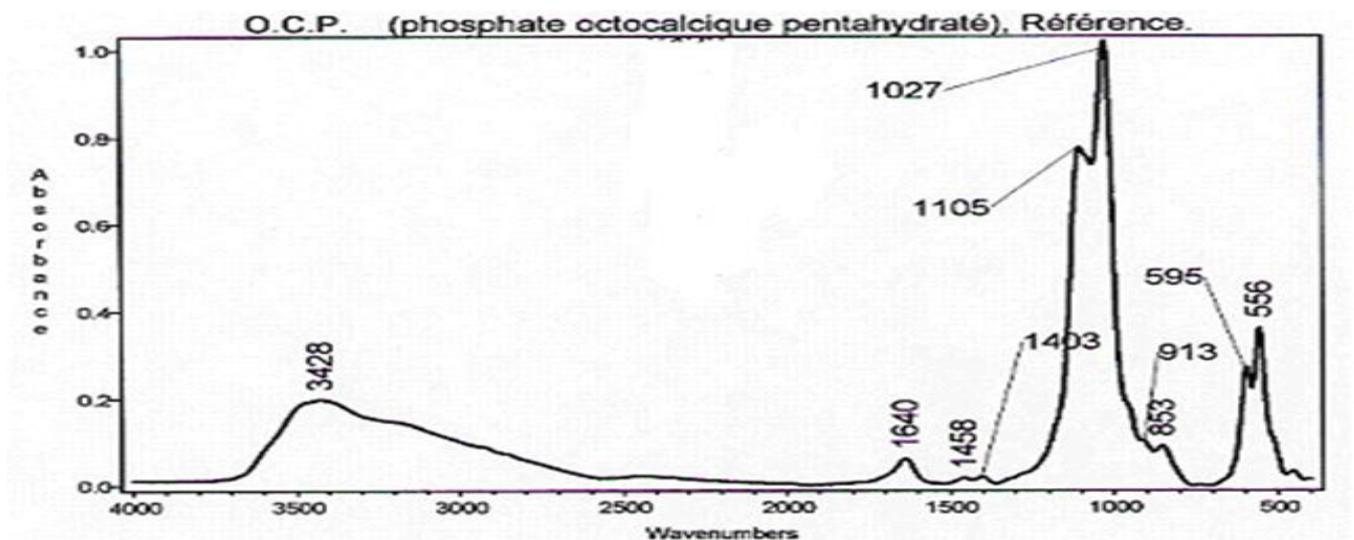


Figure 13. Phosphate octocalcique pentahydraté (O.C.P)

Tableau 09. Principales fréquences de vibrations de l'O.P.C

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques(cm^{-1})
Phosphate Octocalcique pentahydraté	$C a_8(PO_4)_2, 5H_2O$	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 $1027 cm^{-1}$, asymétrique à gauche, épaulement à $1105 cm^{-1}$			

Chapitre III :

I. Matériels et méthodes

L'expérimentation de notre rapport de fin d'étude a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche SEA2M et laboratoire pédagogique de chimie de l'université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem (FSEI).

1.1. Objectifs de l'étude

Les objectifs ambitionnés à travers cette étude sont :

- Extraction de la plante médicinale
- Screening phytochimique de la plante et sa Caractérisation physico-chimique
- Dosage des composés phytochimiques
- Extraction du quelque métabolites secondaires
- Évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydant de la plante.
- Étude de cristallisation des phosphates sans inhibition et avec inhibition

1.2. Matériel et produits utilisés

Les appareils, les matériels et produits utilisés sont regroupés dans le tableau 10

Tableau 10. Tableau de matériels

Appareils	Matériels	Produits et réactifs
Balance de précision	Erlenmeyer	Eau distillée
Étuve	Bécher	Plante
Appareil à ultrasons	Micro –pipette	Éthanol
pH-mètre	Pipette	DPPH
Micro-ondes	Papiers filtre	Hcl
Spectrophotomètre visible	UV- Des tubes	DMSO
Spectroscopie IR		MH-Gélose
Bain thermostaté		Les souches pathogènes

1.3. Méthodes

- ✚ Le schéma ci-dessous regroupe les différentes expérimentations réalisées sur la plante :

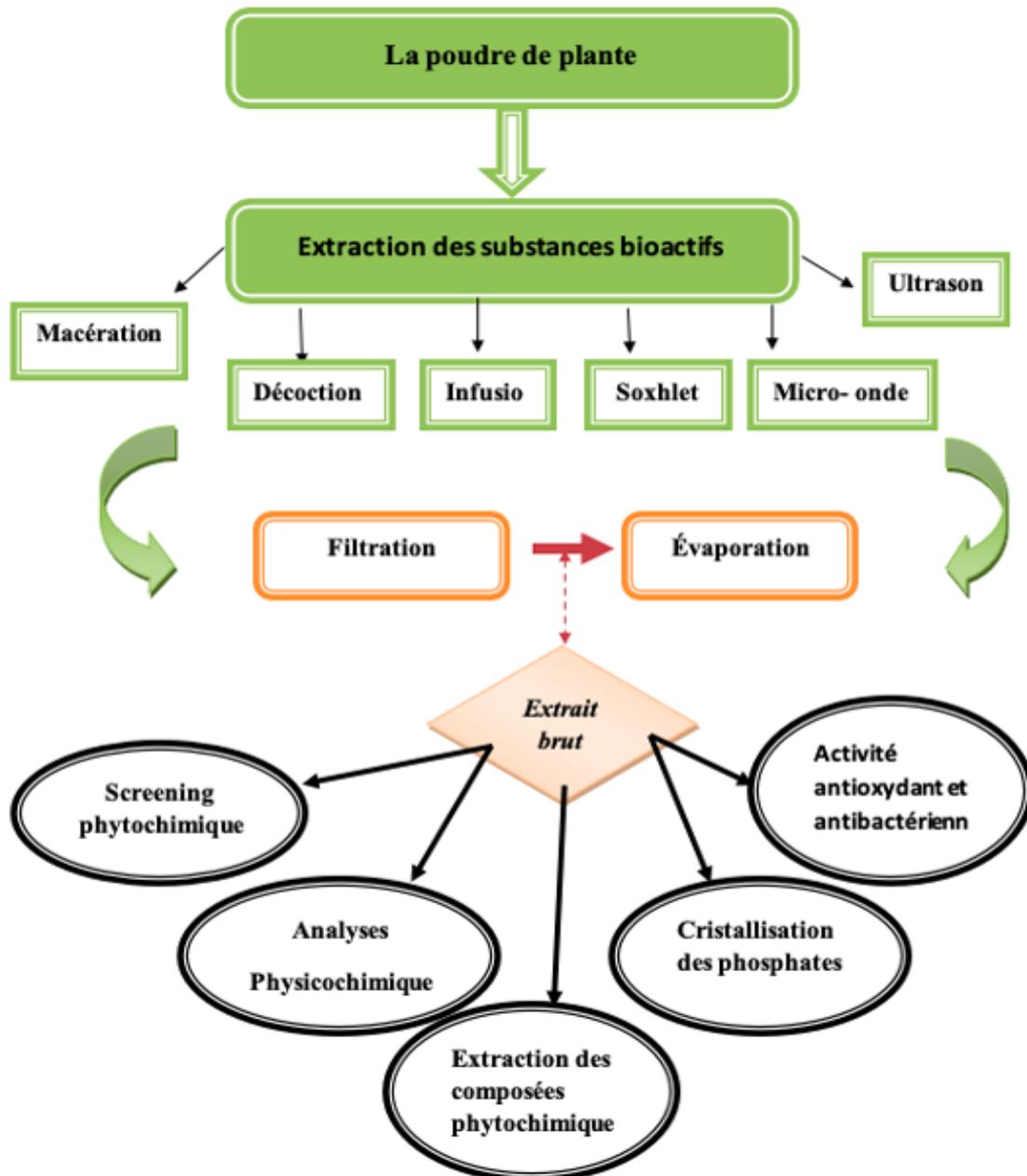


Figure 14. Différentes expérimentations réalisées

II. Caractérisation de la matière végétale brute

Notre plante a été préalablement rincée et séchées dans un endroit sec, aérées à l'air libre pendant deux semaines et broyées à l'aide d'un broyeur.

Le broyat obtenu a subi des analyses caractéristiques chimiques détaillées ci-dessous :

- ***Point de fusion***

Pour effectuer la mesure de la température de fusion on a utilisé l'appareil de banc kofler (**Figure 15**), 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 creuseur soit à la frontière entre solide et liquide.



Figure 15. Banc kofler

- ***La solubilité***

Pour réaliser ce test, on a introduit des masses de 0.2g de poudre de la plante dans des tubes à essais contenant 5ml le volume du solvant (**Figure 16**). Les solvants utilisés sont :

L'Eau, l'Acétone, le méthanol, l'éthanol, le chloroforme, le DMSO, le DMF, le cyclohexane, le toluène et le di-éthylène glycol.

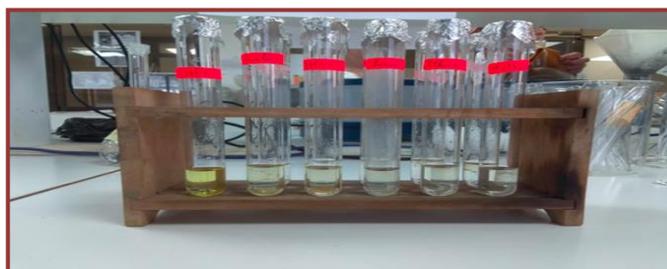


Figure 16. Tests de solubilité

II.1. Méthodes d'extraction utilisées

Le solvant utilisé pour toutes les méthodes d'extraction c'est l'eau distillée. La séparation des extraits a été effectuée par une filtration sous vide et le séchage par une évaporation à sec dans l'étuve à 35 °C.

1.1. La décoction

On ajoute 2,5 grammes de la poudre de la plante à 50 ml d'eau distillée. Le mélange est chauffé pendant 30 minutes (Figure 17).



Figure17. Décoction

1.2. L'infusion

Une masse de 2,5 g de la poudre de la plante a été introduite dans un erlenmeyer contient 50ml d'eau distillé bouillante. Après agitation, le mélange est laissé reposer pendant 30 min (Figure 18).

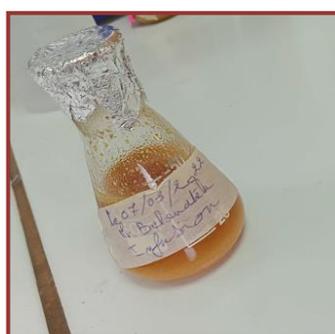


Figure 18. Infusion

1.3. La macération

Une masse de 2,5g de la poudre de la plante est dissoute dans 50ml d'eau distillée tiède et laissé macérer (repos) pendant 6 jours (Figure 19).



Figure19. Macération

1.4. Extraction par Soxhlet

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole suivant :

- Peser 15g de la poudre de la plante.
- Placer dans l'extracteur la cartouche contenant la prise d'essai broyée
- Positionner l'extracteur sur le ballon contenant le solvant d'extraction (300ml d'eau distillé).
- Après 8h éteindre l'appareil et laisser refroidir.
- Éliminer le solvant par évaporation.



Figure20. Appareillage de Soxhlet

1.5. Extraction par micro-onde

Le mode opératoire suivie est :

Dans un bécher on a introduit 2g de la matière végétale avec 50 ml de l'eau distillé. Le mélange a été traité par micro-onde pendant 60 seconds. Après l'extraction, le mélange est filtré sous vide.



Figure21. Extraction par micro-onde

Remarque

- Un four micro-ondes domestique de la marque WHIRLPOOL dont la température, le temps et la puissance est contrôlés et automatisés, avec une fréquence d'onde de 2450 MHz.
- Un réacteur, contenant le matériel végétal solide extraire, est un bécher en verre de type pyrex et adapté aux microondes.

1.6. Extraction par Ultrason

L'extraction par ultrason est effectuée en traitant une solution contenant une masse de 2,5 g de poudre de la matière végétale dissoute dans un volume de 50 ml de l'eau distillée durant 4 heures. Ensuite, le mélange est filtré sous vide.



Figure 22. Extraction par ultrasons

2.1. L'évaporation

L'évaporateur rotatif (ou rota vapeur) (Figure 23) est un appareil utilisé afin de distiller rapidement les solvants, dans le but de concentrer à sec (on enlève tout le solvant) la solution considérée. Mais dans notre cas, cette méthode n'est pas fiable car l'appareil est en panne. Pour cela, nous avons choisi l'évaporation à sec dans l'étuve à température du 35 degré. Cette dernière était efficace.



Figure 23. Évaporateur rotatif

2.2. Rendement des extraits

Après l'élimination de toutes traces d'eau par évaporation, les extraits obtenus sont ensuite pesés afin de calculer le rendement.

$$R\% = ((P1-P2) / E) * 100$$

Où :

P1 : Poids de l'extrait après évaporation

P2 : Poids du cristalliseur ou boîte de pétri vide

E : Poids initial de la poudre utilisée pour l'extraction

III.1. Caractérisation de la plante médicinale

- *Analyse spectroscopique IRTF*

L'analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été réalisée sur la poudre de la matière végétale, grâce à un spectromètre du type IR-Prestige 21 SHIMADZU (figure 24).



Figure 24 .Spectroscopie infrarouge IR

- **Caractérisation Physique-chimique**

La caractérisation physique et chimique détaillée ci-dessous a été établie sur l'extrait obtenue par la méthode d'extraction la plus rentable

Analyse physique :

❖ **La densité**

Pour mesurer la densité on a réalisé les opérations suivantes :

- Nettoyage soigneusement le pycnomètre.
- Détermination la masse m_0 de pycnomètre vide.
- Détermination la masse m_1 de pycnomètre rempli d'eau distillé.
- On mesure la masse m_2 de pycnomètre contenant l'huile.

La détermination de la densité des liquides purs est établie à 20°C par l'équation suivante :

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

M_0 : Masse (g) de pycnomètre vide (g).

M_1 : Masse (g) de pycnomètre rempli d'eau (g).

M_2 : Masse (g) de pycnomètre rempli d'huile(g).



Figure25. Pycnomètre

❖ **Indice de réfraction**

Afin de mesurer l'indice de réfraction on a réalisé les opérations suivantes :

- Nettoyer la lame du réfractomètre en utilisant de papier joseph.
- Déposer quelques gouttes de l'huile dans la lame de réfractomètre et régler le cercle de chambre sombre et claire dans la moitié.
- Effectuer la lecture en tenant compte de la température.

L'indice de réfraction d'un liquide est déterminé par le rapport suivant :

$$R = \frac{\sin i}{\sin r}$$



Figure 26 : Réfractomètre

Analyses chimiques :

❖ *Mesure de pH*

Pour mesurer le pH nous avons suivi les étapes suivantes :

Après Rinçage de l'électrode avec de l'eau distillée, on effectue la lecture du pH de la solution à analyser.



Figure27. pH mètre

IV.1. Screening phytochimique

La détection des métabolismes secondaires a été réalisée sur l'extrait obtenue par la méthode d'extraction la plus rentable.

Tous les protocoles de screening chimique sont résumés sur les schémas suivants :

1. les tanins



Figure28. Protocole de test des tanins [66]

2. les coumarines



Figure29. Protocole de test des coumarines [67]

3. les flavonoïdes



Figure30. Protocole de test des flavonoïdes [68]

4. Anthraquinone

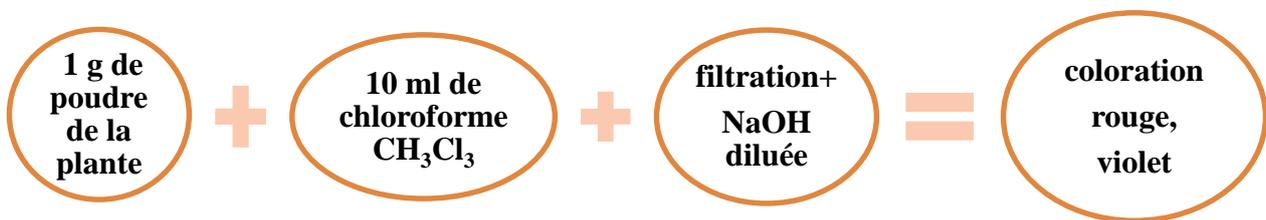


Figure 31. Protocole de test d'anthraquinone [69]

5. Saponines



Figure 32. Protocole de test les saponines [69]

Remarque :

- ✓ Pas de mousse → négative
- ✓ Mousse moins de 1 cm → test faible positif

- ✓ Mousse 1-2 cm → test positif
- ✓ Mousse plus de 2 cm → très positif

6. Alcaloïdes

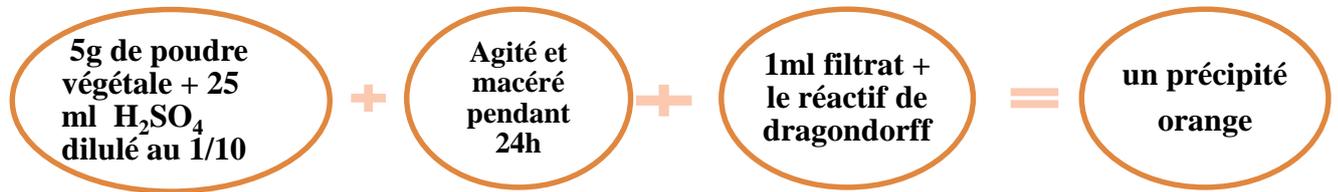


Figure33. Protocole de test des alcaloïdes [70]

7. Les glycosides Cardiaques

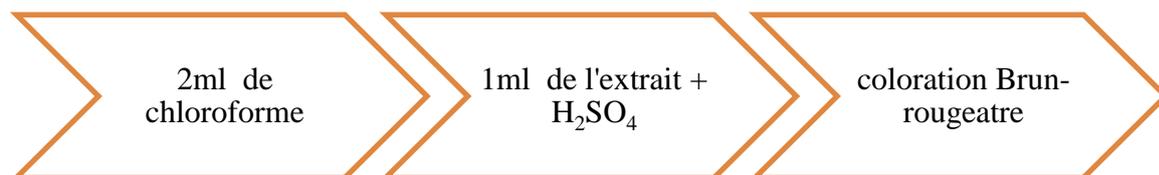


Figure34. Protocole de test des glycosides cardiaques [71]

IV.2. Dosage des composés phénoliques

Les composés phénoliques sont originaires du monde végétal et constituent l'un des métabolites secondaires le plus importants des plantes. Ces derniers ont récemment fait l'objet d'un grand intérêt en vue de leurs caractéristiques antioxydants et de leurs implications bénéfiques pour la santé humaine, en particulier dans le cadre du traitement, de la prévention du cancer et des maladies cardiovasculaires.

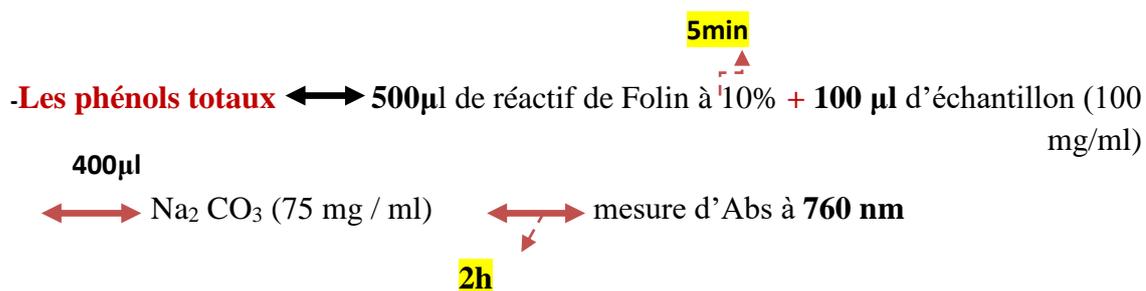
Afin de déterminer la teneur de notre extrait en composés phénoliques, nous avons effectué trois dosages comme indiqué ci-dessous

2.1. Dosage des phénols totaux :

Dosage des phénols totaux (technique de Folin-Ciocalteu) selon [72]

Le dosage des phénols totaux est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible en suivant la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette technique est basée sur la réaction des phénols totaux en milieu alcalin avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

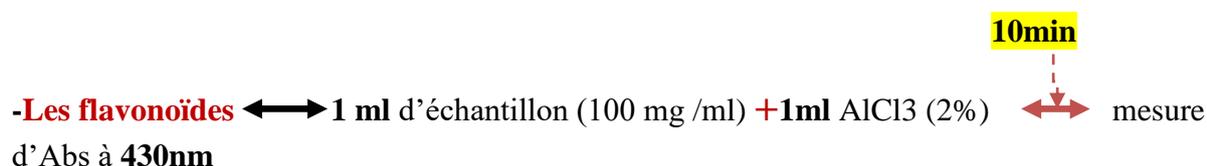
Le mode opératoire suivi est détaillé ci-dessous :



2.2. Dosage des flavonoïdes :

Dosage des flavonoïdes totaux selon [73].

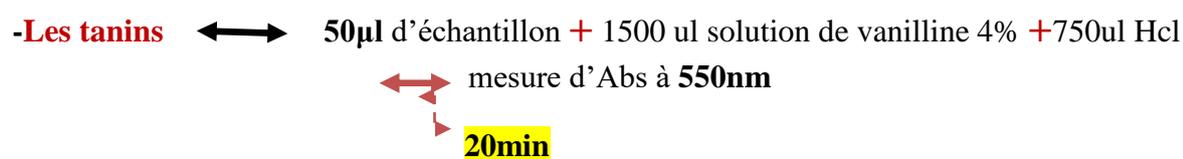
La teneur en flavonoïdes totaux est aussi déterminée en utilisant un spectrophomètre UV-visible en appliquant la méthode de trichlorure d'aluminium. La procédure suivie pour la réalisation de ce dosage est décrite dans le schéma ci-dessous :



2.3. Dosage des tanins :

Dosage des tanins par la méthode à la vanilline [74].

Le dosage des tanins est réalisé en appliquant la méthode à la vanilline décrite par le protocole de la méthode mentionnée ci-dessous :



IV.3.Extraction de quelque métabolite secondaire

1. Extraction des alcaloïdes :

Le principe de l'extraction est basé sur la solubilité différentielle des bases et des sels dans l'eau et dans les solvants organiques. En outre, quelle que soit la méthode choisie pour extraire les alcaloïdes totaux, on n'obtient pas des produits purs, mais plutôt des mélanges complexes d'alcaloïdes totaux dont il faut assurer une purification.

La purification des alcaloïdes fait intervenir des techniques différentes, tel que, les méthodes classiques de chromatographie sélective, sur silice, sur alumine, HPLC et GPC.

Extraction par un solvant en milieu alcalin et l'extraction par un solvant en milieu acide [75]

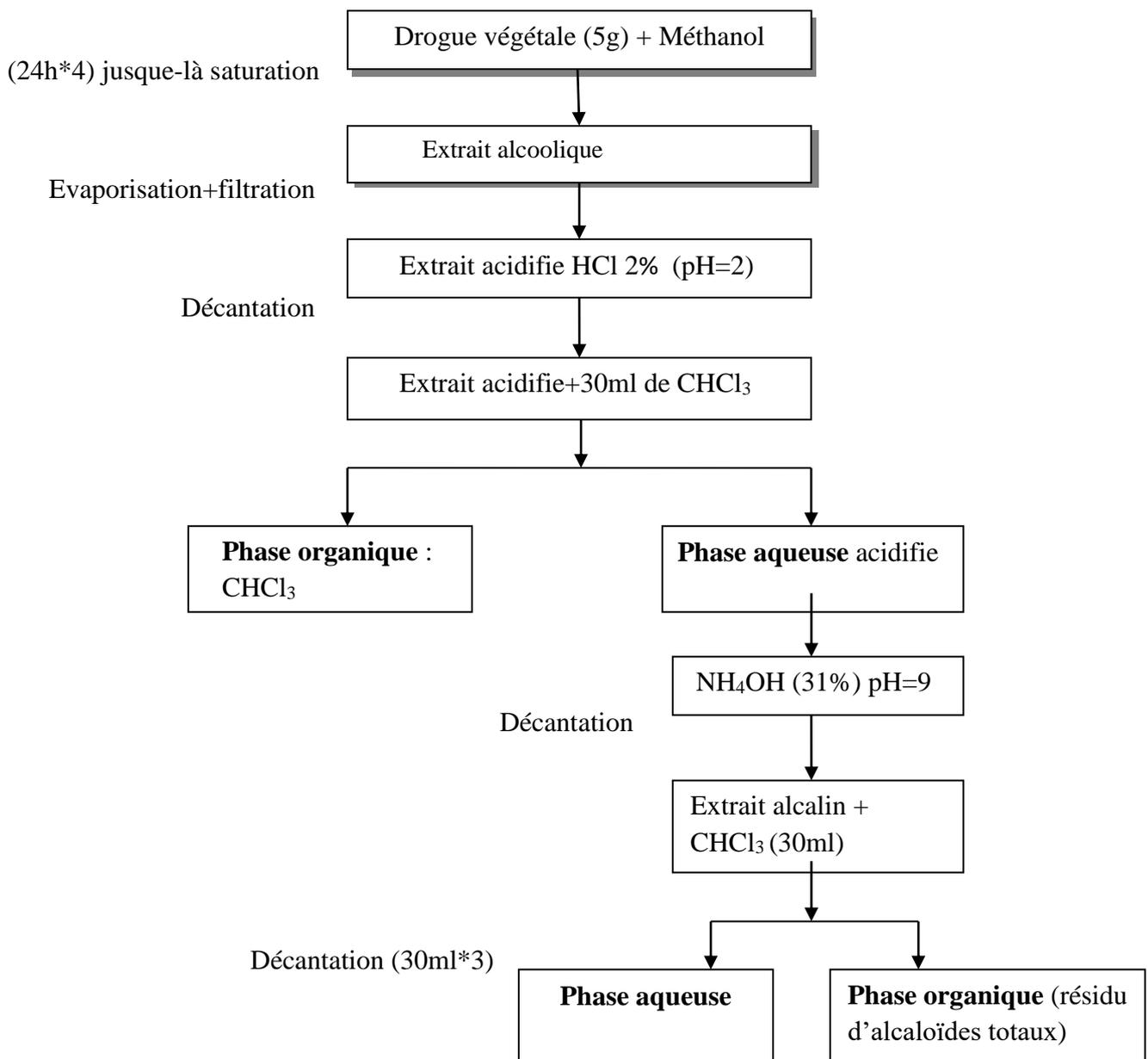


Figure 35. Protocole d'extraction des alcaloïdes

Protocole expérimental

- **L'extraction solide – liquide**

La macération est effectuée sur 5g de matière végétale dissout dans le Méthanol (80/20%) (v/v) dans un erlenmeyer de 200 ml. Le mélange est maintenu à la température ambiante et sous agitation pendant 4 jours. Le mélange obtenu subit une filtration pour la première

fraction, cette opération est répétée quatre fois. Les fractions sont recueillies et évaporées sous pression par un évaporateur rotatif.

- ***L'extraction liquide –liquide***

L'extrait brut est acidifié par 50 ml de HCl 1% (pH=2) et laissé pendant une nuit ce qui permet le dépôt des composés alcalins. Cette solution est traitée trois fois par 30ml de chloroforme. Chaque fois avec une forte agitation jusqu'à l'obtention de 2 phases (Phase aqueuse et phase organique O1) à l'aide d'une ampoule à décanter. Ajustement du pH est réalisé par l'addition d'une quantité définie d'ammoniaque à la phase aqueuse jusqu'à l'obtention d'un pH = 9.

On répète l'extraction avec le chloroforme de la même manière jusqu'à l'obtention d'une seconde phase organique.

2. Extraction des flavonoïdes

- Protocole expérimental

Une macération de 5g de la plante dans du méthanol a été menée pendant 3 jours. Après filtration, on recueille le filtrat et on le laisse reposer. La plante est soumise à une seconde extraction avec du méthanol dans les mêmes conditions. La solution obtenue est ajustée par de l'eau distillée après l'évaporation des deux filtrats. Ensuite, une série d'extractions liquide-liquide est réalisée par des solvants de polarité croissante :

- Par l'éther pour extraire les flavonoïdes libres.
- Par l'acétate d'éthyle et le butanol qui donnent la majorité des glycosuriques.

Les solutions organiques sont ensuite évaporées à sec en utilisant le Na₂SO₄ [76].

Remarque : nous n'avons pas terminé la deuxième partie de l'expérience en raison du manque des solvants (l'éther – l'acétate d'éthyle)



Figure 36. Extrait obtenu

V.1. Évaluation de l'activité antioxydant

➤ Piégeage du radical libre DPPH

Le test de piégeage des radicaux libres par des substances antioxydants est une méthode largement utilisée pour évaluer l'activité antioxydant. Le suivi de ce phénomène de réduction est assuré par un spectrophotomètre UV-Visible, qui permet de mesurer la variation de l'absorbance du DPPH à 517 nm. Le concept de cette procédure est fondé sur la réaction du DPPH avec le composé antioxydant. En présence de ce dernier, le DPPH violet est réduit en (DPPH-H) jaune, avec diminution de son absorbance caractéristique à 517 nm [77].

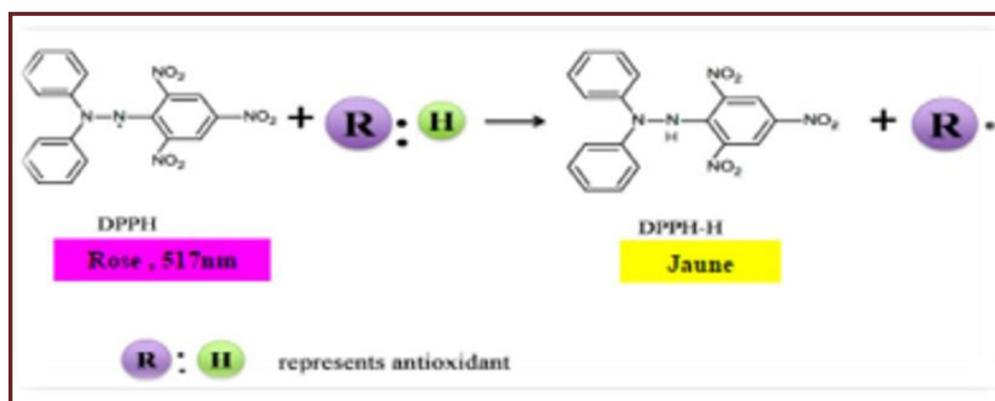


Figure37. Réduction du radical DPPH [77].

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du DPPH (I%) et calculés selon la formule suivante [78] :

$$I\% = ((A_0 - A_1) / A_0) * 100$$

- ✓ I% : pouvoir d'inhibition en %
- ✓ A₀ : absorbance de la solution de DPPH en absence de l'extrait
- ✓ A₁ : absorbance de la solution de DPPH en présence de l'extrait

L'évaluation d'activité antioxydant se déroule en deux étapes principales :

➤ la préparation de la solution DPPH :

On prépare une solution éthanolique de 0.004% en dissolvant 2mg de DPPH dans 50ml de d'éthanol. Après agitation, la solution (figure 38) est laissée à l'abri de la lumière pendant 2h (stabilisation d'absorbance).



Figure 38. Solution de DPPH

➤ Préparation des échantillons

Préparation d'une solution mère (0.4mg / ml) extraite par la méthode extractive la plus rentable. On réalise des solution fille en dissolvant 2 ml de solution mère dans 1 ml éthanol à différentes concentrations (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 et 0.0125 mg/ml)

Dans des tubes à essai, on mélange 2.5 ml de DPPH dans chaque tube avec 200 μ l de la solution. La lecture d'absorbance est établie à 517 nm après incubation de 30min à l'abri de la lumière.



Figure39. Réduction de radical DPPH et UV-Vis

VI.1. Activité antimicrobienne

1.1 .Origine des souches

Les souches utilisées dans ce travail sont des souches pathogènes qui proviennent de la collection du laboratoire LMBAFS.

1.2. Réactivation des souches

La réactivation des souches est effectuée par ensemencement dans bouillon BHIB à 37°C pendant 24 heures d'incubation. L'inoculum est ajusté à la densité optique de 0.08 à 0.10 et lue à la longueur d'onde de 625 nm qui correspond à 10^8 UFC/ml [79].

Tableau 11. Souches pathogènes utilisées

Souches	Référence
Staphylococcus aureus	ATCC33862
Pseudomonas aeruginosa	ATCC27853
Candida albicans	ATCC10231
Bacillus Cereus	ATCC10876
Escherichia coli	ATCC25922
B. subtilis	ACCT6633

ACCT : American Type Culture Collecté.

VI.2. Méthode de diffusion en puits AWDT (100)

La méthode de diffusion est très utilisée en microbiologie (antibiogramme et antifongogramme), reposée sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu semi solide (gélose molle). L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche de microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante. Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit testé [80].

- **Mode opératoire :**

Cette méthode consiste à couler 15 ml d'une gélose molle de Mueller- Hinton avec 100 µl d'une culture jeune de 24 h d'incubation sur une boîte de pétri. Après solidification à température ambiante dans une zone stérile, des puits sont creusés à l'aide d'un embout jaune stérile. On réalise 1 puits par boîte de 6 mm de diamètre. Un volume de 50 µl de extrait sont mises dans les puits. Du fait que la poudre de plantes et l'extrait sont soluble dans l'eau.

Les boîtes de pétri sont incubées à 37°C pendant 24h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (pré-diffusion) [81].



Figure40. Souches bactériennes utilisées et les boîtes de pétries

VI.3.Méthode de diffusion sur disque

- **Préparation des disques**

Des disques de papier Wattman de 6mm de diamètre ont été préparés. Ensuite sont mis dans un tube à essai. Le tube est stérilisé dans un autoclave et conservé jusqu'à leur utilisation.

Cette méthode permet d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits. Elle consiste à déposer un disque stérile imbibé de 10 µl de l'extrait sur un tapis bactérien au tout début de sa croissance et de mesurer la zone où les bactéries n'ont pas pu se développer. Le diamètre d'inhibition qui traduit l'activité antibactérienne de l'extrait est ainsi déterminé [82].

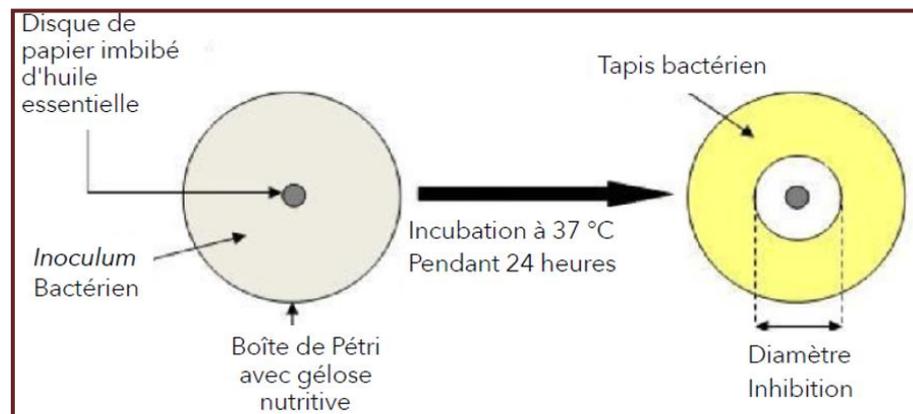


Figure 41. Principe de diffusion sur disque [83]

- **Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de pétries. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essoré en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée de haute en bas. L'opération est répétée 2 fois en tournant la boîte de 60°, l'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de pétries avec la même souche. Les disques de papiers wattman n°3 stériles de 6 mm de diamètre sont imbibés avec une micropipette de 10 µl de chaque extrait préalablement dissout dans l'eau et les boîtes incubées pendant 18 à 24 heures à 37c ° [84].



Figure 42. Boîtes de pétries contenant les disques séchés

VII.1. Étude de la cristallisation des phosphates sans inhibiteurs

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 pH= 6.5 et pH= 7, pH=8. L'urine est préparée en mélangeant deux volumes égaux de deux solutions A et B (**Tableau 12**). Le mélange des deux solutions donne l'urine artificielle à un pH=6.5. 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 50ml de la solution A sont versés dans un Erlenmeyer sous agitation à une température constante de 37 °C. Puis 50 ml de solution B sont versés dans le même Erlenmeyer 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 pesée 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 12. Composition de l'urine artificielle

Composition de solution A		Composition de solution B	
Composé	Concentration (g/l)	Composé	Concentration (g/l)
Na₂SO₄.10H₂O	11.02	NaH₂ PO₄. 2H₂O	2.65
Mg SO₄.7H₂O	1.46	Na₂H PO₄.12H₂O	18.82
NH₄Cl	4.64	NaCl	13.05
Ca²⁺	0.24	Na₃C₆H₅O₇.2H₂O	1.0
KCl	12.13	C₂H₅O₄	0.05

VII.2. Etude de cristallisation des phosphates en présence d'inhibiteur 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 testés 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 5, 10, 20 et 30 ml en plante médicinales 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 « *HCl* » ou le soude « *NaOH* » 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 série d'expérience de précipitation des phosphates à pH = 7. Le suivi de la masse des cristaux est établi par prélèvement des précipités à différents intervalles de temps (5, 10, 20, 20 minutes, 1 h et 2 h).

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

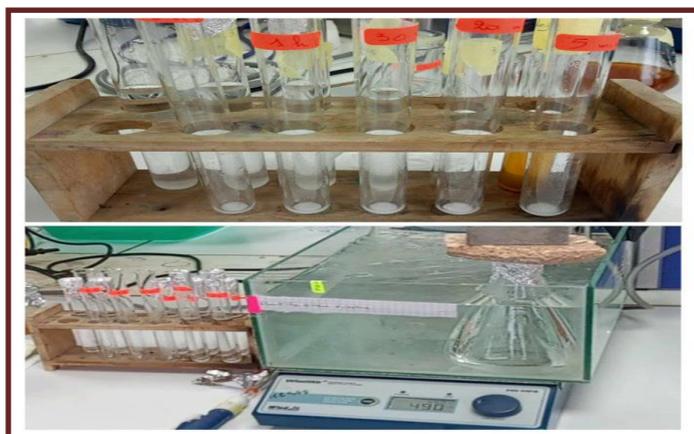


Figure43. Bain thermostaté

Chapitre IV :

Dans le présent chapitre, nous allons présenter et expliquer les résultats de notre étude. Cette dernière s'articule sur les méthodes d'extraction, la caractérisation physico-chimique et les activités biologiques. Nous concluons l'étude par la cristallisation des phosphates à différents pH.

1.1. Le rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé suivant la formule ci-dessous :

$$R\% = M \text{ extrait} / M \text{ échantillon} * 100$$

Avec :

- M extrait = masse de l'extrait en gramme
- M échantillon = masse de l'échantillon en gramme

Le tableau 13 regroupe tous les rendements des méthodes extractives réalisées

Tableau 13. Le rendement (%) de l'extrait de plant par différentes méthodes.

	Masse de l'extrait (g)	R%
Décoction	1.2999	51.99%
Infusion	0.9868	39.40%
Macération	1.2353	49.41%
Ultrasons	1.1707	46.80%
Soxhlet	0.8163	32.65%
Micro-onde	1.3861	55.44%

D'après les résultats du Tableau13, on remarque que le rendement le plus élevé (55.44%) est obtenu à partir de l'extraction par micro-onde suivi par celui obtenu par la décoction (51.99%). Par contre, le rendement de l'extrait le plus faible (32.65%) est enregistré par la méthode de Soxhlet.

Ces résultats peuvent expliquer par le fait que le choix de la technique d'extraction est un facteur intervient d'une manière directe dans l'extraction. En effet, quand notre plante est extraite par la méthode de la micro-onde, elle a la tendance à extraire des molécules bioactives

au maximum. En revanche nos résultats confirment que le facteur du temps n'a pas d'influence sur la rentabilité de notre extrait. Parce que le meilleur rendement est obtenu en utilisant la micro-onde qui n'a duré que 60 secondes.



On conclure que la meilleure méthode pour notre plante est l'extraction par micro-onde. Pour cela tous les études physique, chimique et biologique seront réalisés sur l'extrait de cette technique.

II.1. Résultats de la caractérisation physico-chimique et spectroscopique de la plante médicinale

Les résultats de quelques paramètres physico-chimiques de l'extrait de notre plante sont présentés dans le tableau 14.

Tableau14. Résultats des paramètres physico-chimiques

Paramètres	Teneur
Point de fusion	218 C°
La densité	1.0241
Indice de réfraction	1.3377
Le pH	4.14
Aspect physique	Liquide lourd
Couleur	Orange brûlée
Odeur	Aromatique

II.2. Résultats de test de la solubilité

Le tableau ci-dessous présente les résultats du test de solubilité en fonction des solvants organiques utilisés :

Tableau 15. Résultats des solubilités de la plante

Les solvants	Résultats
Ethanol	++
Acétone	+
Chloroforme	++
DMF	+++
DMSO	+++
Cyclohexane	--
Toluène	--
Dichloromethane	--
Diéthylène glycol	--
Eau	+
Méthanol	+

Ce tableau démontre que la plante est très soluble dans le DMSO et le DMF. Elle a une solubilité moyenne dans l'éthanol, chloroforme, l'eau, le méthanol et l'acétone. Par contre la plante est insoluble dans le cyclohexane, toluène, dichlorométhane et le diethylene glycol.

Dans notre pratique, on a choisi de l'éthanol comme un solvant adéquat pour notre plante.

II.3. Résultats de l'infra-rouge

L'analyse par spectroscopie infrarouge de la poudre de notre plante a donné le spectre représenté dans la figure 44.

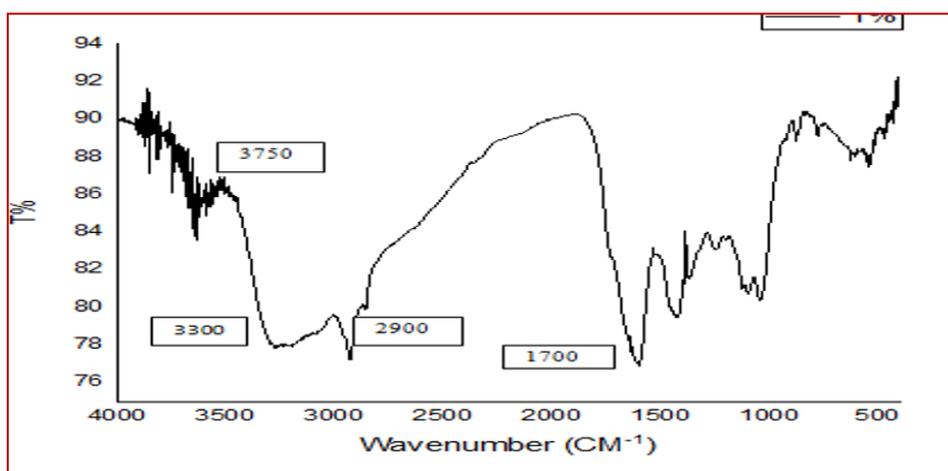


Figure 44. Spectre IRTF de la plante

Les résultats obtenus révèlent la présence d'une faible bande intense entre 3600-3750 cm^{-1} . Cela est attribué à la vibration d'élongation des groupements fonctionnels (NH). Une large bande entre le valeur 3000-3300 cm^{-1} est attribuée à la vibration du groupement de

l'hydroxyde (OH). Tandis que, la bande de vibration asymétrique de (CH) saturée est observée entre 2900-3000cm⁻¹.

De même, le nombre d'onde observé aux alentours de 1680-1700 Cm⁻¹ est attribué aux vibrations des groupements (C=O).

Les résultats obtenus à partir du spectre IR sont résumés dans le Tableau 16

Tableau 16. Principales bandes caractéristiques des groupes fonctionnels de la plante

Longueur d'onde (cm ⁻¹)	Types de liaison
3750	N-H
3300	O-H
2900	C-H saturé
1700	C=O

III.1. Screening phytochimique

Les tests phytochimique ont été réalisés sur l'extrait de la plante obtenue par la méthode de micro-onde. Ces tests sont effectués avec des solvants et des réactifs de révélation spécifique. Le tableau 17 regroupe les résultats obtenus

Tableau17. Résultats des tests de présences des métabolismes secondaires

Molécule	Remarque	Résultat de test
Les tanins		+++
Les coumarines		+
Les flavonoïdes		+++
Anthraquinone		+++
Saponines		++
Alcaloïdes		++
Les glycosides Cardiaques		++

- (+ + +) : Fortement positif
- (+ +) : moyennement positif
- (+) : Faiblement positif

- Les résultats cités dans (le tableau 17) montrent que l'extrait de notre plante est riche en flavonoïdes, les tanins et les anthraquinones. Ceci est confirmé grâce à la couleur intense de chaque solution traitée. Par contre, l'extrait contient des quantités faibles des alcaloïdes, glycosides, saponosides et les coumarines.

III.2. Dosage des composés phénoliques

A) les phénols totaux

courbe d'étalonnage

La courbe d'étalonnage est élaborée par une solution standard de l'acide gallique à différentes concentrations. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de $y=0,0098x$ avec un coefficient de corrélation R^2 égale à 0,999.

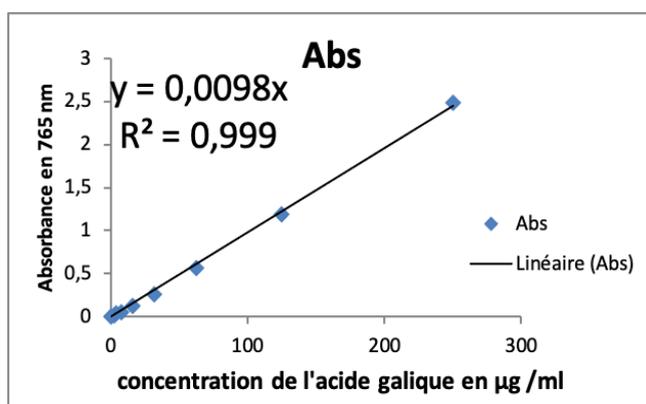


Figure 45. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols

A partir de cette courbe d'étalonnage nous avons déduit la concentration des phénols totaux dans notre extrait à différentes concentrations. Cette concentration est exprimée en mg équivalent acide gallique /100g de matière sèche (mg Eq. acide gallique/100g M.S).

Tableau 18. Concentrations de phénols totaux dans l'extrait

Absorbance	Concentration de phénols totaux (mg Eq. Acide gallique / 100g M.S)
0.0457	4.66
0.0506	5.163
0.0507	5.173
0.0725	7.397
0.0875	8.928
0.1448	14.77
0.1488	15.18

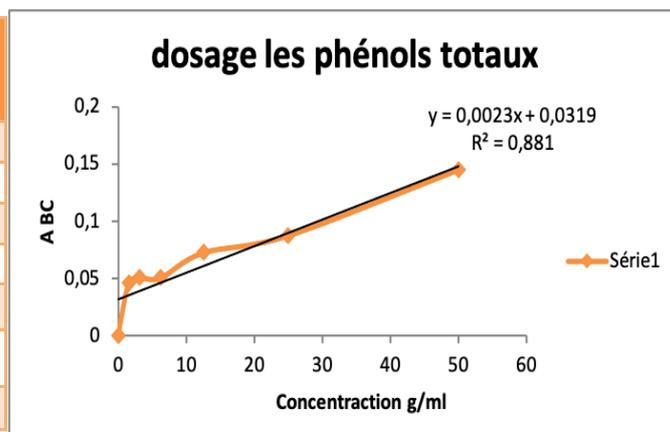


Figure 46. Dosage de phénols totaux

A travers les résultats du tableau 18 et le graphe présenté dans la figure 46, nous pouvons voir que l'augmentation de la concentration des solutions étudiées conduit à l'augmentation des absorbances (figure 46). Cette augmentation conduit à une augmentation de la concentration des phénols totaux comme indiqué dans le tableau 18.

B) Dosage des flavonoïdes

La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant les différentes concentrations de la quercétine (un flavonoïde très connu de la famille des falvonols). Le taux des flavonoïdes ont été obtenu à partir de la courbe d'étalonnage qui suit une équation de type : $y = 0,037x$ sachant que $R^2 = 0,994$.

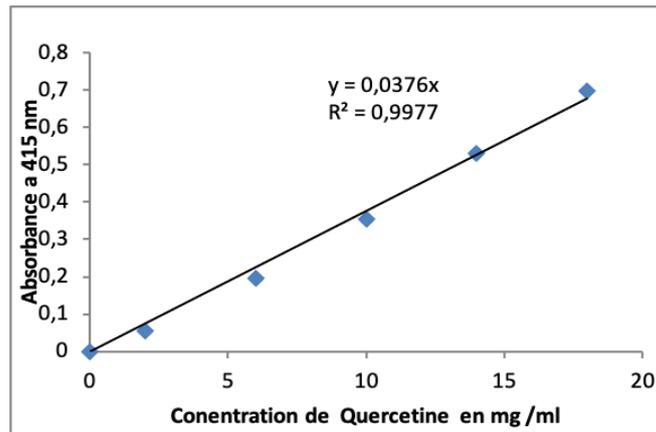


Figure 47. Courbe d'étalonnage de la Quercétine pour le dosage des flavonoïdes

Tableau19. Concentration des flavonoïdes totaux

Absorbance	Concentration de flavonoïdes totaux (mg. Eq Quercétine /100g M.S)
0.2231	6.029
0.3922	10.6
0.7394	19.983
1.4643	39.575
2.8297	76.478
3.5751	96.62
3.7142	100.38

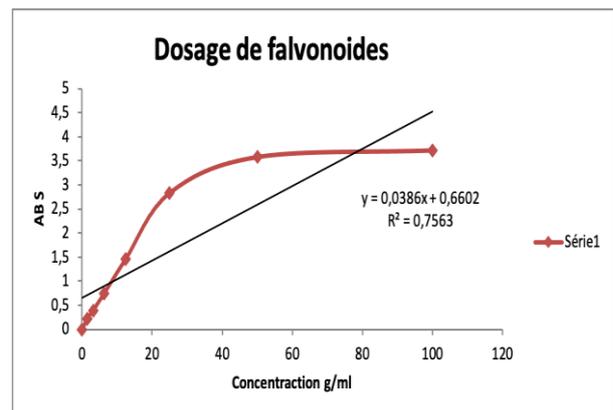


Figure 48. Dosage de flavonoïdes

D'après nos résultats, la quantité des flavonoïdes dans l'extrait est de 100,38 (mg. Eq Quercétine /100 g M S). Donc la plante végétale est riche en flavonoïdes.

A partir de nos résultats obtenus, nous remarquons que la croissance de la concentration d'extrait entraîne l'augmentation des absorbances (figure 48). Par ailleurs, cette croissance mène à une augmentation de la concentration des flavonoïdes totaux comme le montre le tableau 19.

C) Dosage des tanins

La catéchine a été utilisée à différentes concentrations comme standard pour tracer la courbe d'étalonnage. Cette dernière nous permet de calculer la concentration du tanin dans l'extrait de notre plante à différentes concentrations.

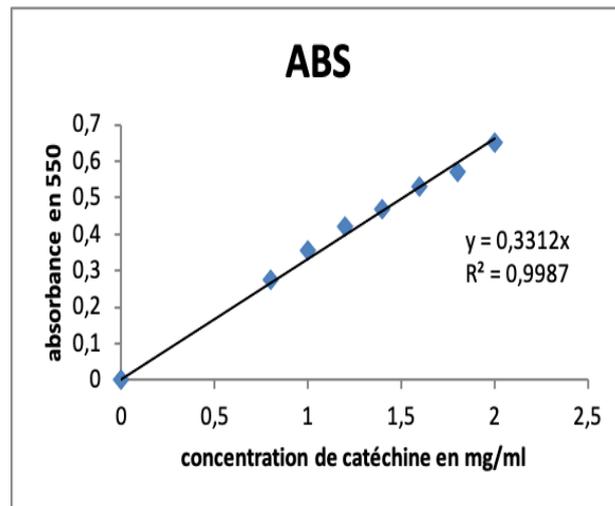


Figure 49. Courbe d'étalonnage de catéchine pour le dosage des tanins

Tableau 20. Concentration des tanins (mg. Eq Catéchine/100g.MS)

Absorbance	Concentration de tanins en (mg. Eq catéchine / 100g M.S)
2.0742	6.266
3.1752	9.592
3.2432	9.798
3.3814	10.215
3.4253	10.348
3.4836	10.524
3.7063	11.197

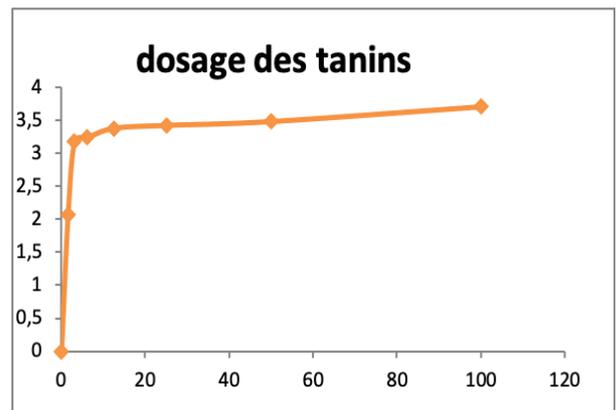


Figure 50. Dosage des tanins

D'après les résultats trouvés, la quantité maximale de tanins dans l'extrait est de 11,197 mg. Eq catéchine / 100 g M.S.

On remarque que le dosage des tannins révèle également qu'une augmentation de la concentration de notre extrait entraîne une augmentation de la concentration des tanins.

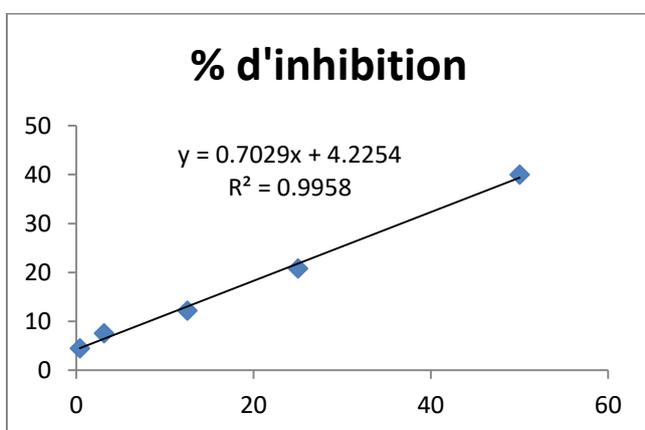
- Les trois essais réalisés ont permis de conclure que la concentration des composés phénoliques augmente proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de notre extrait de la plante médicinale.

IV.1. Évaluation de l'activité antioxydant

L'activité anti-radicalaire est réalisée par la réduction de radical 2, 2-diphényl - 1picrylhydrazyl (DPPH) en 2, 2-diphényl -1picrylhydrazyn (DPPH-H). C'est une méthode fréquemment utilisée pour déterminer l'activité antioxydant des différentes substances.

Nous avons pris l'acide ascorbique à différentes concentrations comme standard pour comparer les résultats fournis par la plante à ceux fournis par l'acide ascorbique.

Tableau 21. Concentration de l'acide ascorbique



Concentration mg/ml	% d'inhibition
50	40
25	20,8
12,5	12,2
3,12	7,6
0,39	4,5

Figure 52. Pourcentage d'inhibition du radical DPPH en fonction des différentes concentrations de l'acide ascorbique

IV.2. Détermination de la concentration inhibitrice moyenne IC50

La concentration inhibitrice moyenne (IC50) de l'acide ascorbique a été déterminée en se basant sur la courbe indiquée dans (la figure 53)

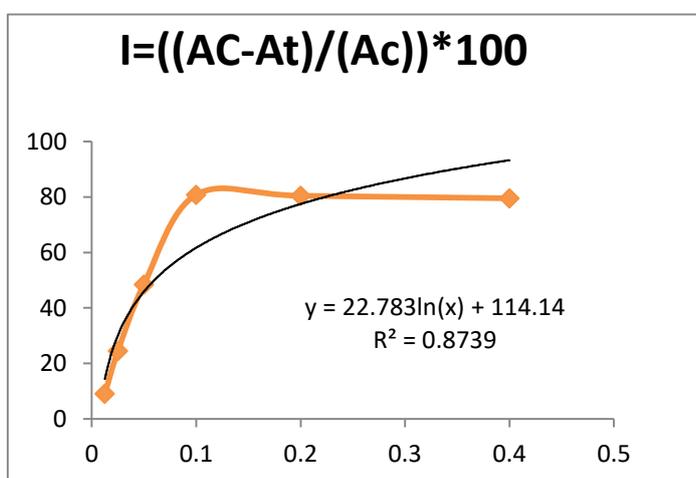


Figure 53. Pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait

Les résultats de calcul montrent que l'acide ascorbique donne une valeur de l'IC50 égal à 65,2µg/ml alors que celle donnée par notre extrait est de l'ordre de 59,9 µg/ml.

Ceci implique une activité antioxydant plus importante. Ce résultat était confirmé par changement de couleur (du violet au jaune) des essais que nous avons établi lors de la réaction des extraits avec le DPPH.

V. Activité antibactérienne de l'extrait

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérienne de l'extrait par la méthode de diffusion en puits AWDT (barefoot **et Kaenhammer**, 1983) sur un milieu de gélose molle. Mueller-Hinton. C'est le milieu le plus utilisé pour faire ces tests d'antagonismes.

L'activité antibactérienne de l'extrait a été estimée en terme de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant l'extrait à testé vis- a vis aux six souches microbiennes utilisées.

D'après les résultats obtenus (Tableau 22), on remarque que notre extrait a une activité antimicrobienne très élevée sur toutes les souches en se basant sur la loi de (**Barros et coll.**, 2007), qui définit la relation entre le diamètre d'inhibition enregistré et le pouvoir microbien.

- ✓ Diamètre inférieurs à 7 mm aucun activité antimicrobienne
- ✓ Diamètre de 7 à 9,9 mm activités antimicrobiennes faibles
- ✓ Diamètre de 10 à 11,9 activités antimicrobiennes modestes
- ✓ Diamètre de 12 à 15 activités antimicrobiennes élevées.

Tableau 22. Zone d'inhibitions (mm) de la souche pathogène sous l'effet de l'extrait de la plante.

La souche	Zone d'inhibition/ mm
Staophylococcus aureus	24mm
Condida albicans	19mm
Pseudomonas aeruginosa	31mm
Bacillus Cereus	20mm
Escherichia coli	15mm
B.subtilis	11mm

Les souches testées dans cette étude sont toutes sensibles aux extraits mais à des degrés différents.

Les résultats montrent que l'extrait présente une activité anti bactérienne contre les souches bactériennes pathogène (*Pseudomonas aeruginosa*) avec une inhibition maximale de 31 mm.

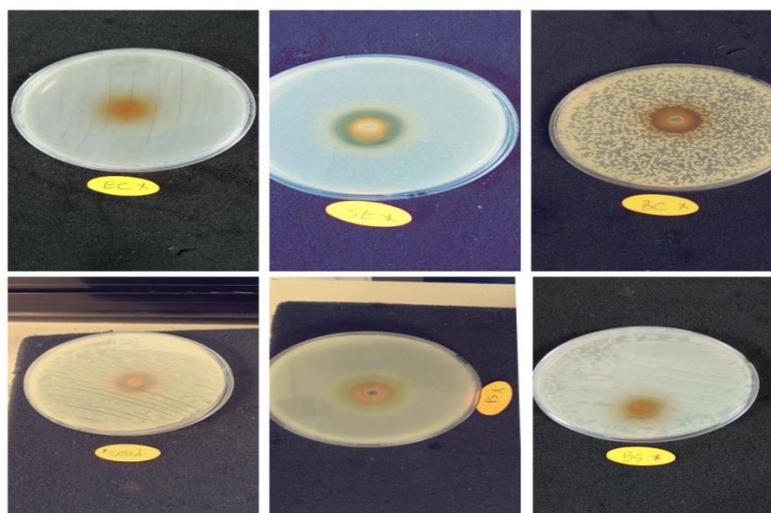


Figure 54. Activité antibactérienne de l'extrait végétale sur les souches microbienne

VI. Étude de la cristallisation sans inhibiteurs

L'étude est réalisée sur l'urine artificielle à base de phosphates à différents pH.

VI.1. Cristallisation à pH=6.5

Les résultats de l'évolution du taux de dépôt en fonction du temps sont donnés par le tableau 23.

Tableau 23. Évolution du taux de dépôt à pH= 6.5

<i>Temps (min)</i>	<i>Taux de dépôt</i>
5	5%
20	10%
30	55%
60	50%
120	78%

Les spectres infra-Rouge réalisés sur le précipité récupéré, après 2 heures, confirment l'apparition de la seule espèce cristalline, qui est la bursite. Nos spectres ont été comparés à ceux de la bibliographie pour toutes les espèces cristallines étudiées.

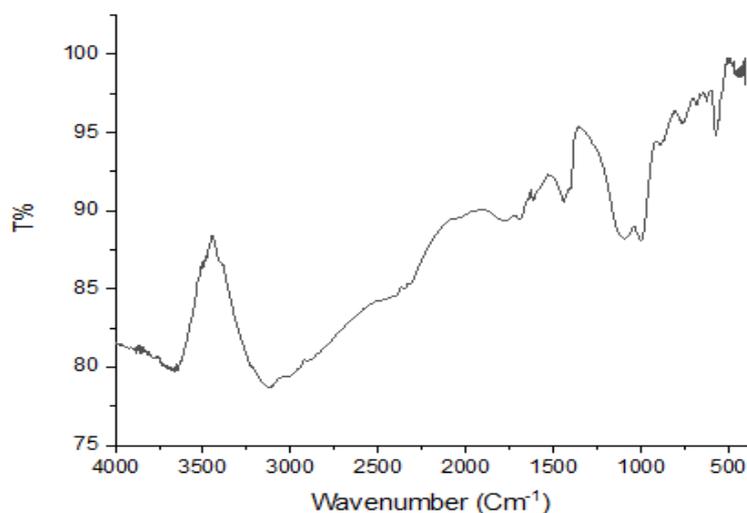


Figure 55. Spectre IRTF des phosphates à pH=6.5

Tableau 24. Etude de Principales fréquences de vibrations des bandes à pH= 6.5

Nom minéralogique	Formule	Abréviation	Pics caractéristiques
Brushite	CaHPO ₄ 2H ₂ O	Bru ou DCDP	TF : 1135-1060 cm ⁻¹ F : 985
Pics observés (cm ⁻¹)			
3541F ; 3490m ; 1650m ; 1218 ; 1060TF ; 985 ; 872m ; 577m ; 524f .			
Identification du constituant			
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Valence des molécules H₂O à 3541-3490 cm⁻¹ ➤ Valence asymétrique des PO₄³⁻ à 1135 ; 1060 ; 985 cm⁻¹ ➤ Bandes secondaires des PD₄³⁻ à 1650 (fime) ; 1218 et épaulement à 1000 cm⁻¹ de la bande à 985 cm⁻¹ 			

VI.2 .Cristallisation à pH=8

A pH=8, les granulations sont formées instantanément et les cristaux de struvite sont apparus au bout de 5 min. Les cristaux de la struvite sont formés immédiatement après addition de la solution B (tableau 25).

Tableau 25 .Évolution du taux de dépôt à pH=8

Temps (min)	Taux de dépôt
5	20%
20	30%
30	40%
60	50%
120	50%

Les spectres infra rouges réalisées sur le précipité récupéré après 60 minute confirment l'apparition d'une seule espèce cristalline, qu'est les struvite. Nos spectres ont été comparés à ceux de la bibliographie pour toutes les espèces cristallines étudiées.

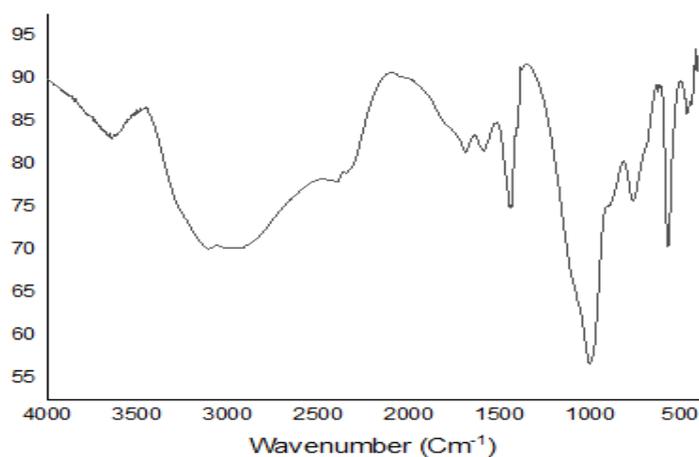


Figure 56. Spectre IRTF des phosphates pH=8

Tableau 26. Etude de Principales fréquences de vibrations des bandes IRTF de struvite à pH=8

Pics observés (cm⁻¹)			
3411f ; 1634f, 1437m ; 1020TF ; 600,567m ; 761 m ; 893f ; 1436m ; 2362m.			
Nom Minéralogique	Formula	Abréviation	Pics caractéristiques (cm⁻¹)
Carbapatite		CA	F:1020cm ⁻¹ 1460 cm ⁻¹ ;600cm ⁻¹
	Identification du constituant		
	❖ Valence asymétrique PO ₄ ⁻³ à 1020 forte, asymétrique à gauche, épaulée à 1100 cm ⁻¹ ❖ Valence symétrique faible de PO ₄ ⁻³ à 960 cm ⁻¹		
Struvite	MgNH ₄ PO ₄ 6H ₂ O	STR ou MAP	TF:1020cm⁻¹ m:2362 cm-1 m:1436cm-1
	Identification du constituant		
	✓ Déformation de l'ion ammonium à 1436 cm ⁻¹ ✓ Plateau des molécules H ₂ O +ion NH ₄ ⁺ à 2362 cm ⁻¹		

VI.3 .Cristallisation pH=7

Dans le cas de la cristallisation des phosphates à pH =7, nous avons remarqué que le mélange réactionnel devient turbide. Les cristaux de la struvite se forment les premiers après 20 minutes, contrairement aux cristaux de la Brushite qui sont observés au bout d'une heure.

Tableau 27. Évolution du taux dépôt à pH = 7

Temps (min)	Taux de dépôt
5	10%
20	20%
30	60%
60	60%
120	60%

Les spectres infra rouge réalisés sur le précipité après 30 min confirment l'apparition de deux espèce cristalline (la struvite et la Brushite) et du phosphate amorphe de calcium carbonaté (PACC).

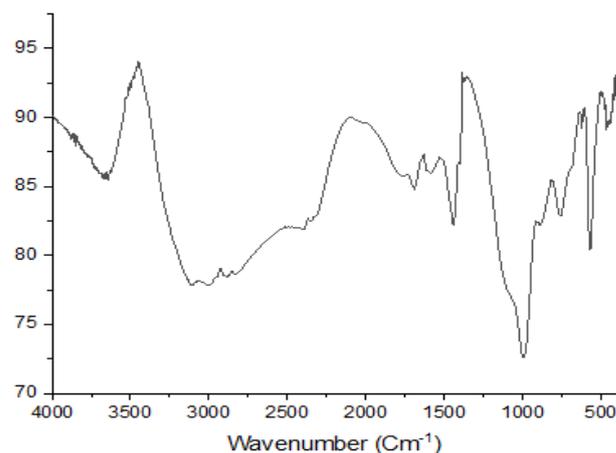


Figure 57. Spectre IRTF des phosphates pH=7

Tableau 28. Etude de Principales fréquence de vibration des bandes IRTF à pH= 7

Pics observés (Cm ⁻¹)			
3544F ; 3490m ; 1650m ; 1218m ; 1060TF ; 1135TF ; 985F ; 872m ; 577m ; 524F; 1436;2378			
Nom minéralogique	For mule	Abréviation	Pics caractéristiques (cm ⁻¹)
Brushite	CaHPO ₄ , 2H ₂ O	Bru ou DCDP	TF : 1135- 1060 cm ⁻¹ F: 985
	Identification de constituant		
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Valence des molécules H₂O à 3541-3490 cm⁻¹ ✓ Valence asymétrique des PO₄³⁻ à 1135 ; 1060, 985cm⁻¹ ✓ Bandes secondaires des PO₄³⁻ à 1650 (fine) ; 1218 et épaulement à 1000cm⁻¹ de la bande à 985 cm⁻¹ 		
Struvite	MgNH ₄ PO ₄ , 6H ₂ O	STR ou MAP	TF :1060cm ⁻¹ m : 2378 cm ⁻¹ m :1436 cm ⁻¹
	Identification du constituant		
	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Déformation de lion ammonium à1436 cm⁻¹ ✓ Plateau des molécules H₂O +ion NH₄⁺ à2378 cm⁻¹ 		
PACC	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Bande phosphate, arrondie, forte, asymétrique, centrée sur 1060 cm⁻¹ ✓ Pas de bande à 600 cm⁻¹ 		

On note que les espèces phosphatiques cristallisables étudiée sont dépendantes du pH du milieu.

VI.4. Étude de la cristallisation en présence d'inhibiteur à pH = 7

Les résultats de l'évolution des cristaux de struvite et Brushite, en présence des différentes concentrations de la plante médicinale (tableau 29).

Tableau 29. Evolution des cristaux de la struvite et de la Brushite en présence de la plante

Taux de dépôt				
Temps (min)	5ml%	10ml%	20ml%	30ml%
5	2	12	18	40
10	5	14	20	45
20	5	10	25	40
30	10	15	30	50
60	10	15	35	50
120	10	15	35	50

D'après le spectre du précipité d'une heure, on remarque que les deux cristaux (la struvite et la Brushite) persistent toujours.

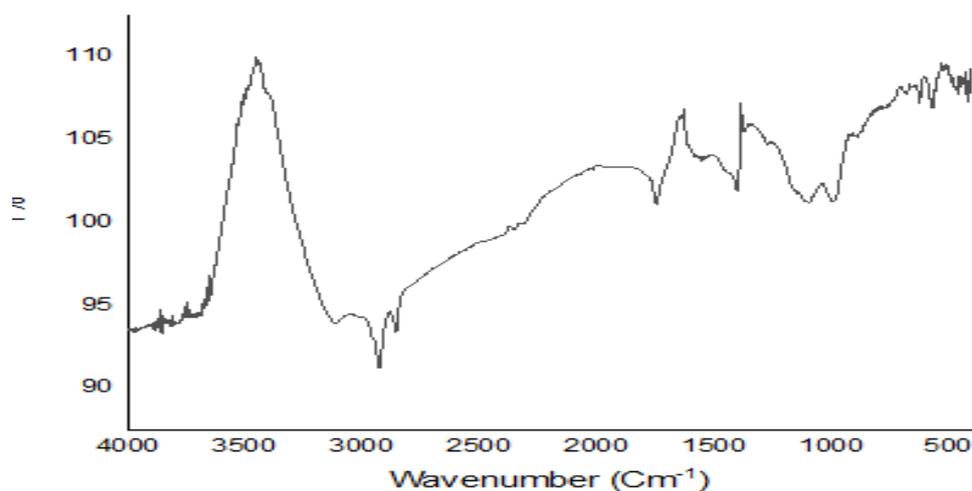


Figure 58. Sceptre IRTF en présence de 5ml de la plante (1h)

Après l'addition d'un volume de 10 ml de l'extrait, on remarque une inhibition partielle des cristaux de la struvite et la brushite (figure 59). L'inhibition est presque totale, après l'ajout

de 20 ml de l'extrait de la plante médicinale seulement les phosphates amorphes qui persistent (PACC) (figure 60).

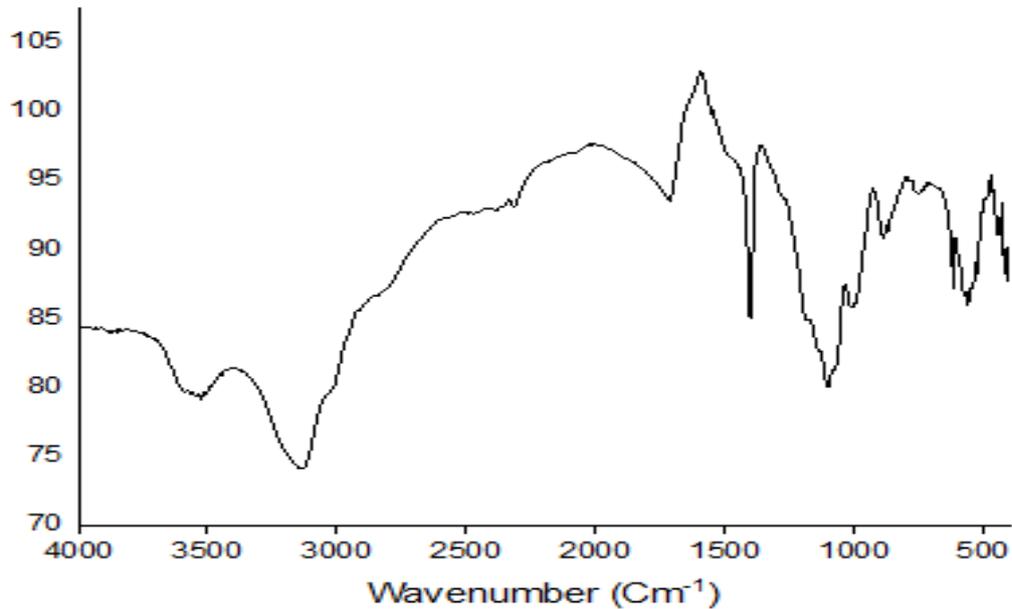


Figure 59. Spectre IRTF en présence de 10ml de la plante (2h)

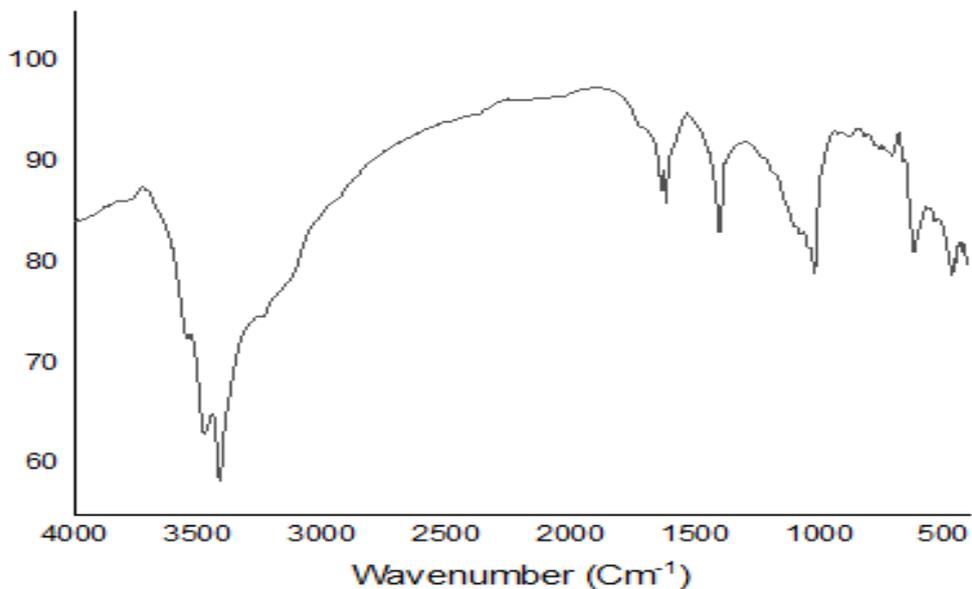


Figure 60. Spectre IRTF en présence de 20ml de la plante (2h)

On observe d'après le spectre infra rouge (figure 61), que l'addition de 30ml de l'extrait de la plante médicinale provoque la disparition totale de la struvite et la Brushite. Il reste quelques traces de la matière amorphe (phosphate de calcium amorphe carbonaté (PACC)).

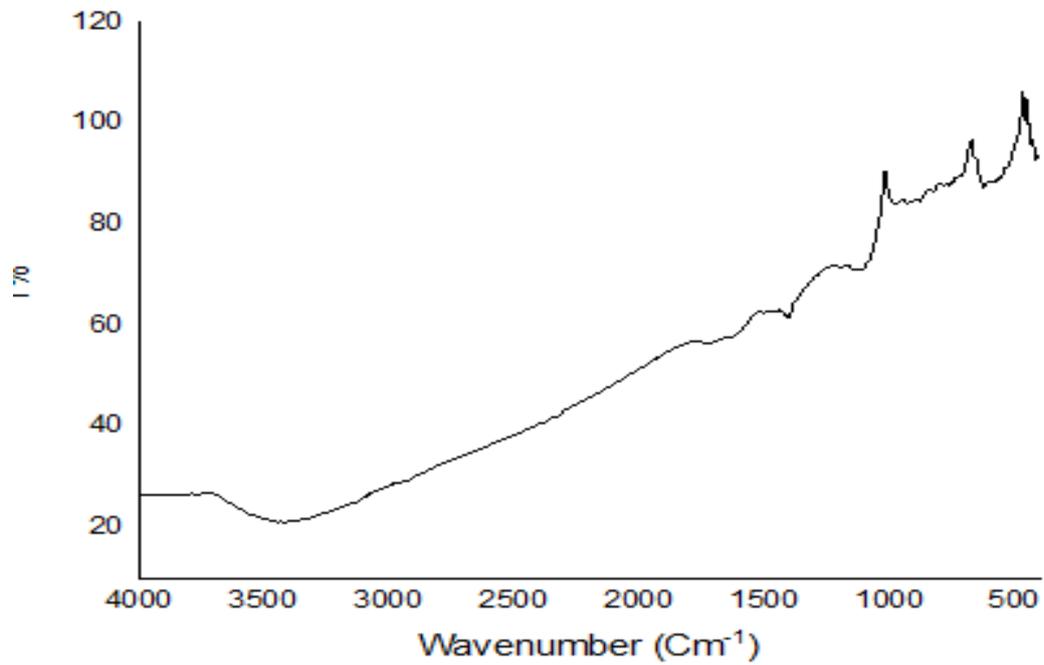


Figure 61. Spectre IRTF en présence de 30ml de la plante (2h)

On conclu que cette plante médicinale a un effet inhibiteurs important sur la formation des cristaux phosphatés en particulier la struvite et la Brushite à des concentrations modérés de son extrait.

Conclusion générale

Les plantes médicinales restent toujours une vraie source patrimoine de l'être humaine, leur importance manifeste à des différents principes actifs connus par leurs propriétés thérapeutique.

D'après notre étude phytochimique et biologiques sur le poudre de la plante végétale, nous pouvons tirer un certain nombre de conclusion.

- L'extraction de ces molécules bioactives a donné un rendement important 55.44% en utilisant l'extraction par micro-onde.
- Le screening phytochimique a montré que la plante est riche en flavonoïdes et les tanins, les alcaloïdes. Ceci nous laisse prédire une utilisation prometteuse dans le domaine de médecine.
- Le résultat obtenu de l'activité antioxydant de l'extrait est encourageant avec un $IC_{50} = 59,2 \mu\text{g/ml}$.
- Les résultats de l'activité antibactérienne montre que l'extrait possède une activité microbienne importante contre les souches bactériennes pathogènes.
- L'évaluation de l'étude de cristallisation des phosphates montre que la plante possède un pouvoir considérable dans l'inhibition de la formation des cristaux de la struvite et la Brushite.

A travers ces résultats, cette plante médicinale est considérée comme une source importante de molécules actives qui sont indispensables dans le domaine médicales et pharmaceutique.

Les références

- 1) **Ghnimi W**, 2015. Etude phytochimique des extraits de deux Euphorbiacées : Ricins communis et Jatropha curcas Evaluation de leur antioxydante et de leurs action sur l'activité cetylcholinestérase. Thèse de doctorat université de lorraine (France) et université de Carthage (Tunisie) P2
- 2) **Kada S**, 2018. Recherche d'extraits de plantes médicinales doués d'activités biologique. Thèse de doctorat université Farhat Abbas Sétif.
- 3) **N.Zeghad**, 2009. Etude du contenu poly phénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (thymus vulgaris, Rosmarinus) et évaluation de leur l'activité antibactérienne. Mémoire de magister, université de constantine, P1.
- 4) **Ernest.S et Paul.M**, C ,200. Les cultures médicinales canadiennes, édition les presses scientifiques des CNRC, Ottawa, 283p.
- 5) **Hennezel, Whitechurch**, 2007. Plants medicinales d'hier et d'aujourd'hui. Paris France : Editions Ho7beke.
- 6) **Walsh.G**, 2003. Biopharmaceuticals: biochemistry and biotechnology, 3rd chinchester: Wiley, England.
- 7) **Bellakhdar.J**, 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle, Médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Bis press.pari 764p.
- 8) **Aillaud et al**, 2012. Les plantes aromatiques et médicinales (un exemple de développement humain au Maroc la coopérative féminine de ben Karrich-Tetouan.
- 9) **Rodet, J.C**, 2012. vertus médicinales des plantes aromatique, édition Marcel broquet Canada, 201p.
- 10) **Avello.M, & Amp Cisternas.I**, 2010. Fitoterapia sus origenes caracteristicas y situation en Chile, 138(10) ,1288-93.
- 11) **OMS** (organisation mondiale de la santé), 1998. Règlementation des médicaments à base de plante, la situation dans monde pour 1998. Who/TRM/98.1. Genève.
- 12) **Baytop.T, Sütlüpinar.N**, 19986. Characteristics of « Nanahan » cultivated in Anatolia and its volatile. J Fac. Pharm. Istanbul, 22 :73-76.
- 13) **Boukhatem, M.N, Kameli, A., Ferhat, M.A., Saidi, F., & amp; Mekarnia, M.** 2013. Rose geranium essential oil as a source of new and safe anti-inflammatory drugs. Libyan Journal of medicine, 8(1).
- 14) **Sabrina Boutefnouchet**, 2017. Introduction à la phytochimie, méthode innovantes d'extraction de purification de l'identification des composés (déréplication), p02
- 15) <http://www.mémoireonline.com/11/12/6485/m.screening.phytochimique-de-Achillea-Millefolium-1-et-Bridelia-Brifeliifolia-et-teste-activi11-html>
- 16) **Mamadou Badiaga**, 2011. étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de nauclea latifolia Smith, une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, chimie organique, université blaise Pascal, 09p.
- 17) **Glombtiza, K, W, Gestberger, G.** 1985. *Phytochemistry* (Elsevier). 24, 543-551p.
- 18) **Martin S, et Andriantsitohaina R**, 2002. Mécanismes de la protection cardiaque et vasculaire des poly phénol.

- 19) **Marouf, A. et Reynaud, J**, 2007. La botanique de à Z. Dunod, Paris, 342p.
- 20) **Boutaout Nassima**, 2012. Recherche et détermination structurale de métabolites secondaires d'*atricaria chamomilla* (asteraceae), étude de la phase acétate d'éthyle, thèse de magister en chimie organique, université Constantine 1, SM chimie, p05.
- 21) **Stalikas, C.D**, 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoïds. *Journal of separation science*, 30(18), 3268-3295.
- 22) (<https://www.espritsante.com/articles/acide-phenolique>)
- 23) **Karak, P.** 2019. Biological activities of flavonoïdes: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*
- 24) (<https://www.aquaportail.com/definition-10084-flavonoide.html>)
- 25) **Hurabielie, M**, 1981. **Flavonoids** of *Artemisia campestris* ssp. *Glutinosa*. *Planta Med.* 46(2) :124-125.
- 26) **Bruneton, J.**, 1999. Les tanins. Ed. Eddition médicales internationales. Paris, 369-404p.
- 27) **Wilfred, V., ET Ralph, N.**, 2006. Phenolic compound biochemistry Ed Springer. USA, 24p.
- 28) **Fleuriet, A, Jay-Allemand, C, et Macheix, J.J**, 2005. **Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique.** Presses polytechniques et universitaires romandes, 121-216p.
- 29) **Harborne, J B, Herbert, B**, 1995. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of bioactive compound from plants.* Bristol : Taylor & Francis. 791p.
- 30) **Doncheva, T., Kostova, N., Yordanova, U., et al**, 2014. Comparidon of alkaloid profile from *Glaucium comiculatum* (papaveaceae) of Algerian and Bulgarian origin. *Biochemical Systematis and Ecology*, 56, 278-342p.
- 31) **Wichtl M Anton R.**, 2009. *Plantes thérapeutiques tradition, pratique officinale, science et thérapeutique.* Edition lavoisier, Paris, 98-41p.
- 32) **Ghedjati Nadhara**, 2014. Toxicité agiue et subaigue des alcaloïdes naturels et synthétique des graines du *datura stramonium*, thèse magister en biologie, université Ferhat Abbas, Sétif, 12p.
- 33) (<https://www.fichier-pdf.fr/2017/12/05/pharmacognosie-4-12-11h15-12h15/>)
- 34) **Upadhyay, N. k, M.Y & Gupta, A**, 2010. Antioxydant, cytoprotevte and antibacterial effects of Sea buckthom (*Hippophae rhamnoides* L). *leaves food and chemical toxicology* 48(12), 3443-3448p.
- 35) **Bruneton, J**, 2001. *Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux* 2éme Ed : TEC & Doc.
- 36) **N, Dohou, Kyamni, S, Tahrouch, L M Idrisi Hassani, et al**, 2003. screening phytochimique d'une endémique Ibéro Marocaine, *thyMelaea lythroides* scopharm *Bordeau* 142 :61_78p
- 37) (https://www.researchgate.net/figure/Structure-de-quelques-composants-terpeniques-retrouves-dans-le-curcuma-15_fig9_325686735)
- 38) **O-Ben-Aissa**, 2011. Thèse de doctorat, Etude des métabolismes terpénique et flavonique d'espèces de la famille des composées, genres *Chrysanthemum* et *Rhantherium*. *Activité biologique*, université de Constantine, 64-68p.
- 39) **Benzi F**, 1999. « L'histoire des plantes en méditerranée : art et botanique ». Ed Actes Sud. 1755 Pages. Pages 80-81.
- 40) **Benhamza Louiza**, 2008. Doctorat d'état en sciences vétérinaires option anatomie.
- 41) **A Marrouf, G Tremblin**, 2007. *Abrégé de biochimie appliquée*, EDP sciences 2009.

- 42) <http://dspace.univ-tlemcen.dz/bistream/112/5848/3/chapitre-II.pdf>.
- 43) **Wang L, et weller, C.L.** 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in food science.
- 44) **E.s** (Equipement scientifiques), distributeur à valeur ajoutée et créé depuis 1963 et certifié ISO version 2015.
- 45) **A Mark Smith**, 1996. Ptolem's theory of visual perception, vol 86, Transactions of the American physophysical society, partie 2. P42-45.
- 46) **Ghazali, D., & Zaid, A. (2013)**. Etude de la qualité physico-chimique les eaux de la source Ain Salama-Jerri (Région de meknès-Maroc). Larhyss P-Issn.
- 47) **Grobow B, Michel N.** Solubilité des solides dans l'eau : propriété de surface ou du solide ; la 6^{ème} journée scientifique de marcoule, 15-19 mai 2006, p 1,53p.
- 48) **Bentabet Lasгаа N.** 2015. Thèse de doctorat. Etude phytochimique et évaluation des activités biologiques de deux olantes *fredolia retiodes* et *echiumvulgre* de l'ouest Algérien.
- 49) **Chew, M.H, XU, G. G, Ho, P.W, & lee C.W** ,2009. A propos d'un cas de syndrome compartimental glutéal après traitement chirurgical d'un anévrisme de l'aorte abdominale. Annles de chirurgie vasculaire, 23(4), 17-21.
- 50) **Cowan, M.M.** 1999. Plant products antimicrobial agents. Clinical microbiology reviw, 12(4), 564-582.
- 51) **Scalbert.A**, 1991. Antimicrobial propriétés of tanins. Phytochemistry, 30, 3875-3883.
- 52) **Dagila.M**, 2011. polyphenols end antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology, 23, 1-8.
- 53) **Ulanowska.K, Traczyk.A, Konopa.G & Wegrzyn.G**, 2008. Differential antibacterial activity of genistein artising from global inhibition of DND, RNA and protein synthesis in some bacterial stains. Arch microbiaol, 184(5), 271-278.
- 54) **Belbcir.L**, 2007. mémoire de magister étude des composés phénoliques en tant que marqueurs de biodiversité chez les céréals.
- 55) **Haffar, H**, 2014. Electro polymérisation et caractérisation de nouveaux polymères sur substrat transparent (FTO) pour usage dans les cellules photovoltaïques organiques (doctoral dissertation, université de M'sila).
- 56) **Cambridge.MA**, 2012. jove science éducation detabase. Analytical chemistry. spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis).
- 57) **Solberg.S, Saugen.E, Swenson.L, Brun.L, Isaksoon.T.** Determiation of fat in live farmed Atlantic salmon using non-invasive NIR techniques ; Departement of fishies and naturel science, Bodo Regional University, N-8049 Bodo, norway, journal of the science of food and agriculture, Vol.83, p.692-696.
- 58) **Siesler.H, W, Ozaki.Y, Kawata.S, & Heise. H, M.** (Eds), 2008. Near-infrared spectroscopy: principles instruments, applications. John Wiiley & sons.
- 59) **Bisaz S, Felix R, Nelman WF, Fleesch.** 1984. Quantitative determiation of inhibitors of calcium phosphate precipitation in whole urine. Nephrologie.5 :175-179.
- 60) **Kol Dj, Papapouls SE, Buvoet OLM**, 1990. Crystal agglomeration is a majeure in calcium oxalate urinary stone formation. Kedny Int, 37 :51-56.
- 61) **Ryall RL, Marshall VR**, 1981. The effect of urine, pyrophosphate, citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystazation in vitro. Clinca Chimica Acta, 112,349-356.

- 62) **Grases F, Söhnel O, Vilacamp A.I, March J.G**, 1996. Phosphates precipitating from artificial urine and fine structure of phosphate renal calculi. *Clinica Chimica Acta* 244, 45-67.
- 63) **Many U, Lauth L, Virak C**, 1999. La lithiase urinaire à l'opital de Battambang .*J Urol* 1999.
- 64) **Strtic D, Markovic M, Komunjer LJ, Furedimilkof H**, 1984. Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. I. Kinetics of spontaneous precipitation of calcium oxalate trihydrate. *J crystal Growth*, 66 :413-442.
- 65) **Jungers P, Daudon M, Hennequin C, Lecour B**, 1993. Corrélations entre apports protéidique et sodé et calciurie chez les lithiasiques calciques. *Néphrologie*, 14 :287-290.
- 66) **Singleton VL, Ross JA**, 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Am J Enol Viticulture* 16 :144-158 (dosage des composés phénolique)
- 67) **Niare A**, 2006. Etude de la phytochimie et des activités pharmacologiques de *Syzygium willd* (Myrtaceae). Thèse de doctorat en phytochimie
<http://www.keneya.net/fmpos/pharma/pdf/06P24.pdf>
- 68) **Boudhane, E, Bouchefifa, F., Desdous, N., & Boutennoun, H. E.** 2019. Screening phytochimique et activité antioxydante de quelques plantes médicinales (Doctoral dissertation, université de Jijel).
- 69) **Skrtic D, Markovic M, Komunjer LJ, Furedimilkof H**. 1984. Precipitation of calcium oxalates from high ionic strength solutions. I. Kinetics of spontaneous precipitation of calcium oxalate trihydrate. *J crystal Growth*, 66:413-442.
- 70) **Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Vidal, N., Lesgards, J.F, & Stocker,** 2007. Screening of some Algerian medicinal plants for the phenolic compounds and their antioxidant activity. *European food research and technology*, 224(6), 801-809.
- 71) **Elhaoud, H., Boufellous, M et al**, 2018. Phytochemical screening of a medicinal plant: mentha spicata L, *American journal of innovative research and applied sciences*, 7(4), 226-233p.
- 72) **Bekro, Y.A, Mamyrbekova, J.A, B.B, Bi, T.T, & Ehile, E.E.** (2007). Etude Ethnobotanique ET screening phytochimiques de *Caesalpinia benthamiana* (Baill) Herendet Zurucchi (caesalpinaceae). *Sciences & Nature*, 4(2), 217-225.
- 73) **G.B.T.F.e.a. Bahorun T**, 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittel forschung*, vol.46.
- 74) **R. Julkunen-Titto**, 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol.33, p.213.
- 75) **Brunton, Jean**, 1999. pharmacologie 2^{ème} et 3^{ème} édition TEC.DOC 783-788P

- 76) **Chenni.M**, 2010. Contribution à l'étude chimique et biologique de la racine d'une plante médicinale, thèse du magister, université d'Oran senia, 66-67p
- 77) **Cotelle.N, Bernier.J, L.Pommery et al**, 1990. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine* 20 :35-30.
- 78) **Ben Saadi H, Guemmouda, S**, 2017. Etude de l'activité antioxydante, et antibactérienne d'extrait de *Suaeda fruticosa* mémoire académique.
- 79) **Barefoot ET kaenhammer**, 1983. Determination and activity of lactin B, bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 45(6) :1808-181.
- 80) **Doumandij.A, Hellal.A, Saidi.N**, 2010. Purification de la bactériocine à partir de *Lactobacillus acidophilus* 11. *Rev Microbiol ind. San et Environn*, 4(2) 25-47.
- 81) **Guenancha.SS, Tababoucha. Z, Haddouche.R**, 2016. Contribution à l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait méthanolique de la plante médicinale *Ecballium Elaterium* mémoire de master en biotechnologie et protection des végétaux BBA Univ Mohamed El Bacgie El ibrahimi, p18.
- 82) **Broadsky, T.F, Lwis, C, Eble, T.E**, 1976. Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I clindamycin in the rat. *J. Chromatogr*, 123 :33-44
- 83) **Ouaar, D, Meghrbi, Benali, A et al**, 2018, activité antibactérienne de l'huile essentielle extraite de la sciure de bois de *Juniperus oxycedrus subcedrus*, actes des 77^e journées scientifiques du GDR, campus ARTS et matières de Chuny,
- 84) **Deroiche K, Zellagui A, Gherraf N, Boustela A, et al**, 2013. Chemical composition antimicrobienne et activité antioxydante de l'huile essentielle de fleurs de *Santolina africana*, vol, n°3, p 201-26.