



/République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université Larbi Tébessi-Tébessa  
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Sciences de la matière

MEMOIRE DE MASTER  
Domaine : Sciences de la matière  
Filière : chimie  
Option : Chimie des produits naturels

Thème:

**Etude des propriétés chimiques, électrochimiques et  
bioactives des fractions retenues de la plante  
*Résida alba L.***

Présenté par:

Khelif Chams Douha

Chegrouche Sorour

Devant le jury:

Lifa Said

MAA

ULT-Tébessa

Président

Kalla Ali

MCA

ULT-Tébessa

Rapporteur

Tebboub Omar

MAA

ULT-Tébessa

Examineur

Date de soutenance : 23/09/2020

Note:

Mention :

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

## **Résumé :**

Ce modeste travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de l'espèce endémique *Résida alba* L. appartenant à la famille des résédaceae. Le traitement phytochimique a conduit à un fractionnement significatif.

La mise en place des techniques chromatographiques de séparation et de purification et des techniques physicochimiques (UV) et par comparaison avec les données de la littérature, a révélé la présence de certains corps actifs appartenant particulièrement aux coumarines et aux flavonoïdes.

Les tests antimicrobiens vis-à-vis à 5 bactéries et 2 champignons pathogènes ont dévoilé une action antimicrobienne des extraits de *Résida alba* L, particulièrement l'extrait brut, extrait de DCM, extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de n-BuOH sur les deux champignons et les espèces bactériennes testées remarquable avec des diamètres de zone d'inhibition différents ce qui indique leurs sensibilités à ces quatre extraits, sauf que l'extrait brut et l'extrait de DCM n'ont pas des effets visibles sur la bactérie *Bacillus* à cause de sa résistance.

**Mots clés :** *Résida alba* L, résédaceae, méthode chromatographiques, tests biologiques .....

## ملخص:

هذا العمل المتواضع عبارة عن دراسة فيتوكيميائية و بيولوجية للنبتة المعروفة علميا باسم *Résida alba* L. و شعبيا باسم بعضوص الخروف أو الذنبان و التي تنتمي إلى عائلة الذنبيات. أدت التجزئة باستعمال المعالجة الكيميائية النباتية لهذا النوع إلى تجزئة ذات أهمية كبيرة للدراسة.

أظهرت الدراسة العملية باستعمال تقنيات الفصل الكروماتوغرافي و كذا التحليل الفيزيوكيميائي للأشعة فوق البنفسجية و بالمقارنة مع البيانات الواردة في المراجع العلمية وجود بعض المواد الفعالة و التي تنتمي بشكل خاص إلى عائلة المستقلبات المعروفة بالكومارينات و الفلافونويدات.

كشفت الاختبارات المضادة للميكروبات باستعمال 5 أنواع من البكتريا و نوعين من الفطريات ممرضة عن تأثير هام لمستخلصات *Resida alba* L اتجاه هذه البكتريا و هذه الفطريات، وخاصة المستخلص الخام، مستخلص DCM ، مستخلص أسيتات الإيثيل ومستخلص n-BuOH . الاختبارات التي أجريت على كل من الفطريات وأنواع البكتيرية بينت تواجد اختلاف ملحوظ في أقطار منطقة التثبيط مما يشير إلى حساسية هذه الفطريات و البكتريا لهذه المستخلصات الأربعة ، مع الإشارة إلى أن المستخلص الخام ومستخلص DCM لهما تأثير مرئي أقل على بكتيريا *Bacillus* بسبب مقاومتها.

**الكلمات الدالة:** *Résida alba* L، الذنبيات، الطرق الكروماتوغرافية، التحليل البيولوجي .....

**Abstract:**

This work is concerned with the phytochemical and biological study of endemic species *Réseda alba* L, wich belongs to the Résédacéae family. The phytochemical treatment led to a significant pardition.

The implementation of chromatographic separation techniques, the UV physiochemical analysis, in addition to data provided in the literature review, showed the presence of some active substances that belong to coumarins and flavonoids.

Antibacterian tests, in relation to 5 types of bacteria plus 2 pathogenic fungi, have revealed an antimicrobial effet of the *Réseda alba* L extracts, specifically crude extract, DCMextract, ethyl acetate extract, and n-BuOH extract, on the tested bacteria and fungi with different diameters of inhibition zone which mark their sensibility. To the four extracts except the crude extract and the DCM one, that had no visible effect on the Bacillus bacteria because of its resistance.

**Key words:** *Réseda alba* L, resedaceae, chromatographic method, biological tests...





# Remerciements

*Avant tout*

*Nous remercions DIEU pour toute l'aide dans notre carrière universitaire et pour nous avoir donné La volonté, la patience et le courage de réaliser ce travail.*

*Nous remercions nos chers parents, qu'ils sont la raison de l'existence, et qu'ils sont la meilleure chose dans la vie.*

*Et nos vifs remerciements les plus reconnaissants à notre encadreur Dr. KALLA ALI pour ses orientations, ses conseils avisés, sa générosité, à ses reconnaissances et ses aides pour réaliser ce travail.*

*Au Dr. BELHEDJ MABROKA et au doctorant NACER MOHAMED pour toutes leurs aides dans le chemin de notre travail.*

*A tous Les membres du jury : Mr .S. Lifa et Mr.A.Tebboub qui ont accepté d'évaluer notre travail; nous les remercions aussi pour le temps qu'ils nous ont consacré.*

*Enfin à toutes personnes ayant attribuées de réaliser ce  
travail de près ou de loin*

*À tous et à toute...*

*On vous dit merci !*





## *Dédicace*

*Je dédie ce travail :*

*A la personne qui est la plus chère à mon cœur*

*A ma mère ZAHIA , j'aurais bien aimé que vous soyez parmi nous pour qu'ensemble nous partageons ce bonheur puisse Allah vous réserve sa clémence à sa bien large miséricorde et vous accueillir en son vaste paradi auprès des prophètes, j'espère que tu seras fier de moi, je suis là grace a toi, je vous dis merci d'être la plus belle mère pour moi, je ne t'oublierai jamais.*

*A mon père DJAMEL : Que dieu vous préserve et vous procure la santé et la longue vie et à sa femme lwiza .*

*A mes frères : SALAH, HAMZA, MONDHER et*

*mon chère QOUSSAYE, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'amour et l'affection que je porte pour vous, que dieu vous donnent de la santé, du bonheur.*

*A ma chère famille : ALI, AICHA, FATIHA , KARIMA, SONIA, HADJERA, HOUDA , RODWANE , MOHAMED,*

*BARAA, SARA, SAMIA, LYEMNA, ZAINEB,  
HDJER, MARWA, ASMA... que je j' aime trop.*

*A toutes les personnes de ma belle famille : ma belle mère  
ZINEB, beau père SAID, mes belles sœurs et mon beau frère.*

*Surtout l'homme de ma vie HAMZA présent par son soutien  
moral et ses belles surprises sucrées, que dieu vous protège pour  
moi, je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de  
réussite et de courage.*

*A ma moitié IMENE, tu est la sœur pour moi je te souhaite  
toutes les belles choses dans ta vie.*

*A ma chère SOROUR, que dieu vous donne la réussite dans ta  
vie.*

*A mon encadreur Mr. A. KALLA, je vous dis merci de votre  
confiance en nous et de vos efforts pour accomplir ce travail, vous  
êtes un professeur très respecté.*

*A mes chéries : YOUSRA, JOUJOU, MARIA.*

*A toutes les personnes de ma famille KHELIF.*

*A toutes mes amies et ceux qui m'aiment et ceux qui j'aime .*

**CHAMS DOUHA**





# Dédicace

*Au nom d'Allah, Le Clément, Le Miséricordieux Prière et bénédictions d'Allah sur le prophète Mohamed, Paix et Salut sur lui, ainsi que ses compagnons, pour nous avoir apporté une religion comme l'Islam.*

*Une chance m'a été offerte aujourd'hui pour parler des personnes qui me sont très chers. C'est avec un grand honneur que je dédie ce modeste travail aux deux personnes qui se sont sacrifiées pour que je grandisse avec un savoir-faire et qui m'ont appris à ne jamais baisser les bras....*

*A mes chers parents l'âme de ma vie mon père Laalagui et ma mère Leila qui sont mon paradis, de votre affection et de tous les efforts que vous avez déployés durant toute ma vie, j'espère que ce travail soit l'expression de ma pleine gratitude et de mon profond respect.*

*Je dédie ce travail également:*

*A mes chers frères : Mohamed, Taki, Louai; mes bras*

*A mes chères sœurs; mes yeux: Nora, Ferial, Peggy en Allemagne*

*Au mari de ma sœur : Boujema . A mes poussins : Ayhouma, Baraa, Cheyenne et Caity*

*A ma belle cousine Chorouk*

*A ma chère Chams que dieu vous garde ainsi que ta famille*

*A toutes mes intimes : NOUR, FATMA, HANANE, HAJER,  
AMANI, ABIR, IKRAM.*

*A tous mes oncles et mes tantes , A toutes les familles  
CHEGROUCHE et DOUAIFFIA*

*J'exprime un profond respect à mon encadreur Monsieur KALLA  
ALI pour l'honneur qu'il nous a fait de nous encadrer et pour ses  
qualités humaines, aussi un profond respect à mon professeur  
GOUASMIA d'avoir resté à mes côtés en master 1 je n'oublierai  
jamais ce que vous avez fait.*

*A tous ceux qui me sont chers.*

*Que dieu les protège tous.*

**SOROUR**

## Table de matières

Titre	Page
Résumé	
ملخص	
Abstract	
Remerciement	I
Dédicace	III
Liste des figures	XIV
Liste des tableaux	XVII
Liste des abréviations	XVIII
Introduction générale	01
Liste des références	02
<b>Chapitre I : Généralité sur les plantes médicinales</b>	
I-Généralités sur les plantes médicinales	04
I.a- La médecine traditionnelle (MT)	04
I.b- La phytothérapie	04
I.2- Histoire des plantes médicinales	05
I.3- Action des plantes médicinales	07
I.3.1- Conservation des plantes	07
I.3.2- Composition générale des plantes	07
I.3.2.1- Molécules issues du métabolisme primaire	07
I.3.2.1. a- Lipides	08

I.3.2.1. b- Les lipides vrais	08
I.3.2.1. c- Les acides gras	08
-Les acides gras saturés	08
- Les acides gras insaturés	08
- Les acides gras atypiques	08
-Lipides simples	08
I.3.2.1. d- Les peptides	08
I.3.2.1. e- Les glucides	09
I.3.2.1. f- Les acides aminés et organiques	09
I.3.2.2- Molécules issues du métabolisme secondaire	09
I.3.2.2.1- Les composés phénoliques :	09
• Les acides phénols	10
• Les phénols simples :	10
a- Les flavonoïdes	10
b- Les tanins	11
b.1-Tanins hydrolysables :	11
a- Les gallitannins ou tanins galliques ou aussi gallo-tanins	11
b- Les ellagitannins ou tanins ellagiques ou ellagi-tanins	12
c-Des tannins particuliers, ou phlorotannins	12
b.2-Tanins condensés :	12
a- Les coumarines	13
b- Les lignanes	13
c- Les quinones	14

d- Les alcaloïdes	14
I.3.2.2.2- Les huiles essentielles	14
I.3.2.2.3- Les huiles grasses	15
I.3.2.2.4- Les hétérosides	15
I.3.2.2.5- Les saponines	15
I.3.2.2.6- Les glucosinolates	16
I.3.2.2.7- Les hétérosides cyanogéniques	16
I.3.2.2.8- Les hétérosides cardiotoniques	17
I.4-Generalité sur la famille des résédacées	19
I.4.1-Description de la famille :	19
I.4.1.1- Distribution	19
Appareil végétatif	19
I.4.1.2- Reproduction	19
I.4.1.1. 3- Intérêts	20
I.4.1.1.4- Quelques membres de la famille	20
I.5- Généralités sur la plante	21
I.5.1- Description :(flore de l'Abbé Coste)	21
I.5.1.2- Systématique	21
<b>Chapitre II : Méthodes de séparation et d'analyse</b>	
II-Méthodes de séparation et d'analyse	22
II.1- Définition	22
II.2- Les méthodes d'extraction :	22
II.2.1- Extraction solide / liquide	22

II.2.1.1- Décoction	22
II.2.1.2- Infusion	22
II.2.1.3- Macération	23
II.2.2- L'extraction par solvant	23
II.2.3- Distillation ou Entraînement à la Vapeur	23
II.2.4- Hydrodistillation	24
II.2.5- Extraction par Soxhlet	25
II.3- Les méthodes d'analyses	25
II.3.1- Analyses chimiques	25
II.3.1.1- analyse par méthodes chromatographiques	25
a- - La chromatographie sur couche mince	26
b- La chromatographie sur colonne :(CC)	26
II.3.1.2- Analyse par spectroscopie ultraviolet (UV)	26
II.3.1.3- Analyses biologiques	28
a- Etude d'activité antibactérienne	28
b- Etude d'activité antifongique	28
Liste des références bibliographiques	29
<b>Chapitre III : Matériel et méthodes</b>	
III. 1. Étude chimique de <i>Réséda alba</i> L.	33
III. 1. 1- Classification de la plante	33
III. 1. 2- Description botanique	33
III. 1. 3- utilisation en médecine traditionnelle	34
III. 1. 4- Répartition Géographique	34



III. 1. 5- Choix du matériel végétal	34
III. 1. 6- Récolte du matériel végétal	34
III. 1. 6. 1- Entreposage	35
III. 1. 6. 2- Plan de travail expérimental	35
III. 1.7- Extraction	36
III. 1.7.1- Lavage et fractionnement de l'extrait brut	37
III. 1.7.2 - Séparation par chromatographie sur colonne	38
III. 1.7.3 - Tentative de séparation par lavage	39
III. 1.7.4 - Application de la méthode sur l'extrait brut	40
III. 1.7.5- Le choix de la phase mobile	41
III. 1.7.6- Préparation de l'échantillon à analyser	43
a- préparation de plaque CCM	43
b- préparation de la cuve chromatographique	44
III. 1.7.7- Etude des fractions retenues de l'extrait brut 'méthanolique'	45
III.2- Dosage des polyphénols	46
III.2.1-Principe	46
III.2.2-Procédure expérimentale	46
III.3- Activité biologique :	47
III.3.1-Introduction	47
III.3.2 - Matériel du laboratoire	48
III.3.2-Réactifs chimiques et solvants	48
III.3.4 - Souches bactériennes testées	48
III.3.5 - Caractéristiques des souches utilisées	49

III.3.6 - Définitions des bactéries et les champignons utilisés	49
III.3.6.1- <i>Escherichia coli</i>	49
III.3.6.2- <i>Staphylococcus aureus</i>	50
III.3.6.3- <i>Salmonella</i>	51
III.3.6.4- <i>Bacillus</i>	52
III.3.6.5- <i>Micrococcus luteus (Microlute)</i>	53
III.3.6.6- <i>Candida albicans</i>	53
III.3.7 -Activité antimicrobienne	54
III.3.7.1-Introduction	54
III.3.7.2- Les extraits utilisés pour les tests des bactéries	54
III.3.7.3- Préparation des extraits	54
III.3.7.4- Les micro-organismes	55
III.3.8 -Activité antibactérienne	55
III.3.8.1-Préparation du milieu de culture	55
III.3.8.2-Stérilisation du matériel	56
III.3.8.3-Préparation des dilutions des extraits de <i>Résida alba</i> L.	57
III.3.8.4-Préparation de l'inoculum	57
III.3.8.5-Les suspensions des souches bactériennes testées	58
III.3.8.6- Ensemencement et dépôt des disques	58
III.3.8.7-Lecture des antibiogrammes	59
III.3.9 -Activité antifongique	60
Liste des références bibliographique	61
<b>Chapitre IV : Résultats et discussion</b>	

IV.1-Partie chimique	63
IV.1.1-Rendement des extractions	63
IV.1.2- Choix des éluants	64
IV.1.3 – séparation par CCM	64
IV.1.3.1 – Discussion des résultats obtenus pour l'extrait brut "méthanolique"	64
IV.2-Taux des polyphénols totaux	67
IV.3- Activité antimicrobienne	68
IV.3.1-Discussion d'activité antibactérienne	72
IV.3.2-Discussion d'activité antifongique	72
Conclusion générale	75

## Liste des figures

Numéro	Titre	Page
<b>Figure 01</b>	La formation des acides aminés	9
<b>Figure 02</b>	Structures des acides phénols	10
<b>Figure 03</b>	Structures des phénols simples	10
<b>Figure 04</b>	Structures des flavonoïdes	11
<b>Figure 05</b>	Structures des tanins galliques	11
<b>Figure 06</b>	Structures des tanins ellagiques	12
<b>Figure 07</b>	Structure de phlorotannins	12
<b>Figure 08</b>	Structure d'un tanin condensé	13
<b>Figure 09</b>	Structure de la coumarine	13
<b>Figure 10</b>	Structures de quelques alcaloïdes	14
<b>Figure 11</b>	Structure d'hétérosides cardiotonique	16
<b>Figure 12</b>	Répartition géographique des espèces de la famille Résédaceae	19
<b>Figure 13</b>	Quelques espèces de la famille Résédaceae	20
<b>Figure 14</b>	Schéma d'extraction par solvant	23
<b>Figure 15</b>	Schéma d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau	24
<b>Figure 16</b>	Schéma d'extraction par hydrodistillation	24
<b>Figure 17</b>	Schéma d'extraction par soxhlet	25
<b>Figure 18</b>	Spectrophotomètre	27
<b>Figure 19</b>	L'espèce Réséda alba L	34

<b>Figure 20</b>	Extrait brut (0)	37
<b>Figure 21</b>	Extrait de DCM (1)	38
<b>Figure 22</b>	Extrait d'acétate d'éthyle (2)	38
<b>Figure 23</b>	Extrait de n -Bu OH (3)	38
<b>Figure 24</b>	Montage d'une colonne chromatographique	39
<b>Figure 25</b>	Dissolution de l'extrait brut dans un solvant par agitation	40
<b>Figure 26</b>	Les fractions finales retenues	41
<b>Figure 27</b>	Quelques images des éluants essayés au cours du travail	42
<b>Figure 28</b>	Préparation de plaque CCM	44
<b>Figure 29</b>	Préparation de la cuve chromatographique	44
<b>Figure 30</b>	Séparation des fractions retenues de l'extrait brut	45
<b>Figure 31</b>	Séparation en utilisant le mélange hexane- DCM (5-2.5)	45
<b>Figure 32</b>	Séparation en utilisant le mélange hexane- acétate d'éthyle (4-6)	46
<b>Figure 33</b>	Réactif de Follin	47
<b>Figure 34</b>	Préparation des échantillons	47
<b>Figure 35</b>	Les solutions finales	47
<b>Figure 36</b>	<i>Escherichia coli</i> observée au microscope électrique(Gx1000)	50
<b>Figure 37</b>	<i>Escherichia coli</i> utilisée pour notre travail	50
<b>Figure 38</b>	Aspect morphologique de la souche de <i>Staphylococcus aureus</i> observée au microscope électrique	51
<b>Figure 39</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> utilisée pour notre travail	51
<b>Figure 40</b>	Observation au microscope électronique de <i>Salmonella typhi</i> et <i>Salmonella infantis</i> (Gx1000)).	51

<b>Figure 41</b>	<i>Salmonella typhimurium</i> utilisée pour notre travail	52
<b>Figure 42</b>	<i>Bacillus subtilis</i> utilisée pour notre travail	52
<b>Figure 43</b>	<i>Micrococcus luteus</i> utilisée pour notre travail	53
<b>Figure 44</b>	<i>Candida albicans</i> utilisée pour notre travail	54
<b>Figure 45</b>	Préparation du milieu de culture	56
<b>Figure 46</b>	Extraits à concentration (10 mg/ml)	57
<b>Figure 47</b>	Extraits à concentration (2 mg/ml)	57
<b>Figure 48</b>	Préparation de l'inoculum	58
<b>Figure 49</b>	Les suspensions des souches bactériennes testées	58
<b>Figure 50</b>	Ensemencement et dépôt des disques	59
<b>Figure 51</b>	Ecoulement du Sabouraud	60
<b>Figure 52</b>	Séparation des fractions retenues de l'extrait brut	65
<b>Figure 53</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux	67
<b>Figure 54</b>	Teneurs des extraits de <i>Résida alba</i> L. (en µg EAG/mg) en composées phénoliques	68
<b>Figure 55</b>	Effets inhibiteur des extraits sur les bactéries	69
<b>Figure 56</b>	Effet inhibiteur des extraits concentrés et dilués sur les champignons	70

## Liste des schémas

Numéro	Titre	Page
Schéma 01	Plan du travail expérimental	35
Schéma 02	Plan d'extraction	36

## Liste des tableaux

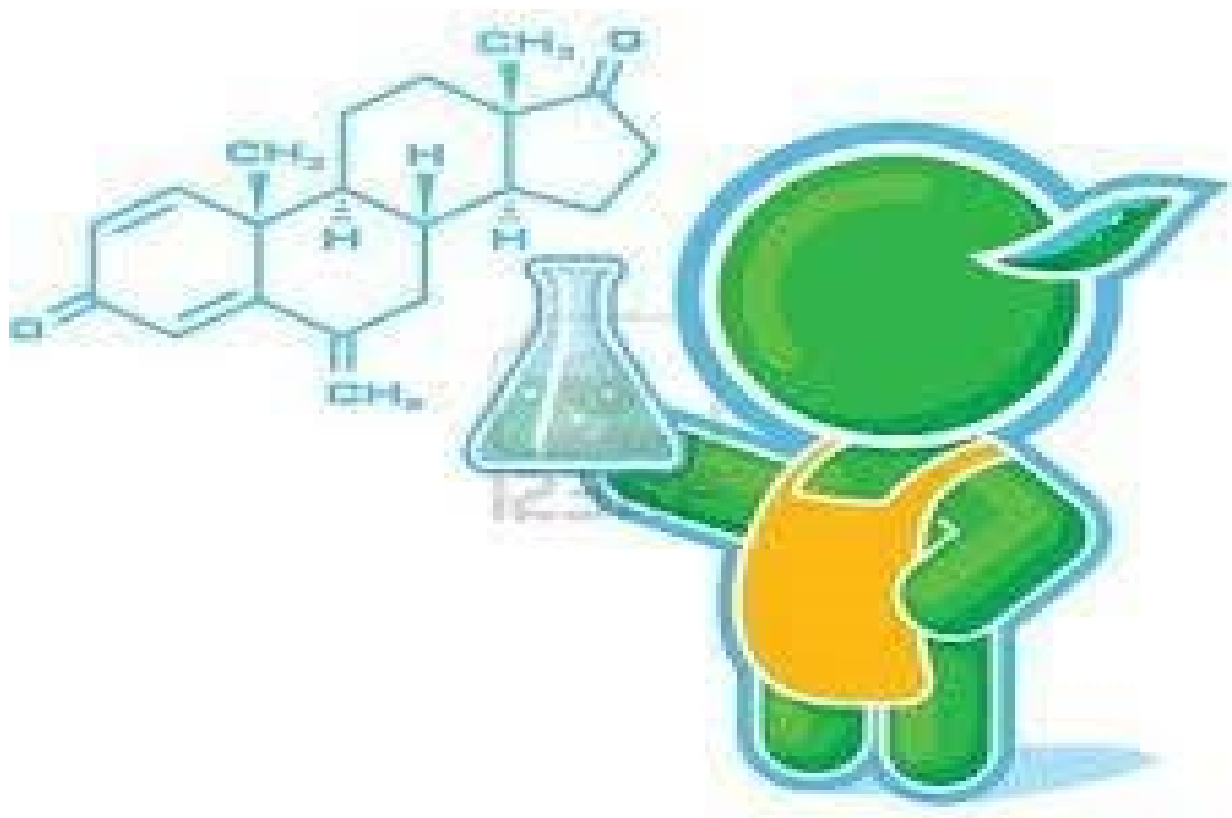
Numéro	Titre	Page
Tableau 01	Classification de la plante	33
Tableau 02	Fractions retenus et leurs codes	41
Tableau 03	Quelques éluants essayés au cours du travail	43
Tableau 04	Le matériel utilisé au cours des expériences	48
Tableau 05	Produits chimiques utilisés au cours des expériences	48
Tableau 06	Les souches microbiennes testées	49
Tableau 07	Les extraits utilisés avec leurs codes	54
Tableau 08	Rendement d'extractions des extraits de la plante <i>Résida alba</i> L.	63
Tableau 09	Résultat de la fraction 4 de la plaque d	66
Tableau 10	Résultats d'activité antibactérienne	71
Tableau 11	Résultats d'activité antifongique	71

## Liste des abréviations

- **OMS** : Organisation Mondiale de la santé
- **PM** : Plante Médicinale
- **MT** : Médecine traditionnelle
- **PMA** : Plante Médicinale aromatique
- **HHDP** : Acide hexahydroxy diphénique
- **GLC** : Glucosinolate
- **GLU** : Glucose
- **R** : Radicale
- **HCN** : Hydrocyanure
- **R.odorata** : Résida odorata
- **R.luteola** : Résida luteola
- **HE** : Huile Essentielle
- **HD** : Hydroditillation
- **CCM** : Chromatographie sur couche mince
- **CC** : Chromatographie sue colonne
- **UV** : Ultraviolet
- **DCM** : dichlorométhane
- **n-BuOH** : n-butanol
- **H<sub>3</sub>PW<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : acide phosphotungstique
- **H<sub>3</sub>PMo<sub>12</sub>O<sub>40</sub>** : acide phosphomolybdique
- **W<sub>8</sub>O<sub>23</sub>** : Oxyde bleu de tungstène
- **Mo<sub>8</sub>O<sub>23</sub>** : Molybdène
- **N** : Normalité
- **p/v** : Poids/volume
- **EAG** : Equivalents milligramme d'acide gallique
- **MH** : Muller Hinton
- **Sab** : Sabouraud
- **CMI** : Concentrations minimales inhibitrices
- **CMB** : Concentrations minimales bactéricides
- **DO** : Densité optique
- **Dsm** : diagnostic and statistical manual



- **ATCC :** American type culture collection
- **ZI :** Zone d'inhibition
- **typhi :** typhimorium



# Introduction générale

## **Introduction générale**

Au cours des dernières années, plusieurs raisons ont mené au rétablissement de l'usage des plantes médicinales. Elles sont d'abord d'un coût inférieur aux médicaments de synthèse, puis elles arrivent à un moment où le public est désillusionné devant la médecine moderne, laquelle en effet n'aput trouver remède à tous les maux, en plus de se buter à une résistance accrue des pathogènes et à une défense d'effets secondaires liés à l'usage des médicaments traditionnels. Enfin, la valeur médicinale des plantes est de plus en plus démontrée scientifiquement, ce qui constitue un argument de taille pour leur utilisation en médecine. Ainsi, l'industrie des plantes médicinales est devenue, en peu de temps, le secteur de l'industrie pharmaceutique connaissant la plus forte croissance annuelle avec 15 à 20 %. [1]

Chaque plante médicinale est composée de milliers de substances naturelles actives, présentées en quantité variable. Ces principes actifs isolés ne sont pas d'une grande efficacité, mais lorsqu'ils sont prélevés avec d'autres substances de la plante, ils révèlent leur aspect pharmacologique. [2]

Ce travail, réalisé dans le cadre des travaux du laboratoire des molécules bioactives et leurs applications, a pour objectif l'étude chimique et biologique sur les extraits d'une plante médicinale collectée de la région de Tébessa : *Résida alba* L.

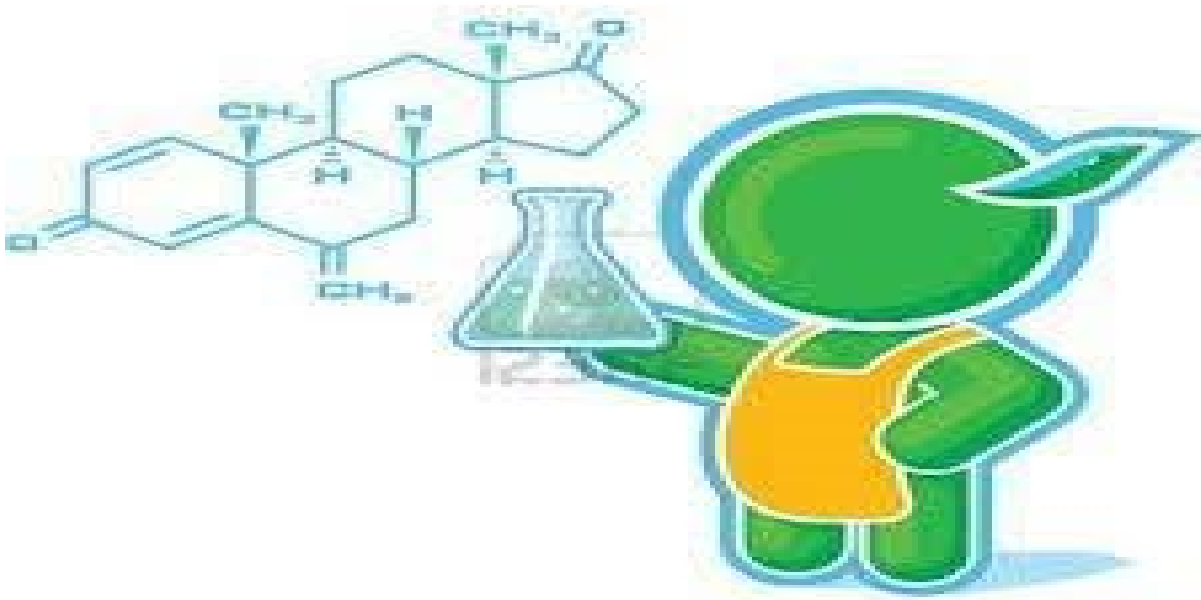
- Notre travail est donc réparti en quatre chapitres, initié par une recherche bibliographique visant des généralités sur les plantes médicinales, la famille des plantes *Résédaceae* et la plante *Résida alba* L. sujet de notre travail
- Dans le deuxième chapitre, nous avons défini les méthodes de séparation et les méthodes d'analyse (chimiques et biologique) en se basant sur celles utilisées comme support de notre travail.
- Dans le troisième chapitre, nous avons décrit les protocoles expérimentaux préconisés pour évaluer l'extraction, la chromatographie (CC et CCM), le dosage des polyphénols et les pouvoirs antimicrobien et antifongique des extraits obtenus de notre plante *Résida alba* L.
- Enfin le quatrième chapitre est sacré aux résultats obtenus ainsi que leurs discussions.
- On a terminé la rédaction de ce manuscrit par une conclusion résumant les résultats de l'étude effectuée et une perspective visant les buts non atteint

causés par l'arrêt des travaux du laboratoire vu la pandémie qui a touché le monde entier.

**Liste des références bibliographiques :**

[1] S. Hahn et al, (1992), Studies on the reproductive biology of white yam (*Dioscorea rotundata*), *Euphytica*, vol 64 (3), p 197.

[2] C. Christine et al, (2012), La plante médicinale; notion de totum; implication en phytothérapie clinique intégrative. Ph, Société internationale de médecine endobiogénique et de physiologie intégrative.



# Chapitre I : Généralités sur les plantes médicinales

## **I- Généralités sur les plantes médicinales**

Depuis des siècles, l'homme utilisait les plantes (drogues) trouvées dans la nature pour traiter des maladies, L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement une région d'intérêt auprès du public.

Les plantes médicinales (PM) sont des plantes utilisées en médecine traditionnelle dont au moins possèdent des propriétés médicamenteuse. Ces plantes médicinales renferment de nombreux principes actifs où certains sont issus du métabolisme secondaire.

Plus de 80 % des populations africaines ont recours à la médecine et à la pharmacopée traditionnelle pour faire face aux problèmes de santé, le continent africain regroupe des plantes médicinales très diversifiées. En effet sur les 300.000 espèces végétales recensées sur la planète, plus de 200.000 espèces vivent dans les pays tropicaux d'Afrique et ont des vertus médicinales. Les plantes médicinales demeurent encore une source de soins médicaux dans les pays en voie de développement en l'absence d'un système médicamente moderne. [1]

### **I. a- La médecine traditionnelle (MT) :**

Selon l'OMS la MT est l'ensemble de toutes les connaissances et de toutes les pratiques , explicables ou non, transmises de génération en génération oralement ou par écrit utilisées dans une société humaine pour diagnostiquer , prévenir ou éliminer un déséquilibre du bien-être physique , mental , social , moral et spirituel.

### **I. b- La phytothérapie :**

Le terme phytothérapie provient du grec, il est composé de deux mots : "phyto" signifiant plante et "thérapie" signifiant traitement. L'association des deux mots signifie donc traitement par les plantes. [2]

La phytothérapie est la science qui étudie les plantes médicinales, c'est-à-dire c'est l'ensemble de phytochimie, phytopharmacie et phytopharmacologie.

## **I.2- Histoire des plantes médicinales**

Selon l'histoire des peuples, les plantes médicinales et aromatiques (P.M.A.) ont toujours occupées une place importante dans l'alimentation, en médecine et pour la composition des parfums. D'après l'historique des plantes médicinales et aromatique, la Chine fut le berceau de la phytothérapie. L'empereur Chen-Nong (2800 avant Jésus Christ) consigne sa connaissance des plante médicinales dans un livre, le Pen Ts'ao qui regroupe plus de cent plantes. Ce livre fera autorité jusqu'au 16<sup>ème</sup> siècle ou il est revu et corrigé par un médecin et pharmacologue Li Che Tehen qui recense alors 1000 plantes médicinales.

En Inde, L'Ayurveda, le livre sacré écrit par Bahamas révèle les secrets de la langue vie grâce aux plantes aromatiques aux usages thérapeutique et culinaire. Trente siècles avant notre, (célèbre médecin connaissait déjà l'Arte de l'anesthésie à l'aide du chanfreinaient ainsi que l'usage des plantes aromatiques pour la santé et la diététique. [3]

Au Moyen-Orient, 4000 ans avant Jésus Christ, les Sumériens usaient des plantes médicinales et aromatiques. Les Arabes conservèrent pendant des millénaires le monopole du commerce des épices et contribuèrent largement au progrès des techniques d'extraction des huiles et parfums.

En Egypte, vers 2700 avant jésus Christ, les plantes aromatiques étaient vendues à prix d'or. Les Egyptiens fabriquaient des produits aromatiques comme huiles, eaux parfumées, produit de beauté, mais aussi des préparations destinées à l'embaumement des momies. Les rempiles recelaient de véritables laboratoires de parfums et de nombreuses recettes sont parvenues jusqu'à nous sous forme de hiéroglyphes. Mais beaucoup d'entre elles reste énigmatiques jusqu'à ce jour et font l'objet beaucoup de sujets de recherches.

Pour les Hébreux qui héritèrent des connaissances des Egyptiens, les substances Aromatiques figuraient parmi les offrandes qu'apportèrent Les rois mages à l'enfant jésus. Les huiles étaient réservées aux prêtres et au service Divin.

En Grèce, XII avant jésus Christ les marchands phéniciens ramenaient de leurs voyages des épices, des encens. On retrouve des noms de la mythologie grecque que sur certaines plantes comme l'achillée meilleure feuille, la centaurée la pivoine

(Paeonia). Les plantes aromatiques servent à la médecine psychosomatique, à la magie, Hippocrate de Cos (460-377 avant Jésus Christ) écrit l'œuvre *Corpus Hippocraticum* en 72 livres. Ils traitent entre autre de la maladie sortant de sons aura magique et avec des indications naturelles d'auto guérison. il conseille l'usage des plantes aromatiques.

Les Romains consommaient beaucoup d'épices et de plantes aromatiques, des ouvrages comme *Histoire Naturelle universelle* (Pline L'Ancien à et *DE Materiamedica* où sont recensées 519 espèces de plantes (Dioscoride médecin 1er siècle après Jésus Christ), cet ouvrage fait autorité pendant plus de 1000 ans. Les romains usaient quotidiennement de bains aromatiques, lotions, onguents, crèmes parfumées.

Un progrès décisif dans l'histoire de la pharmacie est apporté un siècle plus tard par Galien (médecin des empereurs). La galénique (mode de préparation des médicaments) est instaurée par lui. A cette époque, les plantes étaient de toutes fêtes et aucun plat n'était servi sans accompagnement d'épices et condiments

Les Gaulois avait un bon herbier, le gui plante rituelle utilisées par les druides côtoyait dans la vie quotidienne les simples aromatique locaux (ail, armoise, fenouil, laurier, menthe, thym ...) et d'autre apportée par les conquérants romain.

En Amérique, les Aztèques, les Mayas, les Incas et les habitants de la forêt tropicale avaient une parfaite connaissance des plantes médicinales et aussi des drogues et plantes toxiques.

En Afrique la médecine traditionnelle utilise depuis des millénaires les plantes médicinales. Plusieurs milliers des produits ont été recensés.

Au moyen âge, après la chute de l'empire romain, l'Europe connaît un retour à la barbarie, un déclin général du savoir et une longue période d'obscurantisme. Il faudra attendre l'apport des Arabes pour assiste à une véritable renaissance. [4]

Vers le 12<sup>ème</sup> siècle, les croisades relancent les échanges entre l'Europe et le Moyen-Orient et contribue à la renaissance Italienne, le commerce des épices renaît. Concernant les arabes et les musulmans en particulier ; ils ont développés la médecine d'une façon très surprenante. Rappelons : DJABER IBN HAYAN et ERRAZI puis



IBN SINA (980, 1037) qui avait décrit plusieurs traités à ce sujet, le plus célèbre était «KANOUN EL TIB (la loi de la médecine) ». [5]

### **I.3- Action des plantes médicinales**

Dans les cas extrêmes, l'action de la médecine moderne soulage les partis de manière indéniable et sauve de nombreuses vies. Un article apparu dans la presse en 1993, décrivant la situation catastrophique dans laquelle se trouvaient un hôpital de Sarajevo, la capitale bosniaque assiégée, signalait que les médecins, totalement dépourvus de médicaments, étaient contraints d'utiliser une plante très répandue en Europe, la valériane (*Valeriana officinalis*), comme analgésique et anesthésiant pour soigner les blessés. [6]

#### **I.3.1- Conservation des plantes**

Pour conserver les plantes, on les sèche, selon les cas, au soleil, au feu, à l'étuve, au séchoir ou dans un grenier aéré. L'autour préconise avant de sécher les plantes de les débarrasser des substances étrangère et des portions mortes ou altérées. [7]

Pour les tiges et les feuilles épaisses, elles seront séchées plus rapidement, étendues sur des claies et exposées dans une serre à 30-35 °C.

#### **I.3.2- Composition générale des plantes**

Les plantes médicinales sont composées de deux types de métabolisme, l'un c'est le métabolite primaire qui fournit les molécules de base et l'autre c'est le métabolite secondaire qui est des produits à structure chimique complexe. Il faut savoir qu'après récolte, les plantes doivent essentiellement conserver la qualité de leurs principes actifs. La conservation des plantes après récolte est une étape importante pour l'exploitation industrielle du métabolisme secondaire.

##### **I.3.2.1- Molécules issues du métabolisme primaire**

Ce sont des composés qui sont produits dans toutes les cellules et qui jouent un rôle central dans le métabolisme et la reproduction de ces cellules. Ces molécules comprennent les acides nucléiques, les acides aminés communs, les acides gras et les sucres. [8]

Parmi les molécules issues du métabolisme primaire, nous pouvons citer:

**I.3.2.1. a- Lipides :** Ce sont des esters d'alcools et d'acides gras ; ce sont des corps insolubles dans l'eau (hydrophobes), solubles dans les solvants organiques apolaires et ils ne sont pas volatils (huiles lourdes). En plus de la fonction de barrière, les lipides fournissent des membranes de destructions et de fusions (caractéristiques qui sont essentielles pour la division cellulaire). [9]

**I.3.2.1. b- Les lipides vrais :** Ils résultent de la condensation d'acides "gras" avec des alcools par liaison ester ou amide.

**I.3.2.1. c- Les acides gras :** Ce sont des acides carboxyliques R-COOH dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable qui donne à la molécule son caractère hydrophobe (gras).

- **Les acides gras saturés :** De formule générale  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{COOH}$ , chaque acide gras est constitué par une chaîne hydrocarbonée, plus ou moins longue, fortement apolaire et un groupement carboxyle polaire. Exemple : l'acide palmitique en  $\text{C}_{16}$  de formule  $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_{14} - \text{COOH}$ .

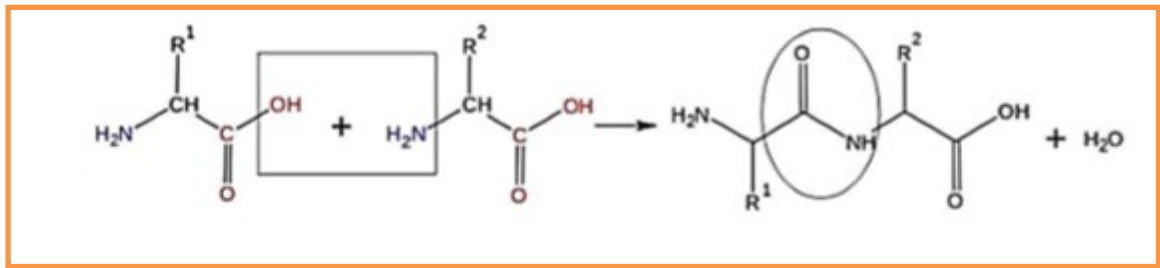
- **Les acides gras insaturés :** Ils présentent dans leur molécule une ou plusieurs doubles liaisons. La présence de ces doubles liaisons leur confère des propriétés physico-chimiques particulières. Exemple: l'acide oléique en  $\text{C}_{18}$  possède une double liaison en position 9.

- **Les acides gras atypiques :** Des acides gras à nombre impair de carbones, ou des acides avec des modifications de la chaîne carbonée portant sur l'insaturation, ou ayant subi des substitutions ou des cyclisations.

- **Les lipides simples :** Les lipides simples, encore appelés homolipides sont des corps ternaires (C, H, O). Ils sont des esters d'acides gras que l'on classe en fonction de l'alcool : - acylglycérols (ou glycérides) : sont des esters du glycérol, - cériques : sont des esters d'alcools à longue chaîne (alcool gras), - stériques : sont des esters de stérols (alcool polycyclique).

**I.3.2.1. d- Les peptides :** Un peptide est un composé formé d'enchaînement d'acides  $\alpha$ -aminés. Lorsqu'un grand nombre (plus d'une dizaine) d'acide  $\alpha$ -aminés sont reliés entre eux, la macromolécule est appelée protéine. Les acides aminés sont reliés entre eux par une liaison peptide comme illustré sur le schéma 1, Il s'agit d'une liaison amide obtenue par réaction d'une fonction acide carboxylique et d'une fonction amine

libérant une molécule d'eau. Les quatre atomes (C, N, O et H) sont dans un même plan et les liaisons sont coplanaires. [10]



**Figure 01** : Formation des acides aminés

**I.3.2.1. e- Les glucides** : Les glucides sont des molécules indispensables à la survie des organismes vivants car leurs formes les plus simples sont à la base des mécanismes énergétiques et de la biosynthèse des autres métabolites. Chez les végétaux on les retrouve sous différentes formes: polymères énergétiques (amidon) ou turaux (cellulose, pectines...), sucres simples et hétérosides. [11]

**I.3.2.1. f- Les acides aminés et organiques** : Ces métabolites primaires polaires sont présents dans différentes parties des plantes. [12, 9]

Les fruits et le jus d'argousier contiennent dix-huit acides aminés dont les plus abondants sont l'acide aspartique, la proline et la thréonine. Des acides organiques sont également présents tels que l'acide malique, l'acide quinique et l'acide citrique. [12]

### I.3.2.2- Molécules issues du métabolisme secondaire

Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires qui ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Les métabolites secondaires à structures chimiques souvent complexes, sont très dispersés et très différents selon les espèces. [11,13]

Parmi les molécules issues du métabolisme primaire, nous pouvons citer:

**I.3.2.2.1- Les composés phénoliques** : Ce sont des composés dont les molécules contiennent a moins une fonction phénolique, ils sont fortement présentés dans le dans le règne végétal. Parmi les composés phénoliques ; les flavonoïdes, les quinones phénoliques, les lignanes, les xanthones, les coumarines et les tanins.

- Les acides phénols

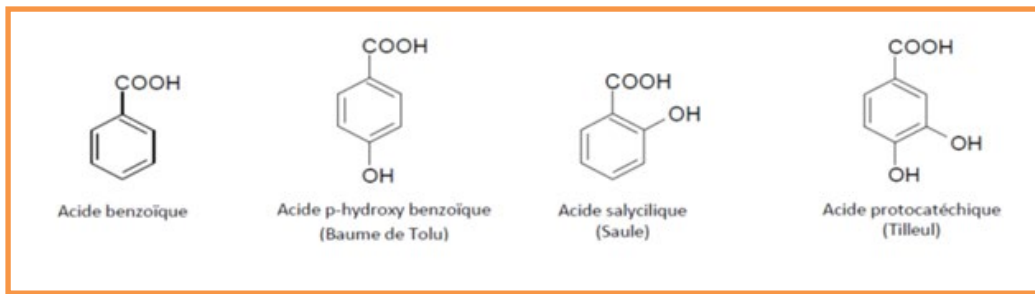


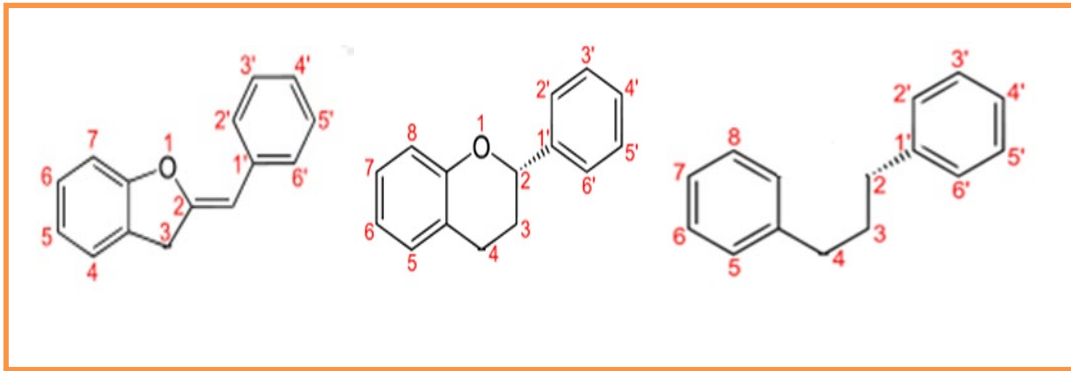
Figure 02 : Structures des acides phénols

- Les phénols simples : ce sont des composés qui existent dans la nature



Figure 03 : Structures des phénols simples

a- **Les flavonoïdes** : Les flavonoïdes sont des pigments végétaux simples ou glycosylés, garantissant la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Ils regroupent les molécules présentant de différentes propriétés telles que : les flavones (exemple : l'apigénol 9), flavonols (comme le quercétol 10) qui sont incolores et ont un rôle de co-pigment et de protection, alors que les chalcones (l'isoliquiritigénine 11), les auronnes (l'hispidol 12) et les flavonones (Quercétine13) qui sont illustrées dans la figure 04. Certains ne sont visibles que par les insectes assurant la signalisation pour les pollinisateurs. [14] Ils sont également présents dans le thé, les céréales, les épices et les herbes aromatiques. [15-16]

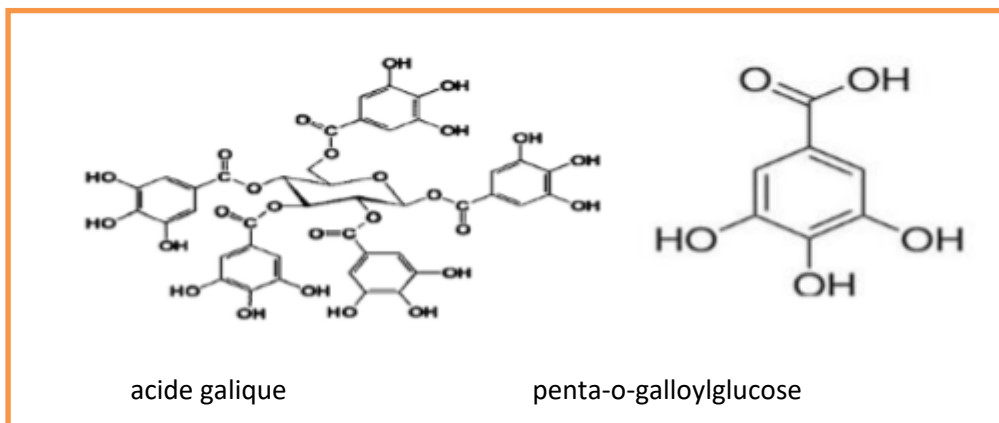


**Figure 04 :** Structures des flavonoïdes

**b- Les tanins :** sont des substances naturelles, végétales, polyphénoliques, hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 g/mol, à saveur astringente, ayant en commun la propriété de tanner la peau. Les tanins possèdent la capacité de précipiter les protéines, alcaloïdes et polysaccharides, à partir de leur solution aqueuse. Ils sont utilisés par les plantes supérieures (arbres, plantes à fleur, etc.) comme moyen de défense chimique contre les parasites. On les retrouve dans quasiment tout type de partie végétale exposée à des risques de prolifération microbienne (écorces, racines, feuilles, fruits,..) On observe surtout une accumulation dans les écorces âgées et les tissus d'origine pathologiques, on distingue plusieurs classes des tanins :

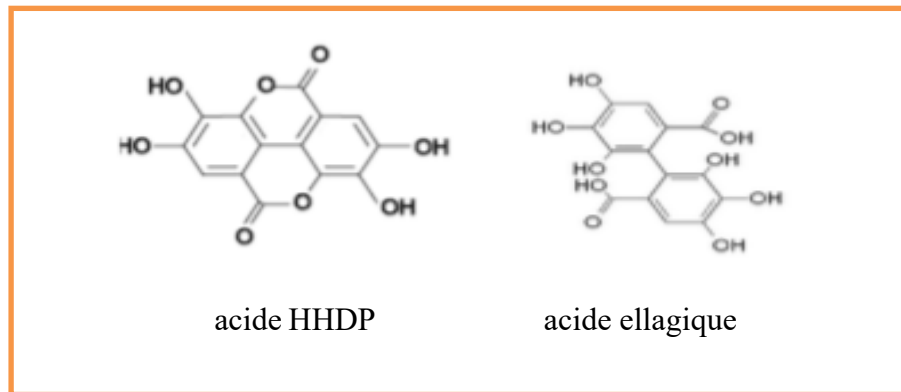
**b.1-Tanins hydrolysables :** Ce sont des phénols liés à un résidu sucré par un lien ester ou des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement hydrolysables par les acides ; on distingue :

**a- Les gallitannins ou tanins galliques ou aussi gallo-tanins:** si le phénol est l'acide gallique. Ils libèrent, par hydrolyse, l'ose et l'acide gallique



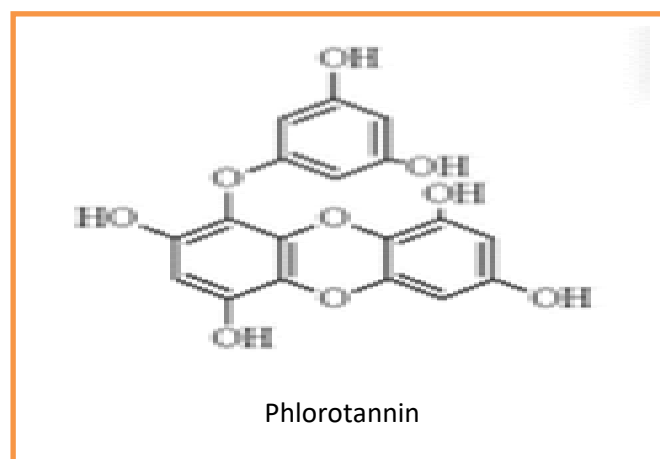
**Figure 05 :** Structures des tanins galliques

**b- Les ellagitannins ou tanins ellagiques ou ellagi-tanins** par hydrolyse, ils libèrent l'ose, l'acide HHDP (acide hexahydroxy diphénique) et ces différents dérivés (acide ellagique et acide chébulique)



**Figure 06 :** Structures des tanins ellagiques

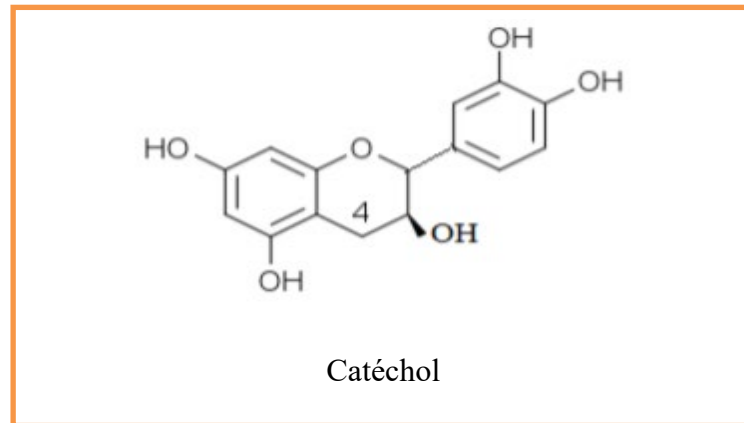
**c-Des tanins particuliers, ou phlorotannins** qui existent chez les algues hétérocontes (Phéophytes ou Diatomées).



**Figure 07 :** Structure de phlorotannins

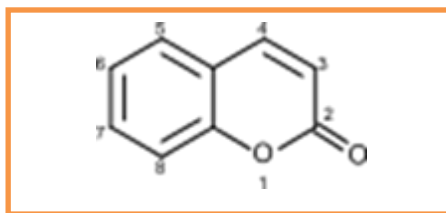
**b.2-Tanins condensés :** appelés aussi pyrocatéchiques ou proanthocyanidols (car ils conduisent en milieu acide et à chaud à des anthocyanidols) ; ce sont les tanins catéchiques, oligomères et polymères d'aglycones polyphénols flavaniques (unités flavan-3-ols), non hydrolysables. [17]

Ils forment dans les vacuoles des solutions pseudo colloïdales et peuvent aussi se fixer au niveau des lignines, renforçant encore l'imputrescibilité du bois. La disparition des tanins, lorsque les fruits ont atteint leurs maturations montre que comme d'autres composés phénoliques, ils peuvent être réutilisés par la plante. [18]



**Figure 08 :** Structure d'un tanin condensé

- c- **Les coumarines** : sont des substances naturelles dérivant de la benzo- $\alpha$ -pyrone (2H-1-benzopyrane-2-one). Les coumarines possèdent des hydroxyles phénoliques qui peuvent être méthylés ou être engagés dans des liaisons hétérosides, ils constituent alors la génine. Plus d'un millier de coumarines naturelles ont été décrites. Elles sont très largement distribuées dans le règne végétal. La structure de base de cette famille est la suivante :



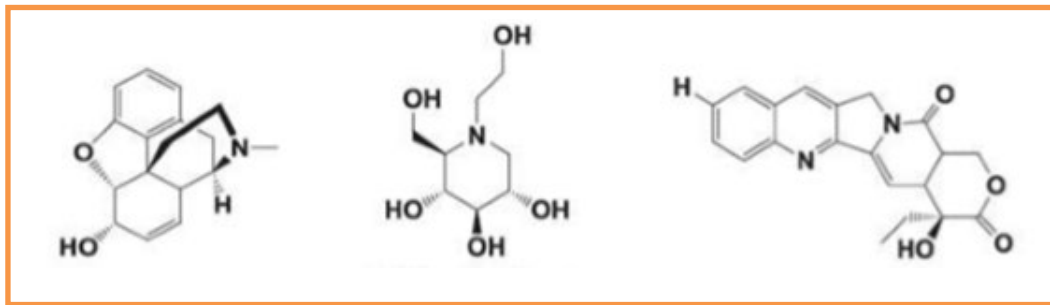
**Figure 09 :** Structure de la coumarine

- d- **Les lignanes** : Le terme lignane désigne habituellement des composés naturels dimères dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones  $\beta$  des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phényl propane (liaison 8-8'). [14]

Plusieurs centaines de lignanes ont été isolées. [19] Ils possèdent des activités biologiques, antitumorales et anti-oestrogéniques. Ce sont également des inhibiteurs des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones sexuelles. [20]

**e- Les quinones** : Les quinones résultent de l'oxydation des dérivés aromatiques caractérisés par un motif 1,4-dicétocyclohexa-2,5-diéniq (para-quinones) ou par un motif 1,2-dicétocyclohexa -3,5diéniq (ortho-quinones). La dione peut être conjuguée aux doubles liaisons d'un noyau benzénique (benzoquinones) ou à celles d'un système aromatique polycyclique condensé : naphthalène (naphtoquinones), anthracène (anthraquinones), naphtodianthrène (naphtodianthrone)...etc. On retrouve des motifs quinoniques dans différentes classes de composés secondaires, par exemple à squelette terpénique, présent en particulier secondaires, par exemple à squelette terpénique, présent en particulier chez les Lamiaceae. [21]

**f- Les alcaloïdes** sont des molécules azotés et alcalins, ils précipitent généralement avec des réactifs iodométriques (réactif de Dragendorff) et sont souvent biologiquement actifs. Les alcaloïdes sont utilisés comme antalgiques majeurs (morphine), antipaludiques (quinine), pour combattre l'excès d'acide urique (colchicine), comme substances paralysantes (curare, caféine), comme poisons (strychnine, nicotine), comme stupéfiants (cocaïne, mescaline), comme cholinergiques (pilocarpine) ou comme anticancéreux (vinblastine, vincristine). D'autres alcaloïdes, comme l'atropine, présentent une activité sédatrice, effets sur les troubles nerveux (maladie de Parkinson). [14]



**Figure 10** : Structures de quelques alcaloïdes

**I.3.2.2.2- Les huiles essentielles** : Les huiles essentielles contenues telles quelles dans les plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique. Elles sont constituées de différents composants terpènes, esters, cétones, phénols et d'autres éléments qui ne sont pas tous encore analysés. Seules les huiles essentielles naturelles ont des propriétés thérapeutiques.

Parmi la foule d'essences naturelles qui entrent dans la composition de nombreux remèdes naturels, citons l'essence d'anis (*Oleum anisi*), de fenouil (*Oleum*



foeniculi), de lavande (*Oleum levandulae*), de menthe poivrée (*Oleum menthae*) et le menthol qu'elle fournit, ainsi que son carvacrol qui est un excellent désinfectant. L'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*), par exemple, est fortement antiseptique [14, 22, 17]. La pharmacologie regroupe sous le nom de principes amers des substances végétales terpéniques susceptibles de libérer de l'azulène, ainsi que des glucosides de diverses structures biochimiques [23,24]. Comme leur nom l'indique, les substances amères sont divers composés qui ont un goût amer très prononcé. Ces substances stimulent les glandes salivaires et les organes digestifs. Elles augmentent l'appétit et facilitent la digestion (stomachique, apéritif, tonique).

**I.3.2.2.3- Les huiles grasses :** Il s'agit d'huiles végétales liquides à température ambiante. Le froid les trouble et les fait figer, elles sont insolubles dans l'eau, mais bien solubles dans les solvants organiques (chloroforme, acétone, par exemple).

Parmi les huiles non siccatives, on peut citer l'huile d'olive et l'huile d'amandes, parmi les semi siccatives, celle d'arachide, de tournesol et de colza. L'huile de lin et d'œillette sont siccatives. L'huile de ricin est fortement laxative. Les huiles grasses sont couramment utilisées, tant pour la fabrication de remèdes qu'à des fins alimentaires et industrielles [24].

**I.3.2.2.4- Les hétérosides :** Les hétérosides, appelés aussi glycosides sont des composés originaires de l'accumulation de monosaccharides avec un composé non-glucidique appelé la génine ou encore la fraction aglycone. L'origine biosynthétique de ces génines est très hétérogène (composés phénoliques, alcaloïdes terpéniques, composés soufrés...etc). La glycosylation modifie les propriétés de solubilités des molécules (composés phénoliques glycosylés plus hydrosolubles, saponines amphiphiles). On peut mentionner quatre familles importantes d'hétérosides :

- Les glucosinolates.
- Les hétérosides cyanogènes.
- Les hétérosides cardiotoniques.
- Les saponosides.

**I.3.2.2.5- Les saponines :** Toutes les saponines sont fortement moussantes et constituent d'excellents émulsifiants (en latin, *sapo* signifie savon) [17].

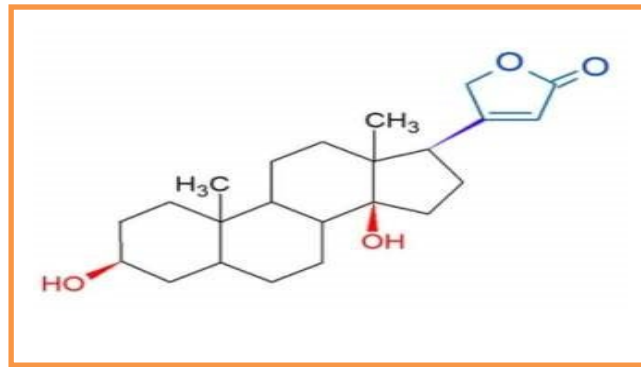
Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïdes. L'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdes à partir desquels on synthétisa la pilule contraceptive. Les saponines triterpénoïdes, contenues dans la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*), ont une activité hormonale moindre. Elles sont souvent expectorantes et facilitent l'absorption des aliments. [22,17]. Les saponines ont la propriété d'hémolyser les globules rouges, ce qui explique l'effet toxique de certaines d'entre elles à l'égard des animaux à sang froid, surtout les poissons. Les saponines causent un relâchement intestinal, augmentent les sécrétions muqueuses bronchiales et désinfectent les voies urinaires. Elles sont employées comme diurétiques et elles possèdent des propriétés cytotoxiques et antitumorales [22]. Les saponines sont aussi connues par leur activité antifongique, comme la dioscine trouvée dans certains légumes. Celles à génine stéroïdique sont des fongicides plus efficaces que celles à génine triterpénique [25].

**I.3.2.2.6- Les glucosinolates :** Les glucosinolates sont présents dans toutes les espèces de Brassicaceae. [26], le radis (*Raphanus sativus*) et le cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*) sont des plantes à glucosinolates typiques [22,17]. On les rencontre également dans d'autres familles telles que les Capparidaceae et Moringaceae. Les glucosinolates (GLC) sont des hétérosides soufrés, anioniques, responsables des odeurs fortes dégagées par les Brassicaceae [22]. La structure de base des glucosinolates comporte un glucose (Glu), un groupe sulfate et une génine variable (R). La molécule existe généralement sous la forme de sels de potassium [27,28].

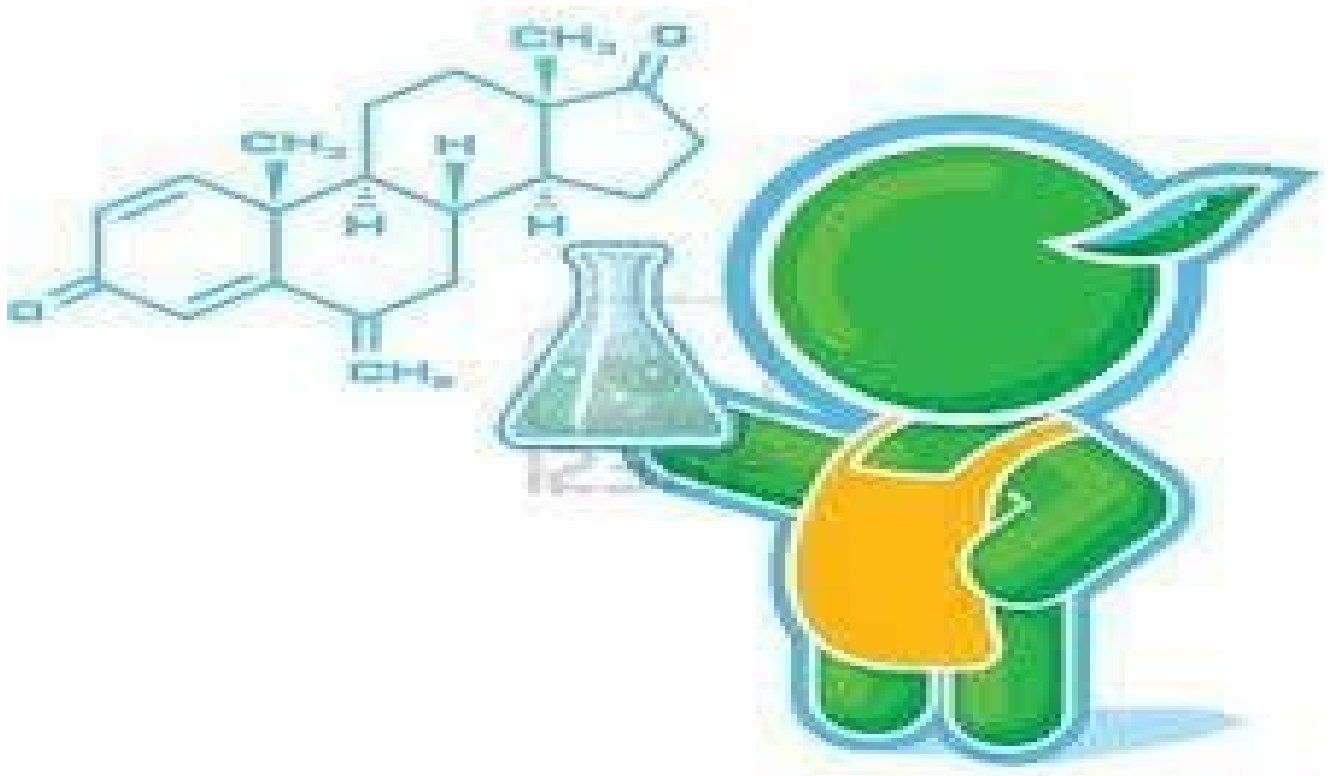
Certains auteurs considèrent ces molécules utiles, non seulement pour leur activité contre les bactéries, les champignons, nématodes mais aussi sur la croissance des cellules de tumeur et dans la prévention du cancer [22,29- 30].

**I.3.2.2.7- Les hétérosides cyanogéniques :** Molécules liées à un sucre et susceptibles de libérer HCN par hydrolyse. Il s'agit de substances à base de cyanure, mais qui à petites doses ont un effet sédatif sur le système nerveux (muscles, cœur). L'écorce du *Prunus serotina* (cerisier sauvage), les noyaux de fruits de *Prunus armeniaca* (l'abricotier) et les feuilles du *Sambucus nigra* (sureau noir), (les trois parties contiennent les cyanogènes), permettent de supprimer ou de calmer les toux sèches et irritantes.

**I.3.2.2.8- Les hétérosides cardiotoniques :** On retrouve les hétérosides cardiotoniques dans de nombreuses plantes médicinales, telles que la digitale laineuse (*Digitalis lanata*) et pourprée (*D. purpurea*) et le muguet (*Convallaria majalis*). Selon leurs structures chimiques, on les divise en cardénolides et en bufadiénols. Ces substances (comme la digitoxine, la digoxine et la convallotoxine) ont une action directe sur le cœur (régulant l'activité cardiaque à des doses infinitésimales en cas d'affaiblissement de ce dernier) [31]. Chez les individus non atteints de cardiopathies, elles sont dangereuses. Leur consommation peut être fatale pour l'homme et les animaux. Les glucosides cardiaques ont aussi des propriétés diurétiques [22 ,17]. La figure 11 illustre la structure d'un hétéroside cardiotonique.



**Figure 11 :** Structure d'hétérosides cardiotonique



**Généralités sur la famille des  
résédaceae  
et la plante *Résida alba* L.**

## I.4- Généralités sur la famille des résédaceae

### I.4.1- Description de la famille

#### I.4.1.1- Distribution

La famille des résédaceae est concentrée sur le pourtour méditerranéen, elle s'étend en Europe tempérée, en Asie centrale et en Inde. *Oligomeris* est largement répandu jusqu'en Afrique du sud, dans les îles Canaries, avec une espèce dans le sud-ouest des Etats-Unis et au Mexique. *Caylusea* s'étend des îles du Cap Vert à travers le nord de l'Afrique, jusqu'en Inde alors que *Réséda* se limite à l'Europe, et en région méditerranéenne jusqu'à l'Asie centrale.

**Appareil végétatif :** Les Résédaceae sont des plantes herbacées annuelles ou pérennes, ou des arbustes de milieux secs. Les feuilles sont alternées, entières ou divisées et munies de petites stipules glanduleuses. [32]



Figure 12 : Répartition géographique des espèces de la famille Résédaceae

#### I.4.1.2- Reproduction

Les fleurs sont zygomorphes, généralement bisexuées, et groupées en grappes pourvues de bractées, ou en épis terminaux. Il y a 4-7 sépales généralement libres et persistants, parfois inégaux. Les 2-8 pétales, parfois plus nombreux, plus rarement absents, ne sont pas toujours en nombre égal aux sépales. Ils sont le plus souvent pourvus d'onglets, avec un appendice écaillé à la base et un limbe plus ou moins profondément découpé, et ont une position hypogyne ou perigyne. Les étamines et l'ovaire sont portés par un court androgynophore, et il y a généralement 3-45 étamines

insérées sur un disque zygomorphe. Les filets sont parfois soudés à la base, et les anthères sont biloculaires. L'ovaire est supère, formé de 2-7 carpelles plus ou moins soudés. Poly-ovulé, il est parfois uniloculaire, et la placentation est pariétale ou basale.

Le genre *Réséda* possède des fleurs à caractères souvent aberrants, elles ne sont plus construites sur le type dimère, sont parfois trimères, mais tendent vers le type pentamère, ce qui les éloigne ainsi considérablement des autres familles.

Le fruit est généralement une capsule indéhiscente et ouverte, mais celui d'*Ochranedus* est une baie. Les graines sont réniformes à suborbiculaires, avec une caroncule, un embryon courbé, très peu d'albumen, et des cotylédons courbés. [32]

#### I.4.1.1. 3- Intérêts

Certaines espèces de *Réséda* sont cultivées pour l'ornementation (*R. odorata*), d'autres l'ont été pour des buts moins avouables (*R. luteola*, gaude ou herbe aux juifs, était employée plusieurs fois dans l'histoire pour la teinture des vêtements des juifs réprouvés). [32]

#### I.4.1.1.4- Quelques espèces de la famille



*Reseda alba* L.



*Sesamoides prostrata*



*Reseda odorata*

**Figure 13** : Quelques espèces de la famille Résédaceae [32]

## I.5- Généralités sur la plante

### I.5.1- Description

Le *Réséda alba* L. est une plante annuelle ou bis-annuelle, polie, de tige de 30-60 cm, dressée, robuste, sous-ligneuse à la base. Ces feuilles pennatiséquées, à segments décurrents, inégaux, lancéolés, à fleurs blanches, en longues grappes très denses, pédicelles courtes, 5 sépales linéaires-aigues, 5 pétales plus longs que le calice, 10-20 étamines un peu plus courtes que la corolle, capsule dressée, oblongue, 3 fois plus longue que le calice, à 4 angles, à 4 petites dents triangulaires, graines papilleuses plante polymorphe.

**Remarque :** Des différences peuvent apparaître concernant la taille et la période de floraison entre la description de la flore de notre zone de récolte et celles mentionnées ci-dessus. [33]

#### I.5.1.2- Systématique

Nom scientifique : *Réséda alba* L.

Famille : résédaceae

Nom vernaculaire arabe : بعصوص الخروف ، الذنبان

L'aire de répartition et habitat : Commune dans la région de la méditerranée et la région européenne.

Les critères morphologiques : C'est une plante aux critères suivants :

- Feuillage dense.
- Haute tige côtelée ramifiée.
- Feuilles alternés, de couleur vert foncé brillant, très devisées en 5 à 15 paires de lobes ondulés.
- Fleurs d'un blanc terne de 6 mm de long au plus, sont regroupées en grappes bien fournies.
- Fruit avec une forme de capsule de 15 mm de long au plus.

Partie utilisée de la plante : partie aérienne (feuilles, tiges, écorce, fleurs et grains) .

Usage traditionnel : Leucomes oculaire, conjonctivite ....

Mode d'emploi : Décoction de la feuille, macérât aqueux ...

## **Méthodes de séparation et d'analyse**

### **II.1- Définition**

Un procédé de séparation est une technique ou une technologie permettant de transformer un mélange de substances en deux ou plusieurs composants distincts. Les buts de ce type de procédé peuvent être divers. [34] [35]

- Purification : des impuretés doivent être extraits du composé d'intérêt
- Concentration : élimination d'une partie du solvant
- Fractionnement : séparation d'un mélange complexe en plusieurs mélanges différents.

Le principe d'un procédé de séparation est d'utiliser une différence de propriétés entre le composé d'intérêt et le reste du mélange. Plus la différence de propriété sera grande, plus la séparation sera aisée. Ainsi le choix du procédé de séparation commence par une bonne connaissance de la composition du mélange et des propriétés des différents composants.

### **II.2- Les méthodes d'extraction**

#### **II.2.1- Extraction solide / liquide**

L'extraction solide/liquide consiste à extraire une substance (principe actif) présente dans une matière végétale (solide) pour la faire passer dans un solvant (méthanol, l'eau .....).

Les cas les plus simples de cette extraction sont : la décoction, infusion et la macération.

##### **II.2.1.1- Décoction**

Dans la décoction généralement le solvant utilisé est l'eau, elle s'applique aux parties les plus dures des plantes : racines, graines, écorce, bois. Elle consiste à chauffer la matière végétale avec l'eau jusqu'à ce que cette dernière soit bouillante.

##### **II.2.1.2- Infusion**

Dans l'infusion le solvant utilisé peut être l'eau, huile ou un alcool. Elle consiste à dissoudre une matière végétale dans le solvant initialement bouillant et le laisser refroidir.

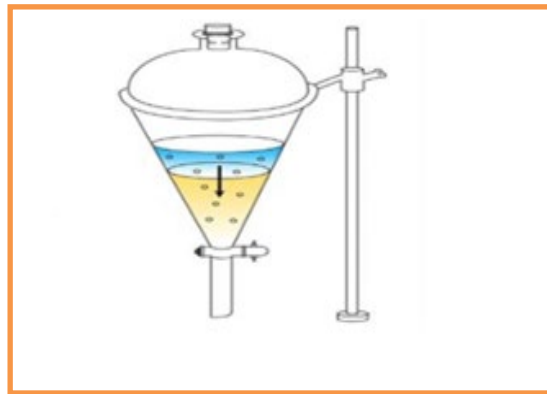


### II.2.1.3- Macération

Dans la macération il faut tremper la plante sèche dans un solvant choisi pendant des heures voire même des jours.

### II.2.2- L'extraction par solvant

L'extraction par solvant, également connue sous le nom d'extraction ou de séparation liquide – liquide, est une méthode pour séparer un composé en fonction de la solubilité de ses parties. Cela se fait en utilisant deux liquides qui ne mélangent pas, par exemple, l'eau et un solvant organique (figure 14). [36]



**Figure 14 :** Schéma d'extraction par solvant

Le solvant le mélange d'une substance ayant des propriétés extractives (extractant) vis à vis du soluté à transférer et d'un diluant approprié, n'ayant lui-même aucun pouvoir extractant mais permettant d'améliorer les propriétés physiques (densité, viscosité). [37]

### II.2.3- Distillation ou entraînement à la vapeur :

L'entraînement à la vapeur d'eau est l'une des méthodes officielles pour l'obtention des huiles essentielles figure (15). A la différence de l'hydrodistillation, cette technique ne met pas en contact direct l'eau et la matière végétale à traiter. De la vapeur d'eau fournie par une chaudière traverse la matière végétale située au-dessus d'une grille. Durant le passage de la vapeur à travers le matériel, les cellules éclatent et libèrent l'huile essentielle qui est vaporisée sous l'action de la chaleur pour former un mélange « eau + huile essentielle ». Le mélange est ensuite véhiculé vers le condenseur et l'essencier avant d'être séparé en une phase aqueuse et une phase organique : l'huile essentielle. L'absence de contact direct entre l'eau et la matière

végétale, puis entre l'eau et les molécules aromatiques évite certains phénomènes d'hydrolyse ou de dégradation pouvant nuire à la qualité de l'huile. [38]

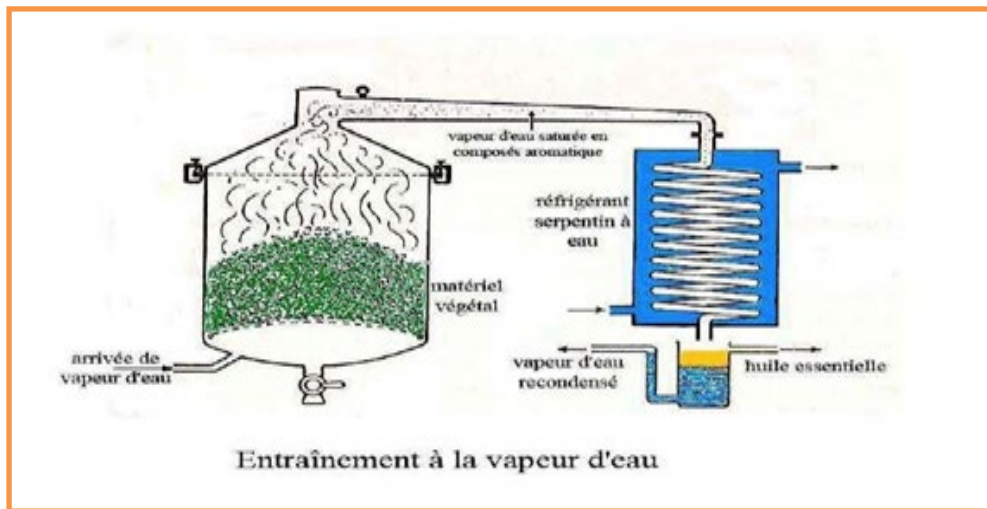


Figure 15 : Schéma d'extraction par l'entraînement à la vapeur d'eau

#### II.2.4- Hydrodistillation

L'hydrodistillation est l'une des méthodes les plus anciennes et les plus simples. Utilisée pour l'extraction des huiles essentielles, elle est utilisée pour isoler les huiles essentielles de la plante aromatique et médicinale. La méthode conventionnelle d'extraction des huiles essentielles est l'hydrodistillation (HD), dans laquelle les huiles essentielles sont évaporées en chauffant un mélange d'eau ou d'autres solvants et matières végétales suivi de la liquéfaction des vapeurs dans un condenseur. Un condenseur et un décanteur pour collecter le condensat et séparer les huiles essentielles de l'eau, respectivement (figure 16). [39]

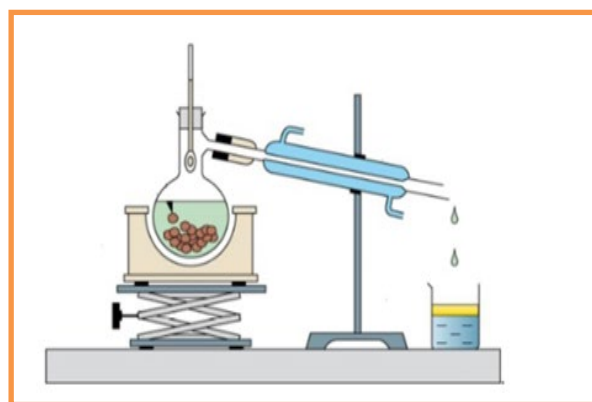


Figure 16 : Schéma d'extraction par hydrodistillation

### II.2.5- Extraction par Soxhlet

L'appareillage Soxhlet permet l'extraction aux solvants « en continu » d'espèces chimiques contenues dans une matrice solide. L'échantillon, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs de solvant. Celles-ci passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensat s'accumule dans le corps de l'extracteur (figure 17) jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant alors le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt . [44]

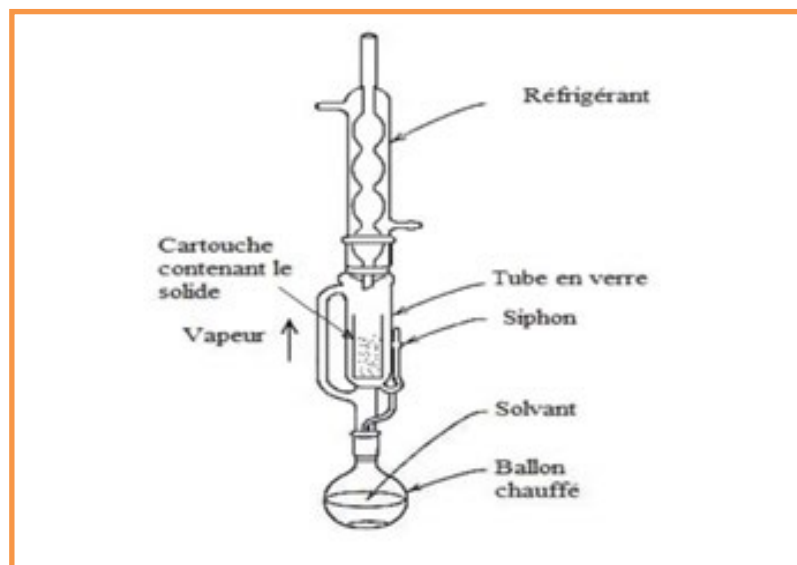


Figure 17 : Schéma d'extraction par soxhlet

## II.3- Les méthodes d'analyses

### II.3.1- Analyses chimiques

**II.3.1.1- analyse par méthodes chromatographiques :** est une méthode séparative qui permet l'identification et le dosage des différents composés d'un mélange.

Le principe est basé sur les différences d'affinité des composés du mélange avec la phase stationnaire et la phase mobile.

Le chromatogramme traduit la variation du soluté dans l'éluant en fonction du temps.

[40]

**a- La chromatographie sur couche mince :**

La chromatographie sur couche mince (C.C.M) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants qui progresse le long d'une phase stationnaire (gel de silice, polyamide, cellulose...) fixée sur une plaque de verre (20x20 cm) ou sur feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Cette technique prise dans sa forme préparative est souvent utilisée en dernier lieu. En effet, lorsque le système de solvant ou l'éluant est bien choisi, cette technique utilisée sous sa forme préparative, est souvent très avantageuse car la transposition à partir de C.C.M analytiques est facile. Le procédé est rapide et permet d'isoler des quantités de substances suffisantes pour des analyses de structures. Cette méthode permet la plupart du temps d'obtenir des produits purs. L'application de ces techniques chromatographiques, d'une manière systématique ou sélective permet à coup sûr d'obtenir des produits purs. A ce stade, le degré de pureté est apprécié par les résultats de différents contrôles chromatographiques effectués sur les produits isolés. Ces contrôles doivent nécessairement être effectués dans au moins deux ou trois systèmes de solvants différents. Ce n'est qu'à ce moment que les produits isolés seront enfin prêts (purs et propres) pour l'opération d'identification structurale. [41]

**b- La chromatographie sur colonne (CC)**

Alors que toutes les autres méthodes chromatographiques sont habituellement employées pour l'analyse, la séparation ou la purification de faibles quantités de produits, la CC peut être une méthode préparative ; elle permet, en effet, la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement, à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre parfois jusqu'à plusieurs grammes. Dans notre cas, il a été question d'une CC de gel silice 60 utilisée en premier lieu, elle permet de dégraisser l'extrait, d'éliminer les pigments chlorophylliens et autres produits ne faisant pas l'objet de ce travail et bien sûr dans la mesure du possible, départager le tout en bloc de composés plus en moins similaires. [41]

**II.3.1.2- Analyse par spectroscopie ultraviolette (UV)**

La spectrophotométrie UV-visible est une technique analytique fondée sur l'étude du changement de l'intensité de la lumière traversant une solution colorée, dans un domaine d'application comprise entre 200 et 800 nm, en effet pour pouvoir déterminer les concentrations des substances absorbantes. [42]

Le résultat correspond à des spectres d'émission ou d'absorption. Qui ressemble à des courbes de variation d'absorption en fonction de la longueur d'ondes, il est obtenu par un Spectrophotomètre à une lumière sensiblement monochromatique, ou le chromophore est le site dont la structure de l'élément à étudier possède l'aptitude à absorber les photons UV ou visible. Il est caractérisé par la longueur d'onde la plus absorbée ( $\lambda_{\max}$ ), et l'aptitude la plus importante à absorber les photons à cette longueur d'onde ( $\xi_{\max}$ ). [43]



Figure 18 : Spectrophotomètre

**II.3.1.3- Analyses biologiques****a- Etude d'activité antibactérienne**

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris, agents antibactériens. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections. Le mode d'action de ces agents sur les bactéries, peut-être : bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries ou bactéricides : lorsque la substance détruit totalement les bactéries. [44]

**b- Etude d'activité antifongique :**

L'activité antifongique de divers extraits aqueux, hexanique, méthanolique et éthanolique de cannelle est étudiée sur diverses souches de champignons lévuriformes et filamenteux. [45]

Les méthodes pratiques au laboratoire qui estime les propriétés d'un produit in vitro (tests antifongique) sont nombreuses, mais elles sont de même principe, celui de confronter :

- la substance anti microbienne (fongicide, bactéricide, insecticide,)
- l'agent pathogène (champignons, bactéries, insectes,) sur un support artificiel.

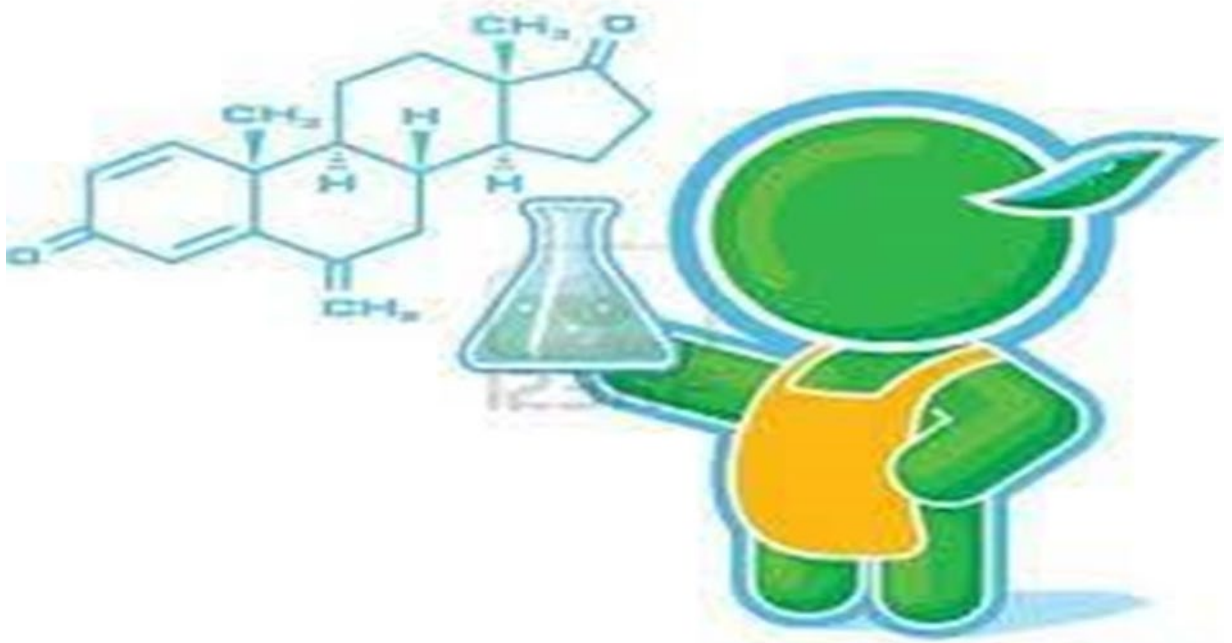
**Liste des références bibliographiques**

- [1] S. Salhi et al, (2010), Etudes floristique et ethnobotanique des plantes médicinales de la ville de Kénitra, Revue Laza, vol 31(9), pp133-80.
- [2] F. Baba aissa, (2000), Les plantes médicinales en Algérie, Edit. Bouchéne et AD. Diwan, Alger, p 368.
- [3] Chevallier,(2001), Encyclopedia des plantes médicinales. Edit. La rousse, Paris, pp16-293-295.
- [4] J. Bruneton, (1999), Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Edit. médicales Internationales, 3 ème Edit, Paris, p 810.
- [5] La pharmacopée traditionnelle marocaine : Médecine arabe ancienne et savoir-faire, ISBN 2-910728-03-X, Ibis Press.
- [6] A. Botrel et al, (2007), Larousse des plantes médicinales. Edit. Copyright, France, pp 6-7-10.
- [7] J.Valnet, (1983), phytothérapie, traitement des maladies par les plantes. Paris, Edit. Maloine S.A., 5ème Edit, vol 01, p 942.
- [8] M. Thomas, (2011), Nouvelles méthodologies d'extraction, de fractionnement et d'identification : Application aux molécules bioactives de l'argousier (*Hippophaë rhamnoides*), Thèse de doctorat, université D'Orléans.
- [9] G. Van Meer et al, (2008), Membrane lipids. Nat Rev Mol Cell Biol, Vol 9(2):112-12.
- [10] Gilles, (2006), Les acides aminés, <http://planet-vie.ens.fr/content/les-acides-amines>.
- [11] M. Wichtl et al, (2003), Plantes thérapeutiques, ISBN 2-7430-0631-5, p 692.
- [12] S. Berrada, (2009), biochimie appliquée dans les filières ssbssa, Montpellier : les lipides, p.8.
- [13] A. Cheriti et al (1995), Plantes de la pharmacopée traditionnelle dans la région d'El Bayadh, (Algérie), Fitoterapia, Vol 66(6) : 525-538.
- [14] S. Krief, (2003), Métabolites secondaires des plantes et comportement animal, MNHN Paris, p 348.
- [15] W.E Bronner et al, (1995), Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates, Journal of Chromatography A, pp 247-256.

- [16] P.C.H. Hollman et al, (1999), Dietary flavonoids: Intake health effects and bioavailability, *Food Chem.Toxicol*, vol (37), pp 937-942.
- [17] J. Bruneton, (1999), *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*, 3ème Edit, Paris : éditions médicales internationales, éditions Tec. & Doc. Lavoisier, p 1120.
- [18] C. Chun et al, (1991), *American Journal of Chinese Medicine*, pp 17, 265-274.
- [19] L. Hofmann, (2003), *Etude du métabolisme des phénylpropanoïdes*, Thèse de doctorat, université de strasbourg, France.
- [20] B. Raffaelli, (2002), *Enterolignans Journal Chromatography B*, 777(1-2), pp 29-43.
- [21] N.J. Walton et al, (1999), *Chemical from Plants: Perspectives on plant secondary products*, Edit.World Scientific, pp 1-14.
- [22] P. Iserin, (2001), *Larousse des plantes médicinales : identification, préparation, soins*, Edit. Larousse, P 1012.
- [23] J. Bruneton, (1988), *Eléments de Phytochimie et de Pharmacognosie*, Lavoisier.
- [24] H.Kosmas et al, (2002), *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Vol 75, pp 32-44.
- [25] J. M. Berger, (2001), *Thèse de Doctorat*, Virginia.
- [26] A.M. Rizk, (1986), *The phytochemistry of the flora of Qatar, scientific and applied research center university of Qatar*.
- [27] (2005), *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Phytochemistry*, Vol 66 (12), pp175-185 .
- [28] K. Troyer John et al, (2001), *Analysis of glucosinolates from broccoli and other cruciferous vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A*, pp 299–304.
- [29] M.T. Huang et al, (1994), *Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables*, In *Food Phytochemicals for Cancer Prevention*, ACS Symposium Series 546, American Chemical Society, Washington, DC, pp 181-196.
- [30] J.D. Hayes, (2008), *The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates*, *Eur J Nutr*, pp 73-88.



- [31] P.K. Agrawal et al, (1985),  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins, *Phytochemistry* pp 24-2479.
- [32] [https://www.plantes-botanique.org/famille\\_resedaceae](https://www.plantes-botanique.org/famille_resedaceae).
- [33] C. Judson King, (2002), *Separation Processes, Introduction*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, coll. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- [34] G. Mahuzier, (1978), *Méthodes de separation*, ed. Maçon.
- [35] H.A. Hesham et al, (2016), *Techniques for Extraction of Essential Oils from Plants: A Review*, Australian journal of basic and applied scienc, p121.
- [36] V. Toulemonde, (1995), *Cinétique d'extraction liquide-liquide du nitrate d'uranyle et des nitrates d'actinides (III) et de lanthanides (III) par des extractants a fonction amide*, thèse de doctorat, Université de Paris VI, p 15.
- [37] F. Zakaria, (2011), *Le romarin Rosmarinus officinalis Le bon procédé d'extraction Pour un effet thérapeutique optimal*, thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Rabat, p 51.
- [38] H.A. Hesham et al, (2016), *Techniques for Extraction of Essential Oils from Plants: A Review*, Australian journal of basic and applied science, pp 119-120.
- [39] N. Venturini, (2012), *Contribution chimique a la definition de la qualite : exemples des spiritueux de myrte (Myrtus Communisl.) et de cedrat (citrus medical) de corse*, thèse de doctorat en chimie Université de corse-pascal Paoli, pp 12-13.
- [40] <https://www.lachimie.fr/analytique/chromatographie/>.
- [41] A. Boutiti, *Etude phytochimique de l'espece globularia*, thèse de Magister en sciences, Université de Constantine, p 18.
- [42] S. Ramdani et al, (2003), *Détermination simultanée de l'aluminium et du fer par spectrophotométrie dérivée à l'aide de la méthode Zero- Crossing*, mémoire ingénieur, Université A. M Bejaia.
- [43] Meyer et Denier, (1996), *spectroscopie pratique dans le domaine du visible et de l'ultraviolet*, Bull. Un. Phys, vol 784, PP 895- 908.
- [44] (2001), *Commission des Communautés Européennes, propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne*, Bruxelles, vol 885.
- [45] O. Senhaji et al, (2005), *Etude d'activité antifongique de divers extraits de cannelle*, pp 220-229.



## Chapitre III : Matériel et méthodes

## Chapitre III : Matériel et méthodes

III. 1. Étude chimique de *Réséda alba* L.

## III. 1. 1. Classification de la plante

Tableau 1: Classification de la plante

Règne	Plantae
Classe	angiospermes
Sous classe	Asterideae
Catégorie	Sauvage
Nom français	Réséda blanc
Nom arabe	بعصوص الخروف، الذنبان
Nom tamazight (Marocaine)	اجنونمر بتغيتانين
Ordre	brassicales
Famille	Résédaceae
Genre	<i>Réséda</i>
Sous espèce	<i>Reseda alba</i> subsp. Alba et <i>Reseda alba</i> subsp. Hookeri
Espèce	<i>Réséda alba</i>

## III. 1. 2. Description botanique

Plante annuelle ou bisannuelle glabre, mesurant 30 à 60 cm, à une seule tige verticale portant des feuilles pennatiséquées, lancéolées, à fleurs en grappes dressées, à 5 pétales blancs et 5 sépales verts, en feuilles alternées ou en rosette, de forme composée ou lobée entière ou découpée. Plutôt présente dans les régions méridionales, en terrain sableux. Le réséda est un genre de plantes herbacées rustiques pour la plupart, de terrains frais et bien drainés, calcaires ou neutres, en plein soleil.

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département de biologie végétale, Université Larbi Tébessi.

### III. 1. 3. utilisation en médecine traditionnelle

Nos enquêtes ethnobotanique sont montrés que cette espèce, connue sous le nom vernaculaire "Réséda alba", est utilisée pour le traitement des coliques, les diarrhées infantiles et les empoisonnements. Les parties souvent utilisées sont les parties aériennes, vertes ou sèches, sous forme d'infusion.

### III. 1. 4. Répartition Géographique

En Algérie, le genre *Réséda* est connu pour la seule espèce endémique, *Réséda alba*. L. qui pousse dans les dunes de la zone méditerranéenne et pré-désertique. La floraison dans la zone pré-désertique (zone de récolte) et pratiquement en mois d'avril et mai.



Figure 19 : L'espèce *Réséda alba* L.

### III. 1. 5. Choix du matériel végétal

Le choix de cette espèce est reposé sur deux critères principaux :

- ✓ L'endémicité de l'espèce nous a poussés de découvrir leurs métabolites secondaires.
- ✓ Utilisation courante en médecine traditionnelle.
- ✓

### III. 1. 6- Récolte du matériel végétal

La plante *Réséda alba* L., est une espèce endémique, elle a été récoltée durant le mois d'avril 2019 de la région qui s'appelle Kaf El-Essa dans les montagnes d'Al-Anwal dans la wilaya de Tébessa.

### III. 1. 6. 1- Entreposage

Après séchage pendant une période suffisante et qui est étalée sur deux semaines, dans un endroit sec et aéré à l'ombre et à l'abri de la chaleur, les parties aériennes récoltées de feuilles, fleurs et tiges sont soigneusement stockées dans une boîte cartonnée. La plante a été triturée à mains pour éviter toutes sortes de décompositions probables en utilisant le broyage et elle n'a été faite que juste avant la macération.

### III. 1. 6. 2- Plan du travail expérimental

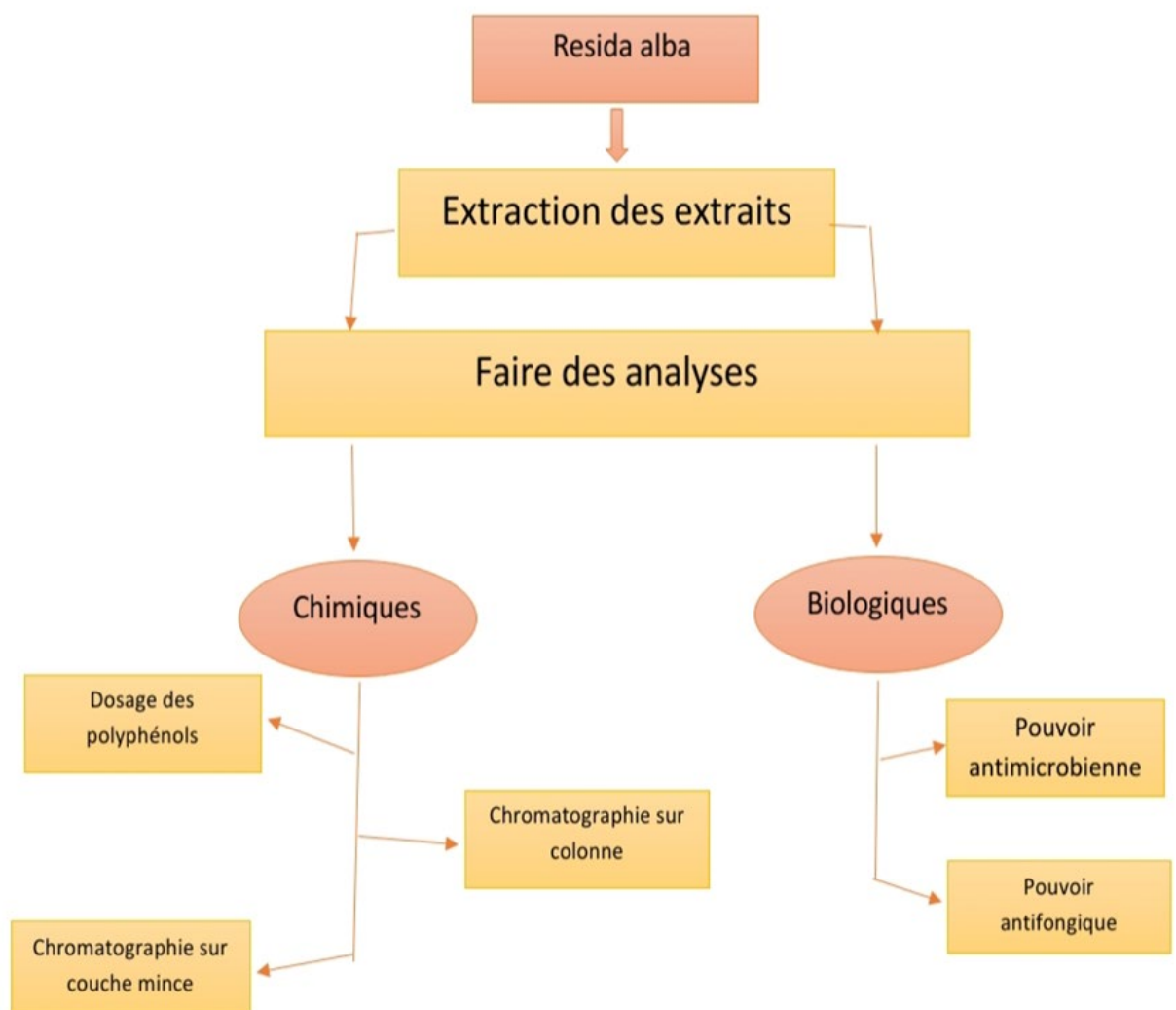


Schéma 01 : Plan du travail expérimental

### III. 1.7- Extraction

500 g de la matière active a été faite par une macération dans un mélange méthanol-eau (70 :30 V) pendant 24 heures. Cette opération est répétée 3 fois avec renouvellement du volume perdu du solvant au cours de l'évaporation préliminaire.

Les diverses fractions récupérées sont ensuite évaporées sous pression réduite à une température inférieure à 60 °C jusqu'à l'obtention d'un gel solidifié au cours du temps. Ce dernier a été traité par de l'eau bouillante, pour l'élimination éventuelle de la chlorophylle. L'aspect de la solution obtenue a une tendance vers une couleur brune vu la présence de la chlorophylle. La solution ainsi obtenue est soumise aux opérations de séparations montrées dans le protocole suivant:

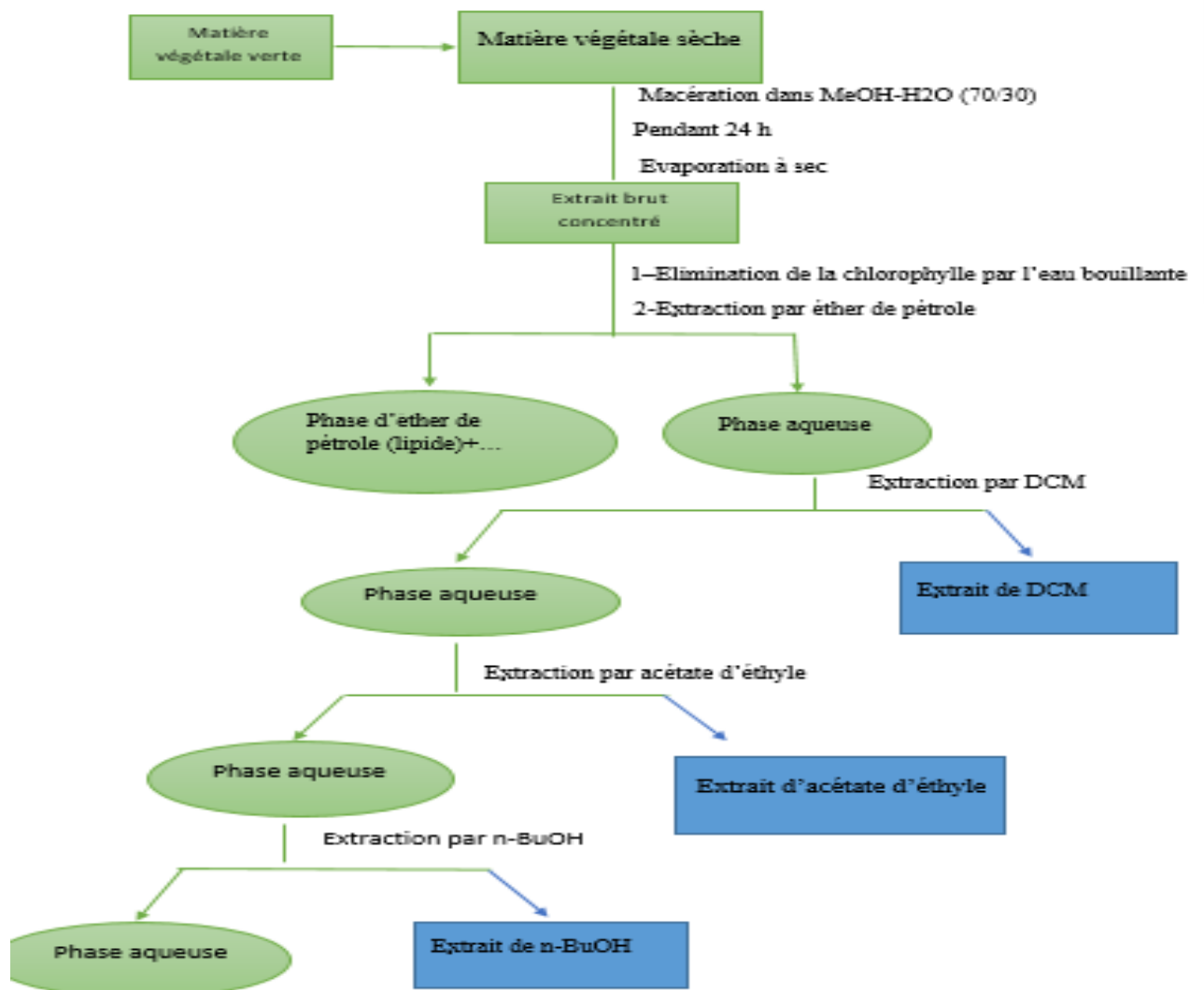


Schéma 02 : Plan d'extraction

**III. 1.7.1- Lavage et fractionnement de l'extrait brut**

Les 45 g de l'extrait obtenu après une succession de lavage par le l'eau bouillante afin d'obtenir 6.5 g l'extrait brut (0) qui a un aspect noir très visqueux (figure 20).



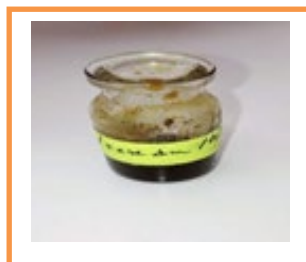
**Figure 20** : Extrait brut (0)

Le concentrât brut obtenu a été lavé dilué par de l'éther de pétrole afin d'éliminer les lipides et d'autres métabolites primaires éventuellement accrochés dans l'extrait. La quantité obtenue (6.2) a été répartie en deux parties ; l'une sera gardée pour une étude biologique alors que la seconde (2 g) est par 20 ml d'eau distillée et qui fera la tâche du fractionnement. Notons que 2.2 g de ce brut de départ sera gardé comme témoin ou pour une utilisation d'ordre générale. En rajoutant 20 ml du dichlorométhane à l'extrait aqueux, en tente à séparer les deux phases aqueuse et organique (dichlorométhanée) après une forte agitation manuelle dans une ampoule à décanter. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une phase organique incolore. Les phases dichlorométhanée réunies sont évaporées à vide afin d'obtenir 0.20 g d'un extrait de DCM (Figure 21).



**Figure 21** : Extrait de DCM (1)

La phase aqueuse séparée est traitée à nouveau par le même volume de l'acétate d'éthyle (20 ml) et en tente à séparer aussi les deux phases aqueuse et organique (phase d'acétate d'éthyle) après une forte agitation manuelle dans une ampoule à décanter. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une phase organique incolore. Les phases organiques d'acétate d'éthyle réunies sont évaporées à vide afin d'obtenir 0.40 g d'un extrait d'acétate d'éthyle (Figure 22).



**Figure 22** : Extrait d'acétate d'éthyle (2)

De la même manière on procède à l'obtention de 0.3 g l'extrait du butanol normal **Figure 23**.



**Figure 23** : Extrait de n -Bu OH (3)

La phase aqueuse restante sera concentrée à vide pour une éventuelle utilisation ultérieure.

### **III. 1.7.2 - Séparation par chromatographie sur colonne :**

En vue d'obtention une séparation sélective selon l'ordre de polarité, nous avons utilisé une colonne de silice dont les données sont suivantes :

Hauteur : 80 cm.

Diamètre : 1.5 cm.

Hauteur de la silice : 40 cm.

Mode de remplissage : à sec.



Ordre de polarité : à partir de l'hexane (moins polaire) vers le méthanol (plus polaire).



**Figure 24** : Montage d'une colonne chromatographique

0.59 g de l'extrait brut ont été rajoutés à une petite quantité de la silice puis séchés à l'air libre jusqu'à l'obtention d'un solide marron. Cette quantité est soigneusement introduite dans la colonne déjà préparée auparavant. L'ensemble (silice et extrait) ont été recouvert par du cotons. Nous avons procédé à une séparation par des solvants organiques tout en augmentant la polarité en partant de l'hexane vers le méthanol.

Malheureusement le travail a été échoué pour des raisons plus au moins acceptées tel que la qualité et la quantité des solvants, oxydation... La séparation au début été bien démarrer mais vus la mauvaise qualité de l'hexane et surtout le dichlorométhane, les extraits à étudier ont été colmaté et par suite le travail a été échoué.

### **III. 1.7.3 - Tentative de séparation par lavage**

Pour une tentative de récupération de la colonne, nous avons procédé à une série de lavage de l'extrait en étude par des solvants ou des mélanges de solvant selon une augmentation progressive de la polarité en partant de l'hexane. Le passage d'un solvant à un autre se fait lorsque la dernière opération de lavage est pratiquement neutre, c'est-à-dire la récupération du solvant incolore et sans obtention des spots par élution de la CCM.

Les résultats obtenus sont très encourageant et la séparation par colonne peut être remplacée par cette méthode dans le cas d'une obligation exigée par la mauvaise qualité des solvants, comme dans notre cas.

### III. 1.7.4 - Application de la méthode sur l'extrait brut

Nous avons choisi arbitrairement d'appliquer initialement le lavage sur le solide de l'extrait brut de départ "extrait méthanolique" vu sa richesse éventuelle en matière active. Environ 0.6 g de ce solide ont été dissoute dans un volume convenable de l'hexane, le mélange est agité magnétiquement jusqu'à une dissolution partielle probable de l'extrait figure 25



**Figure 25** : dissolution de l'extrait brut dans un solvant par agitation

La partie dissoute est séparée par décantation, cependant la partie restante de l'extrait est repris à nouveau par l'hexane. La coloration des fractions retenues est pratiquement incolore, signe d'inexistence probable de la matière active retenue. L'ensemble des fractions d'hexane sont regroupées et concentrées à vide.

Le solide retenu après décantation est traité à nouveau à plusieurs fois par un mélange hexane-DCM (50 – 50 %) et les fractions retenues sont regroupées et concentrées à vide.

**Tableau 2** : Fractions retenues et leurs codes

Code	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Solvants	Hexane	Hexane + DCM	Hexane +DCM	DCM	Hexane +DCM	DCM+ MeOH	DCM +MeOH	DCM+ MeOH	MeOH
Composition en volume	10	5+5	2.5+7.5	10	7.5+2.5	7+3	5+5	2.5+7.5	10
Couleur	incolore	Incolore	Incolore	Incolore	Jaune claire	Jaune foncée	blanche	Jaune claire	Jaune claire

**Figure 26** : Les fractions finales retenues

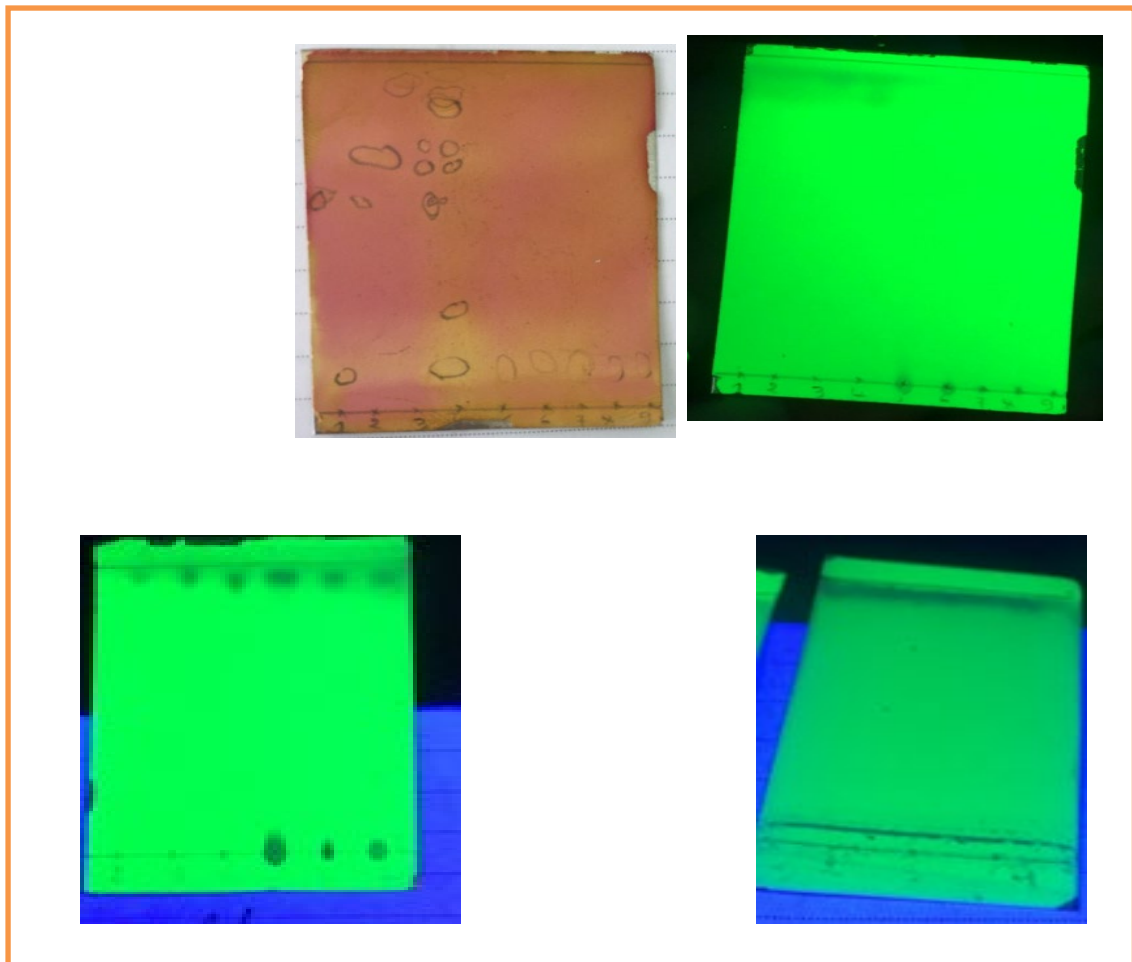
Le lavage se poursuit tout en augmentant la polarité vers le méthanol pur. Les fractions finales retenues sont illustrées dans la figure 26. Elles sont en nombre de neuf, leurs aspects sont dans le tableau suivant :

Les neuf fractions retenues ont été étudiées par chromatographie sur couche mince (CCM) pour connaître leur composition préliminaire. Mais auparavant il faut choisir le bon éluant pour avoir une bonne séparation.

### III. 1.7.5- Le choix de la phase mobile

Plusieurs systèmes de solvants sont exploités durant notre travail, le choix du système est basé sur ceux qui donnent les meilleures séparations (migrations).

Pour avoir une idée sur les bons systèmes de séparation et isolement. On a essayé plusieurs systèmes de solvants et on a gardé celui qui donne autant de taches. L'acétate d'éthyle pur est sélectionné comme meilleur éluant pour une séparation visible par l'ensemble des révélations utilisées dont l'image d'UV visible, solution de permanganate de potassium, la vapeur d'iode et le chauffage à haute température (Figure 27).



**Figure 27 :** Quelques images des éluants essayés au cours du travail

Les éluants sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 3** : Quelques éluants essayés au cours du travail

Eluant	Composition en solvant	Composition en volume (ml)	Observation
A	Hexane-DCM-MeOH	1-9-quelques gouttes	Aucune séparation remarquable
B	DCM-MeOH-hexane-	7+2+1	Aucune séparation Remarquable
C	Chloroforme-MeOH	3+2	Aucune séparation Remarquable
D	Acétate d'éthyle	10	Séparation visible
E	Hexane-acétate d'éthyle	4+6	Séparation visible

Signalons que plusieurs autres éluants ont été testés sans aucun résultat apte à analyser. Cela est peut-être dû à la mauvaise qualité des solvants, particulièrement la présence très probable de l'eau joue un rôle négatif dans la séparation.

### III. 1.7.6- Préparation de l'échantillon à analyser

#### a- Préparation de plaque CCM

Les plaques doivent être manipulées avec précaution, sans toucher la silice (manipuler par les côtés) et à ne pas utiliser des plaques abîmées.

Écrire au crayon à papier les références de l'échantillon et des témoins sous chaque marque de la plaque.

Les échantillons à analyser sont pris par un capillaire dans une plaque en céramique et dilué par le dichlorométhane jusqu'à l'obtention d'une solution convenable.

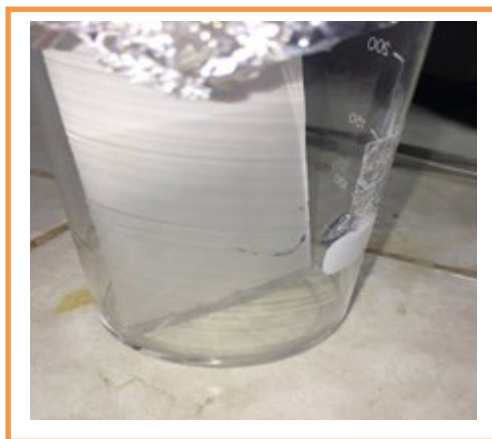
A l'aide d'un capillaire on dépose une petite quantité (un spot) sur la plaque CCM en laissant s'évaporer le solvant et mettre la plaque dans la cuve appropriée (éluant) (Figure 28).



**Figure 28** : préparation de plaque CCM

#### **b- Préparation de la cuve chromatographique:**

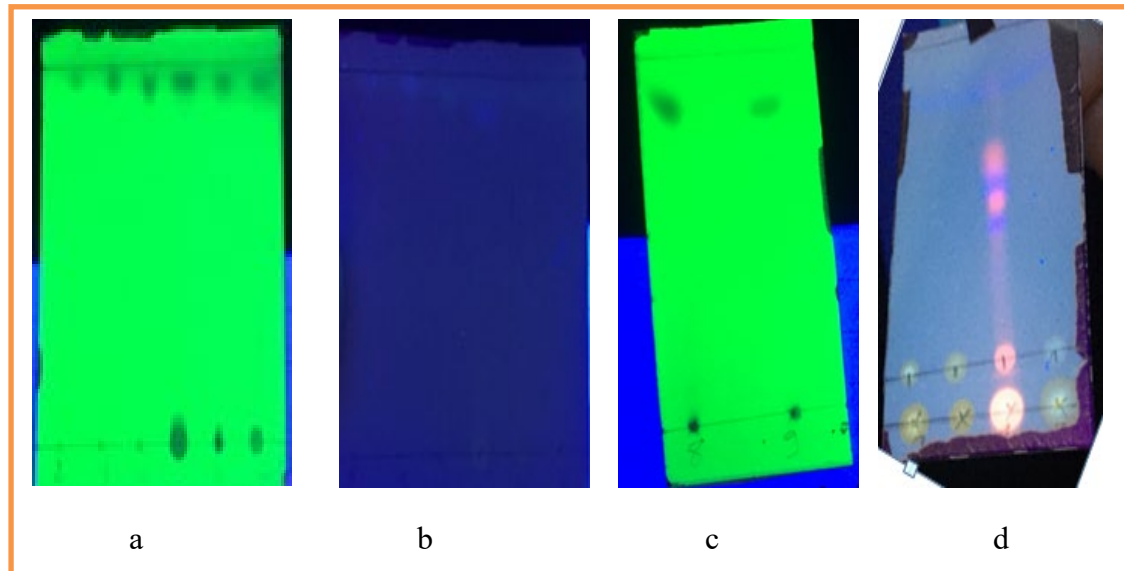
10 ml de l'éluant choisi sont soigneusement introduit dans la cuve chromatographique (bécher sans bec dans notre cas), fermée ensuite par du papier aluminium et gardée au repos pour avoir un bon équilibre thermodynamique entre l'acétate d'éthyle et ses vapeurs (Figure 30).



**Figure 29** : préparation de la cuve chromatographique

### III. 1.7.7- Etude des fractions retenues de l'extrait brut "méthanolique"

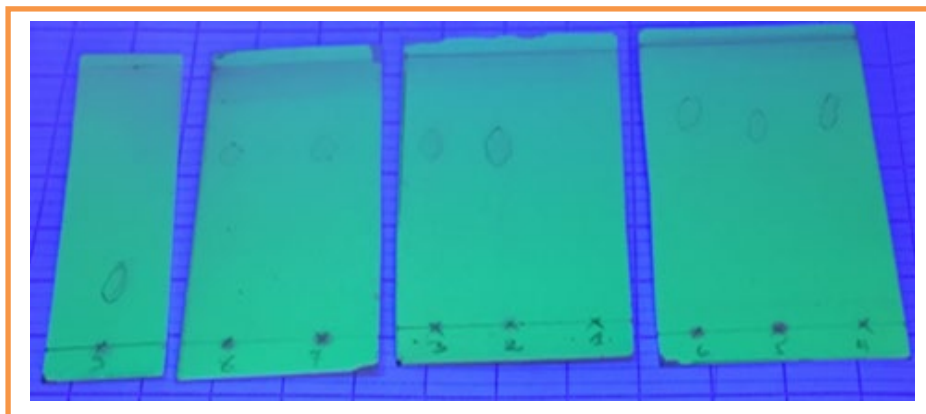
Nous avons procédé à une séparation chromatographique par CCM en se basant sur les données décrites précédemment. Les résultats obtenus sont mentionnés sur la figure suivante :



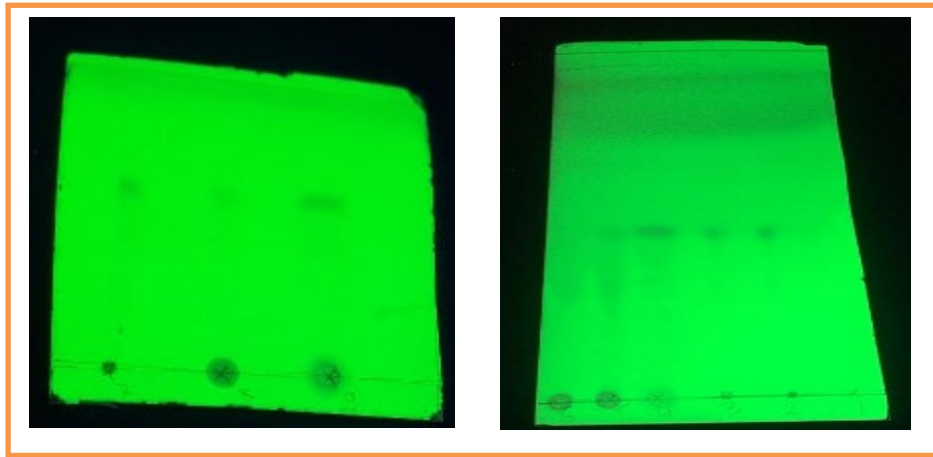
**Figure 30** : séparation des fractions retenues de l'extrait brut

- a- Les fractions 2-7 éluées par l'acétate d'éthyle 100 %
- b- Les fractions 2-7 éluées par l'acétate d'éthyle 100 % sous l'UV
- c- Les fractions 8 et 9 éluées par l'acétate d'éthyle 100 %
- d- Quatre fractions éluées par le mélange hexane-acétate d'éthyle (4-6) sous l'UV (fractions séparée par le DCM pur apparait bien séparée).

Le second éluant donnant un résultat significatif est celui du mélange hexane-DCM (5-2.5) dont les résultats de la séparation des neuf fractions retenues de l'extrait du départ sont illustrés dans la figure suivante.



**Figure 31** : séparation en utilisant le mélange hexane- DCM (5-2.5)



**Figure 32** : Séparation en utilisant le mélange hexane- acétate d'éthyle (4-6)

### III.2-Dosage des polyphénols

#### III.2.1-Principe

Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de Follin-ciocalteu. Ce dernier est composé d'un mélange jaune d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui se réduit lors de l'oxydation des polyphénols, en oxyde bleu de tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration est proportionnelle aux taux des composés phénoliques. [1]

#### III.2.2-Procédure expérimentale

A température ambiante, 500  $\mu$ L d'extrait dilué ont été ajoutés à 500 $\mu$ L d'eau distillé et 125 $\mu$ L du réactif de follin- ciocalteu (0.1N) et le tout est bien mélangé. Après 3minutes d'incubation, 1.25 ml d'une solution de monohydrate carbonate de sodium (7% p/v) a été ajouté et le tout est bien mélangé puis la solution est ajustée par 3 ml d'eau distillée. La préparation a été laissée incuber pendant 90 min à l'obscurité puis l'absorbance a été mesurée à une longueur d'onde 760 nm contre un témoin préparé suivant la même méthode sauf que l'extrait a été remplacé par le solvant. Une courbe standard est réalisée avec des différentes concentrations de l'acide gallique dans les mêmes conditions que le dosage des échantillons. La quantité des polyphénols totaux a été exprimée en équivalents milligramme d'acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g).



**Figure 33** : Réactif de Follin**Figure 34** : Préparation des échantillons**Figure 35** : Les solutions finales

### III.3- Activité biologique

#### III.3.1-Introduction

L'identification botanique de l'espèce a été réalisée au niveau du département de biologie végétale, Université Larbi Tébessi-Tébessa par notre enseignante Dr. Belhadj Mabrouka. La quantité récoltée initialement est de 10 kg. C'est une plante courte d'une longueur comprise entre 10 et 20 cm, elle a des grains noirs, de petits granulés, sa durée de vie n'est que de quatre mois au printemps et d'un mois d'été. Un échantillon de référence est conservé au niveau du laboratoire d'encadrement des étudiants de master chimie.

**III.3.2 - Matériel du laboratoire :**

Le matériel utilisé au cours de nos expériences est mentionné sur le tableau 04

**Tableau 4 :** Le matériel utilisé au cours des expériences

Boîtes pétries	balance électrique
Ecouillons	Spatule
Micropipette	Béchers
les cônes jaunes	Etuves
papier wattmans	tubes à essai
pic benzènes	stérilisateur
Cocotte	Pince
des bouteilles	

**III.3.3 - Réactifs chimiques et solvants :**

Alors que les produits nécessaires pour ce travail sont illustrés sur le tableau 4

**Tableau 5:** produits chimiques utilisés au cours des expériences

Muller Hinton	eau distillée
eau physiologiques	Méthanol analytique
l'eau javel	Sabouraud
Méthanol	

**III.3.4 - Souches bactériennes testées :**

La majorité des souches utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC). Le tableau suivant montre les souches microbiennes testées :

**Tableau 6:** les souches microbiennes testées

Souches microbiennes	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Référence	ATCC6633	ATCC25293	ATCC42238	ATCC25922	DSm1790	Isolat clinique	Isolat clinique
Code	Bacillus	SaR1	SALR3	EC25922	Microlut	F24	F36

Toutes ces souches sont identifiées et purifiées au laboratoire de microbiologie à l'université Larbi Tébessa-Tébessa. Elles ont été maintenues sous-culture sur des plaques de gélose Mueller Hinton (pH 7,4) et conservées à 4 ° C.

### III.3.5 - Caractéristiques des souches utilisées :

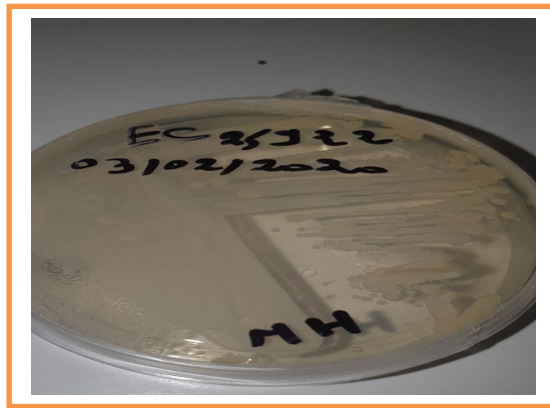
Le choix des souches micro-organiques à soumettre à l'expérience revêt une importance primordiale pour la détection des substances antibactériennes. Les bactéries choisies doivent en effet être très sensibles à la substance expérimentée, à faible concentration, elles doivent encore représenter un grand nombre de bactéries du même groupe, elles doivent enfin se prêter facilement à la culture en laboratoire. On utilise en général des bactéries saprophytes, cependant, pour conférer plus de valeur à l'étude, on peut aussi avoir recours à des bactéries pathogènes et à celles résistant à des antibiotiques courants [2]

### III.3.6 - Définitions des bactéries et les champignons utilisés

**III.3.6.1- *Escherichia coli* :** C'est une bactérie aérobie, c'est l'espèce la plus importante d'*Escherichia*. C'est un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae qui est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud. Ce microorganisme peut devenir pathogène et peut provoquer des infections urinaires, biliaires, intestinales et génitales [3,4]



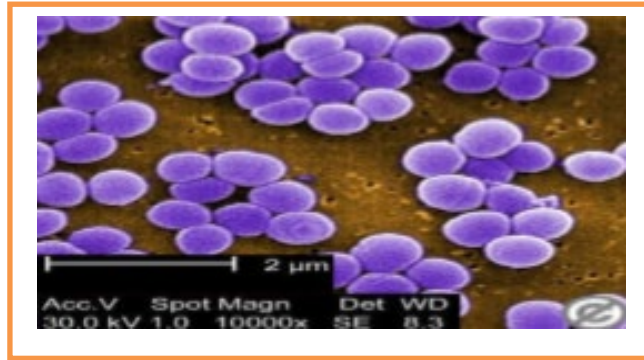
**Figure 36** : *Escherichia coli* observée au microscope électrique(Gx1000) [5]



**Figure 37** : *Escherichia coli* utilisée pour notre travail

**III.3.6.2-Staphylococcus aureus** : C'est une espèce de la famille de Micrococcaceae, constituée de cellules arrondies (cocci à gram positif) disposées en amas ou en grappes de raisin d'où le nom staphylos en grec. [6]

Ces bactéries survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions hostiles de l'environnement telles que la chaleur, la sécheresse ou la salinité de l'eau. Ces caractères ubiquitaire et saprophytique expliquent que ces germes soient aussi des commensaux occasionnels ou permanents de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux. Les *Staphylococcus aureus* peuvent causer des infections intestinales superficielles, infections des plaies et du sang, comme elles acquièrent facilement des résistances aux antibiotiques, en particulier à la méthicilline et à la pénicilline. [2,7]



**Figure 38** : aspect morphologique de la souche de *Staphylococcus aureus* observée au microscope électrique [8]



**Figure 39** : *Staphylococcus aureus* utilisée pour notre travail

**III.3.6.3-Salmonella:** La salmonellose (gastro-entérite à Salmonella) est causée par plus de 2000 sérovars de Salmonella ,provoquant des symptômes fréquents, dont les douleurs abdominales ,diarrhées , qui durent de quelques jours semaines .La salmonellose la plus fréquente est due à *Salmonella Typhimurium*. Elle rencontrée dans tous les pays elle est isolée chez l’homme , les animaux et dans l’environnement , elle occupe la première place dans l’étiologie des toxi-infections alimentaires . [9]



**Figure 40** : Observation au microscope électronique de *Salmonella typhi* et *Salmonella infantis* (Gx1000) [10]



**Figure 41 :** *Salmonella typhimurium* utilisée pour notre travail

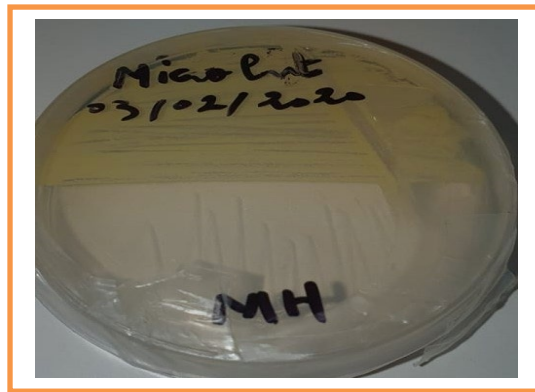
**III.3.6.4- *Bacillus* :** Le genre *Bacillus* renferme des germes telluriques aérobies stricts ou aéro-anaérobies, sporogènes, se présentant sous forme de bâtonnets à gram positif généralement mobiles. En dehors de *Bacillus anthracis*, les *Bacillus* sont habituellement considérés comme des germes de l'environnement et leur rôle en pathologie humaine est souvent négligé. En réalité, il est actuellement bien établi que certaines espèces de genre *Bacillus* peuvent être responsables chez l'homme de toxico-infections alimentaires ou plus rarement, d'infections opportunistes *Bacillus cereus* est le plus principal germe incriminé, mais d'autres espèces comme *Bacillus licheniformis* ou *Bacillus subtilis* peuvent également être mise en cause. [11]



**Figure 42 :** *Bacillus subtilis* utilisée pour notre travail

**III.3.6.5-*Micrococcus luteus*** : est une bactérie Gram-positif, sphérique, saprophyte faisant partie de la famille des Micrococcaceae<sup>2</sup>. Aérobie obligatoire, *M. luteus* est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. La bactérie peut aussi coloniser la bouche et des voies respiratoires supérieures humaines. Bien que *M. luteus* n'est pas pathogène et est considéré comme un contaminant naturel, cette bactérie pourrait être un pathogène émergent engendrant des maladies nosocomiales chez des patients immunodéprimés.

[12]



**Figure 43** : *Micrococcus luteus* utilisée pour notre travail

**III.3.6.6- *Candida albicans***: Actuellement, le genre *Candida* comprend 81 espèces de champignons levuriformes. *Candida albicans* est la plus souvent à l'origine de la plupart des manifestations pathologiques chez l'homme. On la rencontre habituellement, à l'état saprophytique, dans le tube digestif de l'homme et, par contiguïté, elle peut être retrouvée au niveau de la muqueuse vulvo- vaginal, (ou de la bouche). Mais on ne retrouve qu'exceptionnellement *Candida albicans* au niveau de la peau. Cette espèce est responsable de plus de 80 % des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées, infections superficielles muco- cutanées [13]

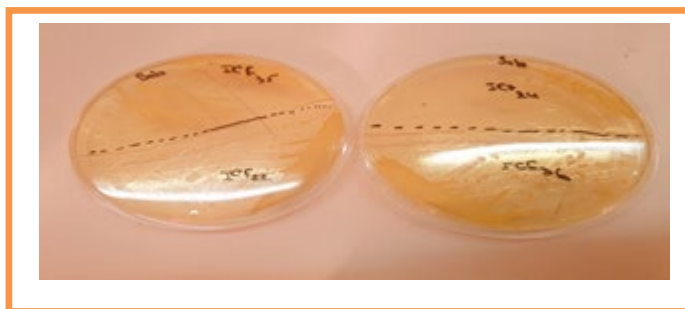


Figure 44 : *Candida albicans* utilisée pour notre travail

### III.3.7 -Activité antimicrobienne

#### III.3.7.1-Introduction

Les recherches sur les activités antimicrobiennes, les plantes médicinales, le mode d'action et la composition montrent que des nombreuses plantes de la famille de résédaceae sont connues par leurs propriétés antifongiques, anti-oxydantes et anti-inflammatoires.

#### III.3.7.2- Les extraits utilisés pour les tests des bactéries

Pour valoriser l'activité antibactérienne on utilise ( $\mu\text{l}/\text{disque}$ )

Tableau 7 : Les extraits utilisés avec leur code

Extrait	Me OH (brute)	DCM	Acétate d'éthyle	n-Bu OH
Code	0	1	2	3

#### III.3.7.3- Préparation des extraits

La première étape dans la préparation des extraits végétaux est le broyage du matériel végétal. Sous la forme broyée, la drogue présentera une plus grande surface de contact avec les solvants extracteurs, permettant ainsi d'améliorer le rendement des extractions. Une quantité du produit végétal a été extraite avec des solvants dans un ballon mono-col, placé dans le montage à reflux pendant 2 heures. Les extraits organiques ont été concentrés sous vide par un rotavapeur sous température spécifiée



pour chaque solvant. Après la concentration, ces extraits ont été séchés à l'air libre, ensuite stockés à basse température pour éviter toute dégradation, jusqu'au moment des tests antibactériens.

#### **III.3.7.4- Les micro-organismes**

Nous avons testé nos extraits sur plusieurs souches bactériennes pour l'évaluation de leur potentiel antibactérien puisque chaque bactérie possède un métabolisme particulier et des structures cellulaires.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a été effectuée par la méthode de diffusion de disque où les disques sont imbibés de 15 µl de chaque extrait.

#### **III.3.8 -Activité antibactérienne**

##### **III.3.8.1-Préparation du milieu de culture**

Le milieu Muller-Hinton c'est Le milieu de culture approprié à cette étude sa préparation est comme suit :

On Dissout 38 g de la gélose Muller-Hinton dans un litre d'eau distillée.

On a Fait bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, puis on fait auto-claver pendant 20 minutes à 121°C.

En fin l'écoulement du milieu dans les boites de Pétri.

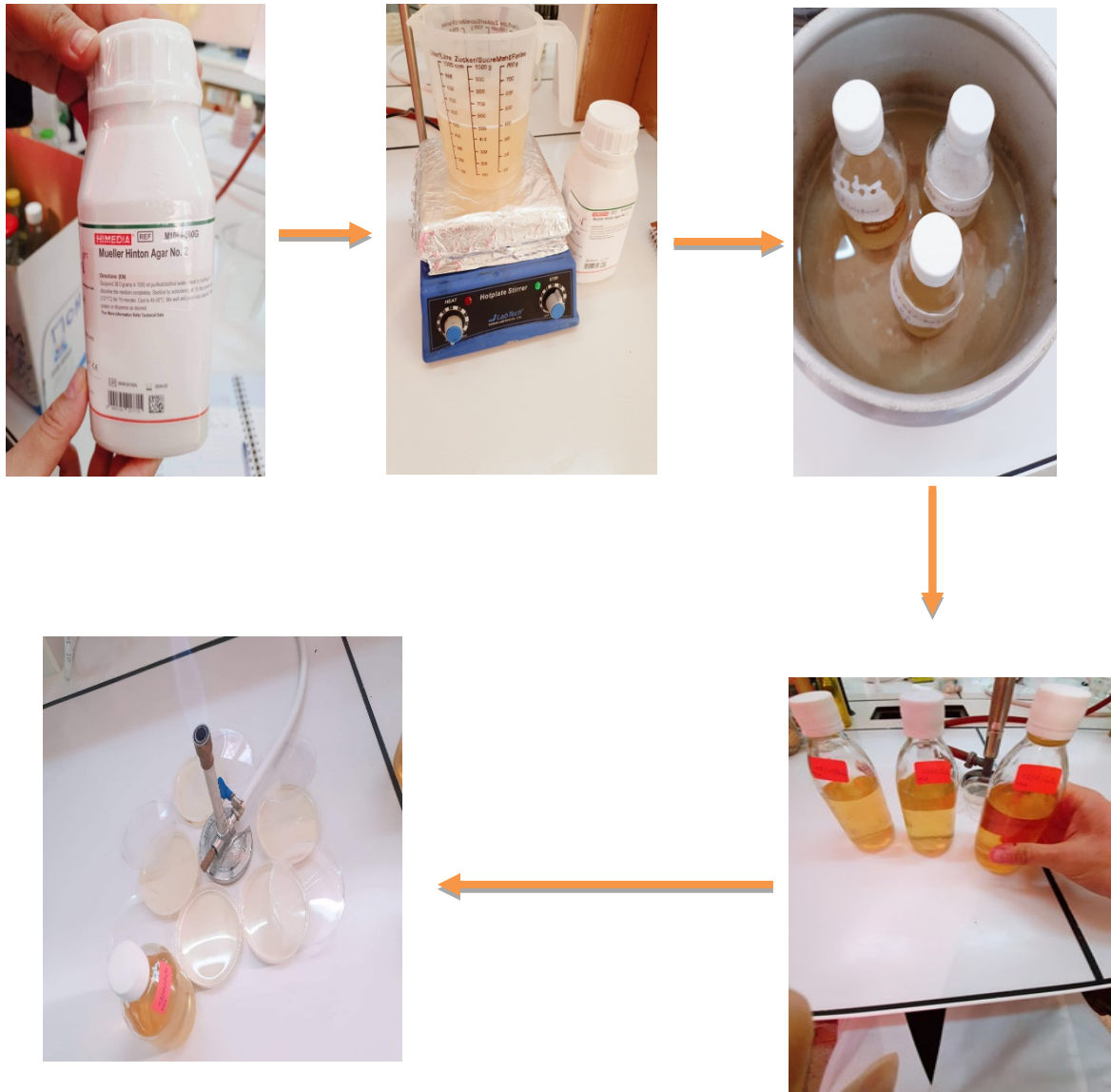


Figure 45 : Préparation du milieu de culture

### III.3.8.2-Stérilisation du matériel

Les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions bactériennes et papier Wattman ont été stérilisés dans un autoclave à 121°C pendant 15 minutes puis enrobés dans du papier aluminium.

### III.3.8.3-Préparation des dilutions des extraits de *Réséda alba* L.

Les extraits de *Réséda alba* L. ont été dissous dans le méthanol analytique pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, sachant que la concentration de la solution mère de chaque extrait est de 1mg/ml.

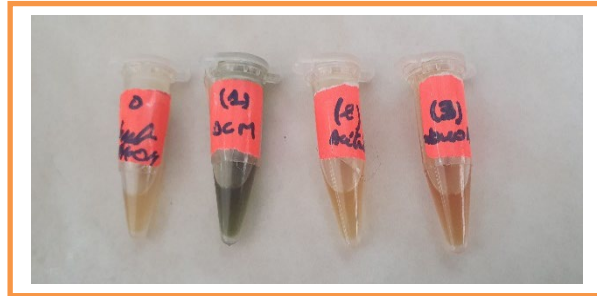


Figure 46 : Extraits à concentration (10 mg/ml)

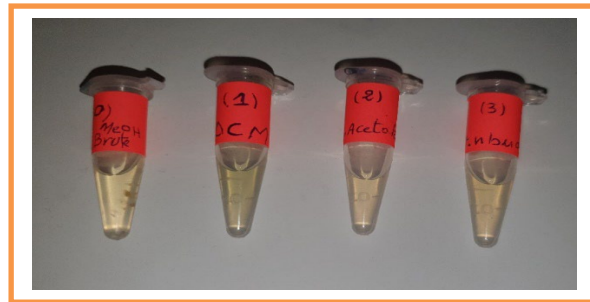


Figure 47 : Extraits à concentration (2 mg/ml)

### III.3.8.4-Préparation de l'inoculum

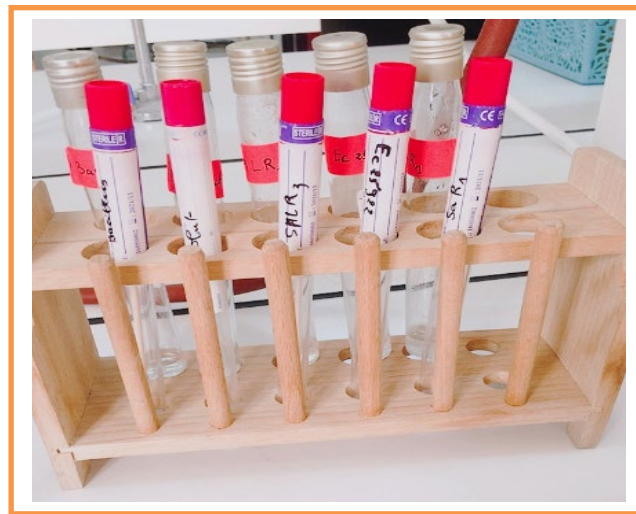
Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 10 ml d'eau distillée stérile, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Ferland ou à une DO de 0.08 à 0.10 à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. [14]



**Figure 48 :** Préparation de l'inoculum

### III.3.8.5- Les suspensions des souches bactériennes testées :

Les souches bactériennes testées sont illustrées sur la figure suivante :

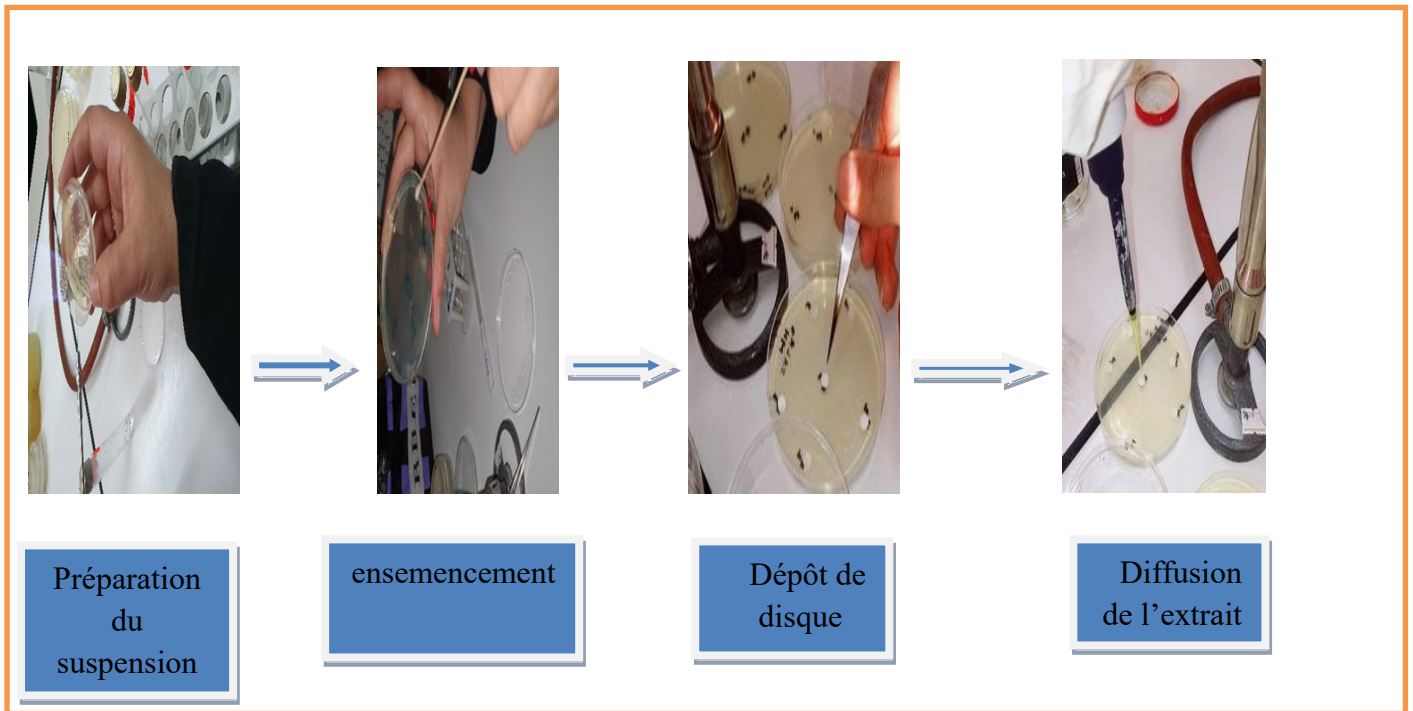


**Figure 49 :** Les suspensions des souches bactériennes testées

### III.3.8.6- Ensemencement et dépôt des disques :

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes Pétri. On a trempé un écouvillon dans la suspension bactérienne, puis en pressant fortement sur la paroi interne du tube pour l'essorer, on commence de frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. On répète l'opération deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

Une fois l'ensemencement est fini nous passons à l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche. Les disques imprégnés d'extraits sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 24 heures à 37°C.



**Figure 50** : Ensemencement et dépôt des disques

### III.8.7- Lecture des antibiogrammes

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

#### Détermination des CMI et CMB

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), Il s'agit de déterminer les plus petites concentrations aux quelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) un prélèvement à l'anse est réalisé autour de chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose Mueller-Hinton. La boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C.

Lecture des résultats :

- Les extraits naturels ou un pouvoir actif contre la bactérie si le diamètre d'inhibition est supérieur à celui du disque.
- La présence d'une zone claire autour du disque est un test positif.
- L'absence de cette zone claire autour du disque est un test négatif.
- Les conditions opératoires pour cette étude ont été effectuées à 22 degré Celsius.

### **III.3.9 -Activité antifongique**

Pour les champignons on a fait les mêmes opérations, on utilise le milieu sabouraud comme milieu de culture dans ce cas.

Les champignons sont activés pendant 7 jours dans des boites de Pétri à une température de 28°C avant le test. Après l'incubation, l'inoculum des champignons est préparé et l'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boites de Pétri coulés qui contient du Sabouraud.

La lecture des antibiogrammes est faite après 48 heures d'incubation à 37° C.

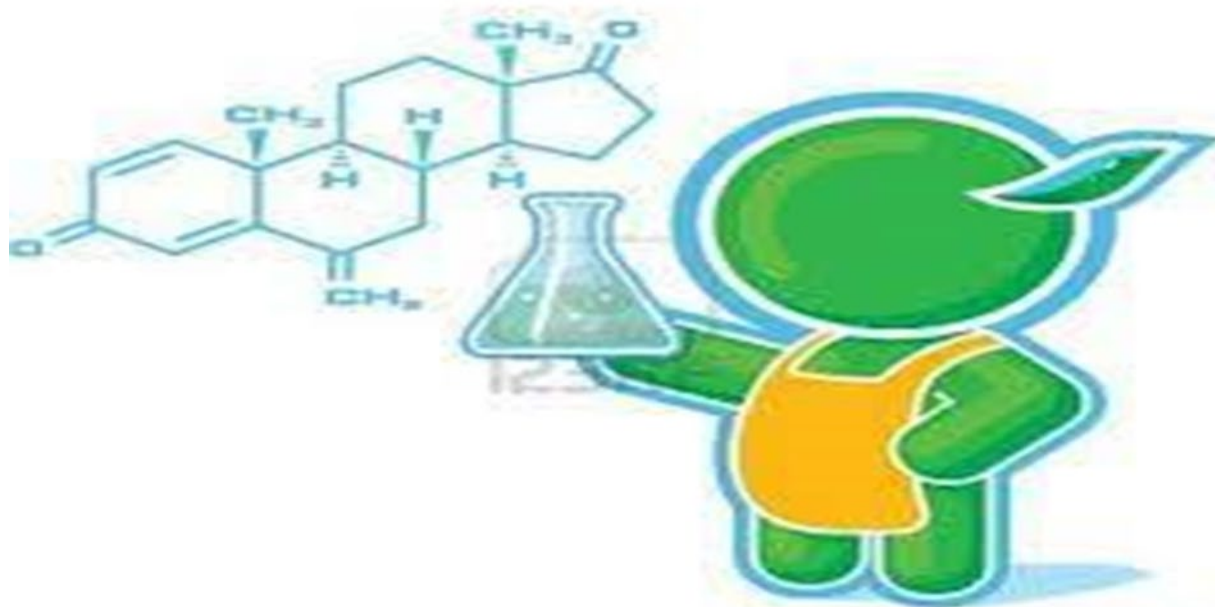


**Figure 51** : Ecoulement du Sabouraud

### **Listes des références bibliographiques**

[1] J. Ribéreau-Gayon et al, (1982), Compositions phénoliques. In Traité d'œnologie, sciences et techniques du vin, pp 477-499.

- [2] L. Avril J et al, (2000), Bactériologie Clinique, 3<sup>ème</sup> Edit. Ellipses, Paris.
- [3] P. Flandrois J, (1988), Bactériologie médicale pratique, Edit. Monique Chomarat, p 320.
- [4] H. Leclerc, (1993), Les Escherichia coli responsables de diarrhée, Arch. Fr, Pediat, Vol 50, pp 57-67,
- [5] P. Goubau, (2000), Repères en microbiologie, Édit. Garant, P 391.
- [6] H. Leclerc, (1995), Microbiologie générale, Edit. Doin, Paris.
- [7].M. Ibiri P, (2005), Assainissement microbiologique de l'aire et des systèmes de ventilation au moyen des huiles essentielles, Thèse de doctorat. Ecole polytechnique fédérale, Lausanne (Suisse).
- [8] G. Leyral et al (2007), Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires, Wolters Kluwer France, P 287.
- [9] D. Avril (1992), Biopréservation by lactic acid bacteria. Antonie leeuwenhoek. J, vol 70, pp 331-345.
- [10] C.E. Prescott et al (2003), Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb, Acta Facultatis Pharmaceuticae Universitatis Comenianae, vol 55, pp 64-72.
- [11] B. Gaillard et al (1989), Curr Microbiol, vol 19, pp 103-107.
- [12] C. L. Greenblat et al, (2004), Micrococcus luteus – Survival in Amber, Microbial Ecology, pp 120-127.
- [13] J. Delorme et al, (1997), Mycologie médicale, Edit, Centre collégial de développement de matériel didactique, Mont-Royal Québec, p 184.
- [14] A. Harrar, Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L, these de Magister en Biochimie et physiologie expérimentale université Ferhat Abbas Sétif, p 29.



## **Chapitre IV : Résultats et discussion**



## Chapitre IV : Résultats et discussion

### IV.1-Partie chimique

#### IV.1.1-Rendement des extractions

Les rendements de quatre extraits sont exprimés en pourcentage de masse d'extrait par rapport à la masse de matière végétale sèche du départ (500 g) issue de partie aérienne (tiges, feuilles, fleurs et grains) de la plante verte récoltée. Le tableau 07 illustre leurs rendements d'extraction. La formule mathématique utilisée pour les calculs est la suivante:

$$R = \frac{m_e}{m_p} \cdot 100$$

Avec:  $R$  = rendement d'extraction

$m_e$  = masse de l'extrait

$m_p$  = masse de la plante sèche (500 g)

**Tableau 08 :** Rendement d'extractions des extraits de la plante *Résida alba L.*

Extraits	Extrait brut	Extrait de DCM	Extrait d'acétate d'éthyle	Extrait de n-BuOH
Masse de l'extrait (g)	6.5	0.40	0.80	0.7
Rendement (%)	1.3	0.08	0.16	0.14

Nous avons remarqué que le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait brut (1.3 %), suivi par l'extrait d'acétate d'éthyle (0.16 %), l'extrait du butanol normal en troisième rang avec un rendement de 0.14 % et finalement l'extrait du dichlorométhane avec un rendement plus au moins faible (0.08 %).

Ce résultat montre clairement qu'une partie importante des métabolites secondaires se trouve dans la phase aqueuse restante qui sera utilisée ultérieurement. La quantité de ces métabolites supposée gardée dans la phase aqueuse peut être calculée par la formule suivante:

$$m_{aq} = m_{eb} - (m_{DCM} + m_{ae} + m_{nb})$$

Avec:  $m_{aq}$  = masse de l'extrait aqueux

$m_e$  = masse de l'extrait brut

$m_{DCM}$  = masse de l'extrait de DCM

$m_{ae}$  = masse de l'extrait d'acétate d'éthyle

$m_{nb}$  = masse de l'extrait de n-BuOH

Donc:  $m_{aq} = 6.5 - (0.40 + 0.80 + 0.70) = 4.6$  g avec un rendement  $R = 0.92$  %

On peut considérer que le résultat est acceptable parce que les métabolites secondaires ne sont présents qu'en très petites quantités dans les plantes médicinales malgré que la majorité de la matière active reste encore dans l'extrait aqueux non étudié.

Vu ce résultat, une étude chimique, électrochimique et biologique devient importante pour cet extrait restant.

#### IV.1.2- Choix des éluants

Les solvants utilisés pour la séparation et pour l'élution sont des solvants d'ordre technique plutôt des solvants récupérés, ce qui nécessite une distillation voire même une bi-distillation. Les solvants sont d'avantage humide après la bi-distillation, cela est bien visible dans la qualité des mélanges des éluants testés.

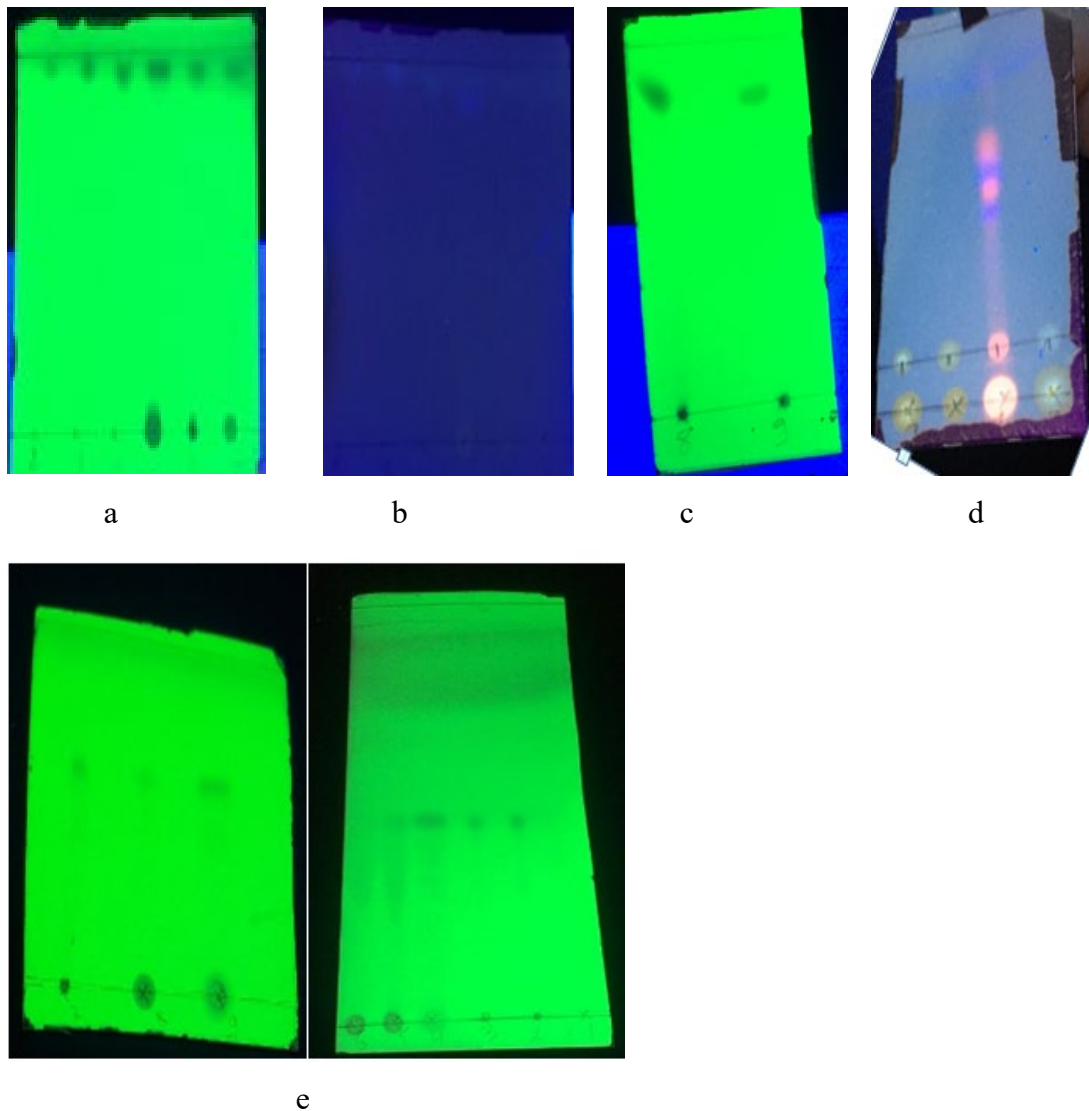
Nous avons testé arbitrairement un certain nombre de mélange mono, bi voire tri-solvant dont l'image Hexane-DCM-MeOH (1-9-quelques gouttes), DCM-MeOH-hexane- (7+2+1), Chloroforme-MeOH (3+2), Acétate d'éthyle (10), Hexane-acétate d'éthyle (4+6). Seuls le mélange hexane –acétate d'éthyle (4+6) et l'acétate d'éthyle (100 %) ont donné des séparations visibles par de différentes révélations, comme le montre le tableau 02 et les figures des CCM étudiés.

L'utilisation des solvants analytiques peut amener cette étude à une séparation nettement visible vu l'absence de l'humidité des solvants qui provoque un facteur négatif et comme résultats une séparation devient délicate.

#### IV.1.3 – séparation par CCM

##### IV.1.3.1 – Discussion des résultats obtenus pour l'extrait brut "méthanolique"

Seuls les deux éluants, acétate d'éthyle et le mélange hexane-acétate d'éthyle (4-6) sont retenus pour la discussion car les autres éluants n'ont donné aucune séparation significative.



**Figure 52:** Séparation des fractions retenues de l'extrait brut

- a- Les fractions 2-7 éluées par l'acétate d'éthyle 100 %
  - b- Les fractions 2-7 éluées par l'acétate d'éthyle 100 % sous l'UV
  - c- Les fractions 8 et 9 éluées par l'acétate d'éthyle 100 %
  - d- Quatre fractions éluées par le mélange hexane-acétate d'éthyle (4-6) sous l'UV (fraction séparée par le DCM pur apparait bien séparée)
  - e- Toutes les fractions éluées par le mélange hexane-acétate d'éthyle (4-6)
- **Plaques a et b: Les fractions 2-7 éluées par l'acétate d'éthyle 100 %**

Les six fractions ont donné des spots pratiquement du même rapport frontal ( $R_f$ ) = 0.91, cela signifie probablement le même produit se présente dans les six fractions. La même plaque révélée par l'UV montre un spot du rapport frontal

inférieur aux autres. La même fraction (5) apparaît comme spot double qui peut être séparé par une chromatographie bidimensionnelle. Les taches visibles sur les deux plaques peuvent présenter un ensemble de corps actifs.

- **Plaque c: Les fractions 8 et 9 éluées par l'acétate d'éthyle 100 %**

Ces deux fractions ont donné deux grandes tache d'un rapport frontal commun, ni au moins la tache de la fraction 8 apparaît très grande ce qui indique la présence d'un ensemble de produit du même rapport frontal ( $R_f$ ) = 0.88.

- **Plaque d: Les fractions 2-4 éluées par hexane-acétate d'éthyle (4-6)**

La révélation par UV de cette plaque a montré la présence d'une succession de produits dans la fraction retenue par lavage au dichlorométhane pur. Les rapports frontaux de ces produits allant de 0.09 jusqu'à 0.79. Les spots les plus visibles ont des rapports frontaux et des couleurs différents sont mentionnés dans le tableau ci-dessous:

**Tableau 09** : résultats de la fraction 4 de la plaque d

Spots	1	2	3	4
$R_f$	0.42	0.53	0.57	0.68
Couleur	Violette	Rose	violette	Rose

La couleur rose apparaît dans certaines taches indique la forte probabilité de la présence des coumarines et /ou des flavonoïdes dans la plante *Réséda alba* L. alors que la couleur violette montre aussi la présence d'autres familles telles que les tanins et alcaloïdes.

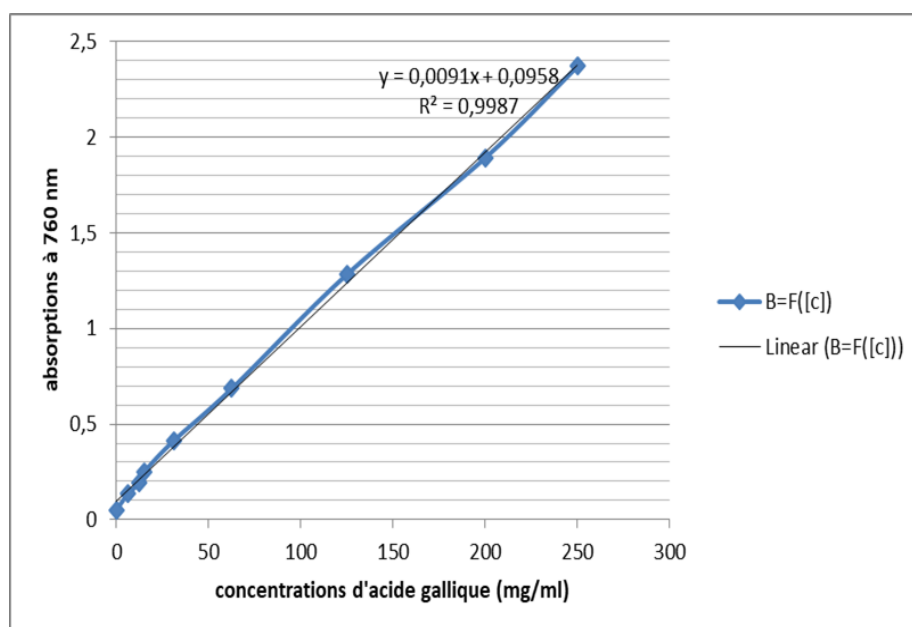
- **Plaques e: Les fractions 1-9 éluées par hexane-acétate d'éthyle (4-6)**

Ces deux plaques montrent clairement la richesse de l'extrait brut en corps actifs, particulièrement les fractions séparées par le dichlorométhane pur, le mélange hexane-DCM (7.5-2.5) et le mélange DCM-méthanol (7-3). Cette plaque CCM montre une succession de produit allant jusqu'à un  $R_f$  = 0.68.

Malheureusement l'étude chimique a été interrompue par la pandémie suivie par le confinement de covid-19. Les extraits séparés à partir du brut peuvent présenter un nombre de produits actifs nettement inférieur à celui du brut vu la séparation sélective par les solvants.

#### IV.2-Taux des polyphénols totaux

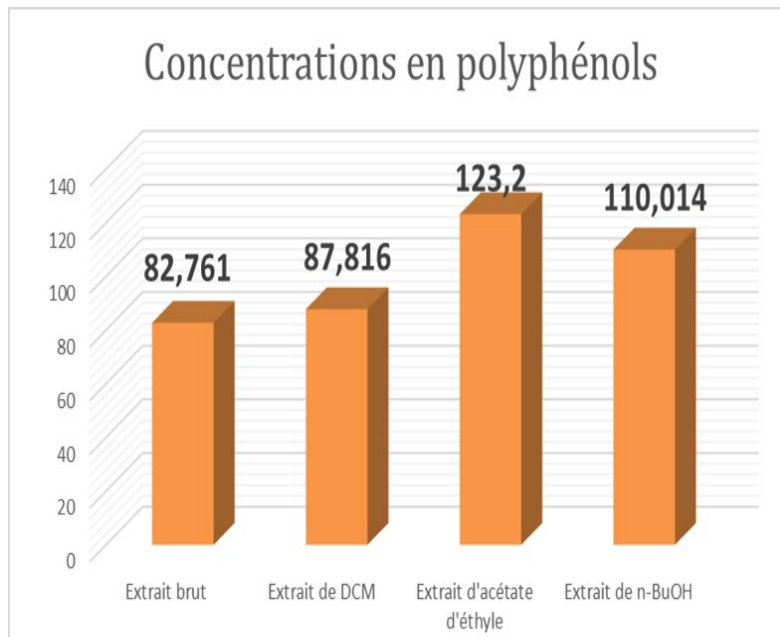
La teneur en composés phénoliques totaux des extraits de la plante étudiée a été trouvée grâce à une courbe d'étalonnage réalisée avec un extrait de référence (acide gallique avec les mêmes concentrations utilisées pour les extraits étudiés). Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  équivalent en acide gallique par mg d'extrait. La courbe d'étalonnage est établit avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,9987$  (Figure 53).



**Figure 53** : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

Le taux de polyphénols totaux dans nos extraits a été calculé à partir de la courbe d'étalonnage linéaire ( $y = ax + b$ ) établie avec des concentrations précises d'acides gallique Comme standard de référence, dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les absorbances des extraits : extrait brut (0.754), extrait de DCM (0.800), extrait d'acétate d'éthyle (1.122) et l'extrait de n-BuOH (1.002).



**Figure 54** : Teneurs des extraits de *Resida alba* L. (en µg EAG/mg) en composés phénoliques

Dans notre étude les résultats obtenus montrent que les extraits bruts et de DCM de *Resida alba* L. présentent des teneurs proches des composés phénoliques totaux (82.761,87.816 µg EAG/mg), cependant l'extrait d'acétate d'éthyle présente la teneur la plus grande (123.2 µg EAG/mg) suivie par l'extrait de n-BuOH (110.014 µg EAG/mg).

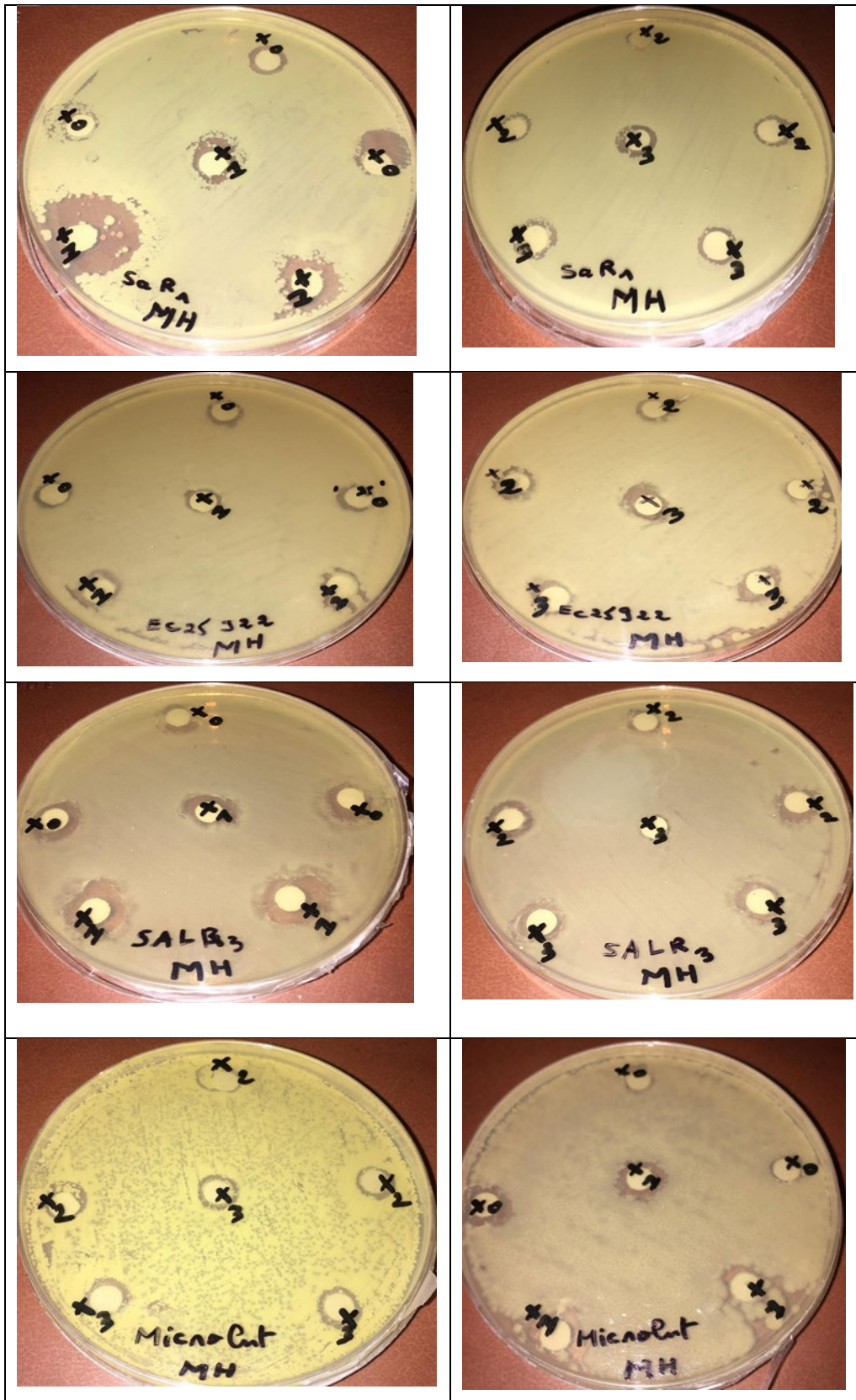
#### IV.3- Activité antimicrobienne

Nous avons étudié in-vitro le pouvoir antimicrobien des extraits isolés de *Resida alba* L. par la méthode de diffusion des disques sur un milieu gélosés solides, Mueller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les champignons. L'activité antimicrobienne des extraits a été testé vis-à-vis aux 7 germes pathogènes dont cinq (5) bactéries Gram + et Gram – et deux (2) champignons à savoir deux levures.

La lecture des résultats a été faite :

- Après 24 heures d'incubation à 37°C, pour les bactéries.
- Après 48 heures d'incubation à 37°C, pour les levures

Les figures suivantes illustrent les résultats obtenus :





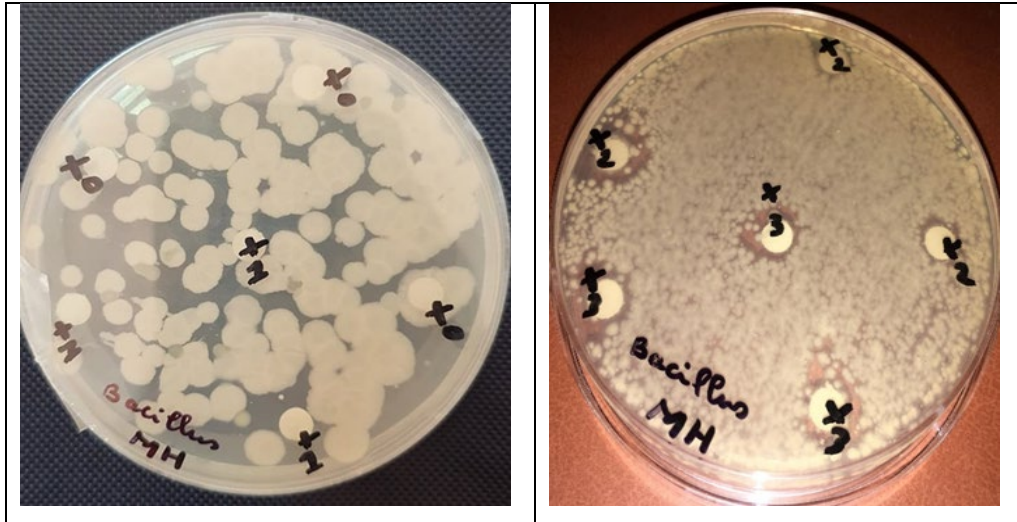


Figure 55 : Effet inhibiteur des extraits sur les bactéries

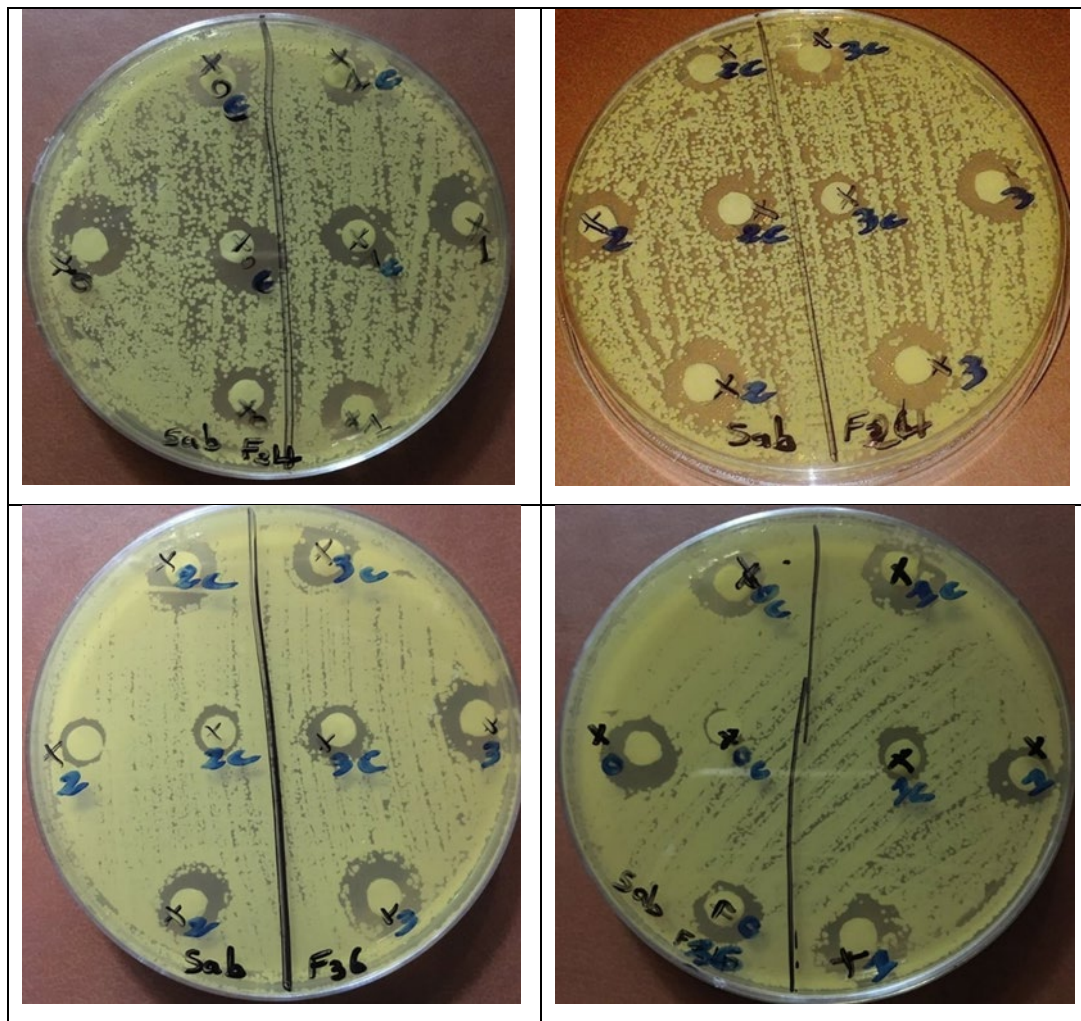


Figure 56 : Effet inhibiteur des extraits concentrés et dilués sur les champignons



Cette activité des extraits a été estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant ces extraits.

Ces résultats sont illustrés sur les tableaux suivants :

**Tableau 10** : Résultats d'activité antibactérienne

Souches Bactériennes	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus Subtilis</i>		<i>Microlute</i>		<i>Salmonella typhi</i>	
	ZI (mm)	Degré de sensibilité	ZI (mm)	Degré de sensibilité	ZI (mm)	Degré de sensibilité	ZI (mm)	Degré de sensibilité	ZI (mm)	Degré de sensibilité
(0)	9	Moyennement sensible	12	Très sensible	-	Sensibilité limitée	10	Moyennement Sensible	12	Très Sensible
(1)	11		14		-		12		15	
(2)	10		10		10		10		12	
(3)	10		11		10		10		12	

**Tableau 11** : Résultats d'activité antifongique

Champignons	<i>Candida albicans</i> (F24)		<i>Candida albicans</i> (F36)	
Extrait Concentré/dilué	Zone d'inhibition (mm)	Degré de sensibilité	Zone d'inhibition (mm)	Degré de sensibilité
(0)	15	16	13	14
(1)	13	15	15	16
(2)	15	17	13	15
(3)	13	15	13	16

- (0) : extrait brut Me OH
- (1) : extrait DCM
- (2) : extrait acétate d'éthyle
- (3) : extrait n-BuOH

#### IV.3.1-Discussion d'activité antibactérienne

Les souches de bactéries à Gram + et à Gram – (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus Subtilis*, *Microlute*, *Salmonella typhi*) ont montré des sensibilités et des zones d'inhibition différentes.

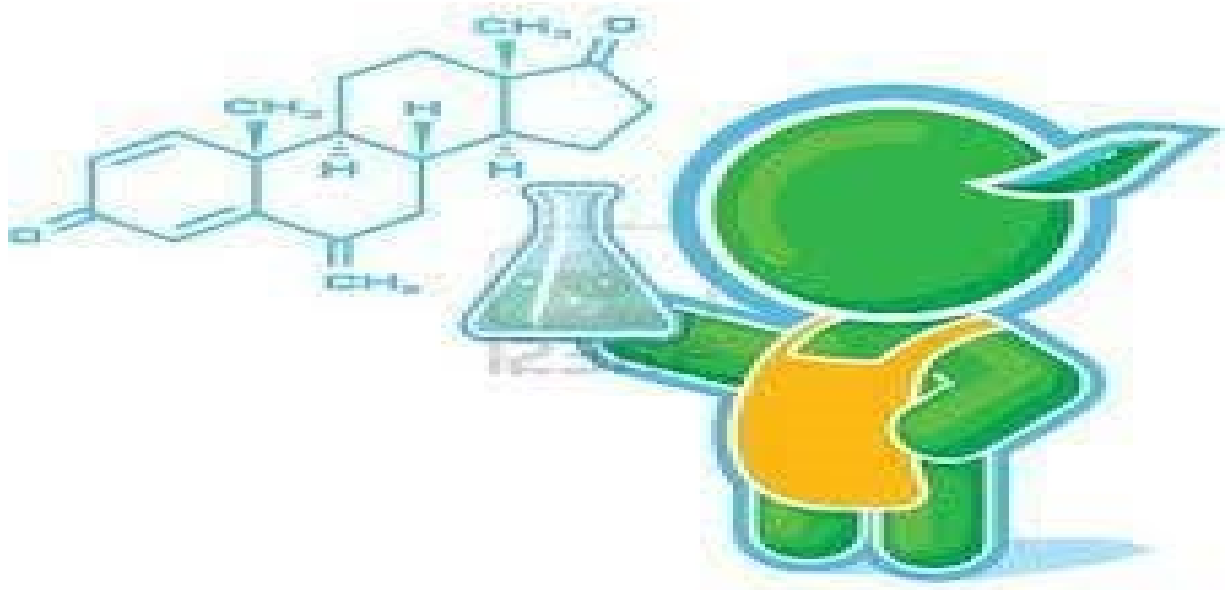
Selon les valeurs des diamètres des zones d'inhibition, les résultats de l'étude effectuée sur *Résida alba* L., montrent que tous les extraits de la plante dont la concentration est 2 mg/ml ont été très actifs sur *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Microlute*, *Escherichia coli* et plus au moins actifs sur *Bacillus*

- L'extrait brut a eu un effet inhibiteur significatif sur toutes les bactéries testées, sauf la *Bacillus*. L'activité de l'extrait brut la plus élevée est contre *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus* avec des zones d'inhibition similaires (12 mm), puis *Microlute* et *Escherichia coli* respectivement (10mm et 9 mm) et n'a aucun effet inhibiteur sur la *Bacillus*.
- Nous avons remarqué que l'extrait DCM est actif contre *Salmonella typhi* avec zone d'inhibition de 15 mm et *Staphylococcus aureus* avec une zone d'inhibition de 14 mm puis *Microlute* (12mm) et *Escherichia coli* (11 mm) mais il n'avait pas d'activité sur la bactérie *Bacillus*.
- L'extrait d'acétate d'éthyle est actif sur toutes les bactéries *Microlute*, *staphylococcus aureus*, *Bacillus* et *Escherichia coli* avec des mêmes zones d'inhibition (10mm), son activité la plus élevée est contre *salmonella typhi*.
- L'extrait n-butanol actif contre *Salmonella typhi* avec une zone d'inhibition de 12 mm et *Staphylococcus* avec une zone d'inhibition de 11 mm et des zones d'inhibition similaires (10mm) pour l'*Escherichia coli*, *Microlute* et *Bacillus*.

#### IV.3.2-Discussion d'activité antifongique

D'après le tableau on voit que les extraits dilués (avec concentration 2mg/ml) sont plus actifs que les extraits concentrés (avec concentration 10mg/ml) contre les deux levures, tel que :

- L'extrait d'acétate d'éthyle dilué a un effet inhibiteur contre F24 et F36 avec des zones d'inhibition respectivement (17mm, 15mm) par contre l'extrait d'acétate d'éthyle concentré a une activité moins élevée que le dilué avec des zones d'inhibition (15mm et 13mm) donc son activité la plus élevée est contre la levure F24
- L'extrait brut dilué inhibe F24 (16 mm) plus que l'extrait brut concentré (15mm), les mêmes observations à propos la levure F36.
- On remarque aussi que l'extrait DCM dilué inhibe la levure F24 (15mm) par rapport à l'extrait du DCM concentré qui a une zone d'inhibition (13 mm). Les mêmes observations à propos de F36, cela indique que son influence sur cette dernière levure est plus que la première.
- Nous avons remarqué que l'extrait n-butanol dilué inhibe la levure F24 (15mm) plus que l'extrait concentré avec zone d'inhibition 13mm, les mêmes remarques à propos la levure F36.



**Conclusion générale**

## **Conclusion générale**

Ce modeste travail est orienté en vers l'étude qualitative et quantitative des métabolites secondaires de l'espèce endémique *Résida alba* L. appartenant à la famille des résédaceae, employée en Algérie grâce à ses propriétés thérapeutiques. La plante est récoltée de la région de Tébessa, plus exactement, la zone de Kaf El-Essa dans les montagnes d'Al-Anwal.

Après une extraction solide-liquide par un solvant hydrométhanolique, l'extrait brut obtenu est fractionné par une série d'opérations chromatographiques liquide-liquide afin d'obtenir quatre extraits fins (extrait méthanolique, extrait de DCM, extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de n-BuOH).

Par la mise en place des techniques chromatographiques de séparation et de purification et des techniques physicochimiques (UV) et par comparaison avec les données de la littérature, nous avons pu confirmer de la présence de certains corps actifs appartenant particulièrement aux coumarines et aux flavonoïdes.

Au cours de cette étude nous avons réalisé également un test antimicrobien vis-à-vis à 5 bactéries et 2 champignons pathogènes. Les résultats microbiologiques ont montré que les extraits de *Résida alba* L. (extrait brut, extrait de DCM, extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait de n-BuOH) ont une action antimicrobienne, sur les deux champignons et les espèces bactériennes testées, remarquable avec des diamètres de zone d'inhibition différents ce qui vérifie leurs sensibilités à ces quatre extraits, sauf que l'extrait brut et l'extrait de DCM n'ont pas des effets visibles sur la bactérie *Bacillus* à cause de sa résistance.

Malheureusement notre étude est interrompue par la pandémie suivie par le confinement de covid-19. En perspective, nous comptons compléter l'étude déjà planifiée sur la plante de *Résida alba* L. ultérieurement.