

N°d'ordre : 70/2012-M/SB

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE « HOUARI BOUMEDIENE »
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de MAGISTER

EN SCIENCES BIOLOGIQUE

Spécialité : Biologie et Physiologie Cellulaire et Moléculaire

Par Arban leila née Benazzi

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA BIODIVERSITE PAR LES COMPOSES
PHENOLIQUES DE *Aerva javanica* DE LA REGION DE TAMANRASSET.
RECHERCHE DE QUELQUES ACTIVITES BIOLOGIQUES.**

Soutenu publiquement le 20/06/2012 devant le Jury composé de :

<i>Mme N. Bouguedoura</i>	<i>Professeur à l'USTHB</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme S. Ouafi</i>	<i>Maitre de conférences / A, à l'USTHB</i>	<i>Directrice de Mémoire</i>
<i>Mme D.Chabane</i>	<i>Maitre de conférences /A, à l'USTHB</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme A.Belkebir</i>	<i>Maitre de conférences / A, à l'USTHB</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Mme N.Benchemame</i>	<i>Docteur vétérinaire, au CRD Saidal</i>	<i>Membre invité</i>

Dédicaces

A mes très chers parents pour tous les efforts fournis, leurs encouragements, leurs affections et pour leur soutien moral ainsi que financier et surtout pour ma mère adorée que je remercie d'avoir gardé et pris soin de mon petit bout de chou pendant mon absence.

A mes très chers beaux parents pour leurs encouragements, tous les efforts fournis pour le bon déroulement et la réussite de ce travail.

A mon cher époux Ahmed pour sa compréhension, tous ses encouragements son entière disponibilité son soutien tant moral que matériel.

A mon fils chéri Mohamed Mehdi pour son courage et sa patience d'avoir supporté mon absence à l'occasion de ce Magister.

A mes deux frères Zouhir et Samir pour toute l'affection et le soutien moral.

A mes belles sœurs Dalila et Sarah.

A mon beau frère Idir.

A ma grand-mère adorée Batoul pour toutes ses prières.

Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés au **Laboratoire de recherche sur les zones arides LRZA à la Fac centrale d'Alger**

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet national de recherche entre **LRZA** et **Le CRD Sidal** sur les plantes médicinales du Hoggar.

Les tests pharmacologiques ont été faits au Laboratoire du Centre de recherche de Sidal **CRD**. Une partie de l'activité anti microbienne a été traitée au laboratoire de microbiologie au **LRZA** et une autre partie a été traitée au laboratoire de microbiologie de Sidal.

Je remercie chaleureusement le Professeur **Nadia Bouguedoura** directrice du Laboratoire LRZA de m'avoir accueillie dans son équipe avec gentillesse et bienveillance, pour l'honneur qu'elle me fait de présider ce Jury de Thèse.

J'exprime ma profonde gratitude et mon attachement à Mme **Saida Ouafi**, qui m'a confié ce sujet. Ainsi que pour ses qualités pédagogiques et l'enthousiasme communicatif dont elle sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

Mes remerciements s'adressent à Mme **Djamila Chabane**, pour ses remarques, ses suggestions et l'honneur qu'elle me fait en acceptant de juger à ce Jury de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements à Mme **Aicha Belkebir** pour avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime également mes remerciements les plus sincères et ma reconnaissance la plus profonde à **Mr Ziri** directeur du jardin d'essai de m'avoir encouragé et de m'avoir autorisé à assister aux cours durant le travail.

Sans oublier de remercier vivement **Mme Hamlet Nadja** qui m'a aidé à faire la HPLC et pour ses précieux conseils.

Je remercie particulièrement :

Mr Abdelaoui ingénieur chef de la station INRF de Tamanrasset de nous avoir procuré le matériel végétal, pour ses recherches et son aide précieuse.

Melle Amedjkouh Hafida et **Mme Mouhoub** et **Melle Rouane** de nous avoir ramené et photographier le matériel végétal de Tamanrasset.

Mme Naima Benchemame responsable du laboratoire de pharmacologie de nous avoir dirigées pour le test antalgique

Mme Henni Hassiba responsable du laboratoire de microbiologie de nous avoir dirigées pour les tests microbiologiques

Mme Djemaa Nassima, Sonia ingénieurs au laboratoire de microbiologie du CRD de Saidal et **Mme Naila chehbouni** ingénieur au laboratoire de microbiologie de LRZA pour leurs précieuses aides à faire les tests de microbiologie.

Mme Ouali Karima ingénieur au LRZA

Toute l'équipe de LRZA

Tous mes camarades.

Enfin, un grand merci à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Sommaire

Introduction.....	1
Chapitre I : Généralités	
1- Généralités sur <i>Aerva javanica</i>	3
1-1 Systématique	3
1-2 Répartition géographique.....	4
1-3 Description morphologique.....	5
1.3.1 Feuilles.....	6
1.3.2 Inflorescences.....	6
1.3.3 Fruits	7
1-4 Intérêt pharmacologique et thérapeutique de la plante étudiée.....	7
2- Généralités sur les composés phénoliques	8
2-1 Les acides phénols et les coumarines.....	8
a) Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque	8
b) Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique.....	9
c) Les coumarines.....	10
d) Biosynthèse des acides phénols.....	10
e) Intérêts biologiques et physiologiques des acides phénols et coumarines.....	11
2-2-Les flavonoïdes.....	11
a)-Les hétérosides flavoniques.....	13
b)- Les aglycones flavoniques.....	14
c)- Les anthocyanes.....	15
d)- Intérêt biologiques et physiologiques des flavonoïdes	15

3-Généralités sur les microorganismes à tester	17
4- Traitement multivarié.....	20
4-1- Analyse en composante principale ACP.....	20
Chapitre II : Matériels et méthodes	
1-Matériels	21
1-1 Matériels biologiques.....	21
1-1-1. Matériel végétal	21
1-1-2. Matériel microbiologique.....	21
1-1-3 Matériel animal	21
1-2- Matériels non biologiques.....	21
1-2-1- Milieux de culture	21
1-2-2- Médicaments	22
2-Méthodes	22
2-1.Méthodes d'extraction des composés phénoliques.....	22
2-1-1 Extraction hydrolytique.....	22
2-1-2 Extraction des aglycones libres.....	25
2-1-3 Extraction des hétérosides flavoniques	26
2-2 Techniques d'analyse qualitative.....	27
2-2-1 Techniques chromatographiques.....	27
2-2-1-1 Chromatographie sur papier	27
2-2-1-2 Chromatographie sur couche mince	28
2-2-1-3 Chromatographie liquide a haute performance.....	32
a)-Analyse des aglycones flavoniques et des acides phénoliques	34

b)-Analyse des C-glycosides et des hétérosides	35
2-3- Analyse quantitative	37
2-3-1 par spectrophotométrie.....	37
a) Dosage des flavones-flavonols	40
b) Dosage des anthocyanes	40
c) Dosage des C-glycosides	41
d) Dosage des hétérosides	42
2-4 Analyse statistique des données	42
2-5 Test microbiologique	43
2-5-1- Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne	43
2-6- Etude pharmacologique	45
2-6-1- Activité antalgique	45

Chapitre III : Résultats et Discussions

1- Etude biochimique des composés phénoliques.....	48
1-1 -Analyse quantitative des composés phénoliques par dosages spectrophotométriques ...	48
1-1-1- Dosage des aglycones flavoniques	48
1-1-2-Dosage des anthocyanes	48
1-1-3- Dosage des C glycosides flavoniques.....	49
1-1-4- Dosage des hétérosides flavoniques	49
1-2-Analyse qualitative des composés phénoliques.....	50
1-2-1 Identification des aglycones flavoniques par CCM	50
1-2-2- Identification des anthocyanes par CP.....	51
1-2-3- Fractionnement de l'extrait éthéré par CLHP.....	52
1-2-4-Identification des C glycosides par CLHP	56

1-2-5- Identification des hétérosides flavoniques par CLHP.....	57
1-3- Analyse statistique des composés phénoliques	61
1-3-1- Analyse en composantes principales ACP	61
a)-Classification de Neighbour Joining.....	63
b)-Classification ascendante hiérarchique à partir de l'ACP.....	64
2- Résultats des activités biologiques	64
2- Activité antimicrobienne	64
2-2 Activité antalgique.....	67
 Chapitre IV : Conclusion générale	
Conclusion générale	72
Références bibliographiques.....	75
Annexe 1.....	82

Liste des abréviations

A : *Aerva*

ATB : Antibiotiques

AcAce : Acetyl acétone.

ACP : Analyse à composante principale

ACoH : Acide acétique.

AlCl₃ : chlorure d'aluminium.

Benz :Benzene.

C : carbone.

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

C.C.M : chromatographie sur couche mince.

C.P : chromatographie sur papier.

C.L.H.P : chromatographie liquide à haute performance.

°C : degré Celsius.

CRD : Centre de Recherche et Développement de Saidal

cm : centimètre.

DO : densité optique.

E B : Extrait butanolique

E E : Extrait étheré

E H : Extrait hétérosidique

FeCl₃ : chlorure ferrique.

g : gramme.

m : mètre.

MeEt ce : Methyl-éthyl-cétone

MeoH : Méthanol.

MH : Muller Hinton.

ml : millilitre.

μl : microlitre.

nm : nanomètre.

N : normalité.

n-BuOH : n-butanol.

R_f : rapport frontal.

T : teneur.

UV : ultraviolet.

% : pourcentage.

Liste des figures

Figure1 : carte géographique d'algerie montrant la région de Tamanrasset

Figure 2 : photo de l'appareil végétatif d'*Aerva javanica* prise à Tamanrasset

Figure3 : photo montrant les feuilles et inflorescences de *Aerva javanica* prise à Tamanrasset

Figure4 : photo montrant les inflorescences de *Aerva javanica* prise à tamanrasset

Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes

Figure 5 : schéma de biosynthèse des acides phénoliques (Bruneton, 1993)

Figure 8 : Schéma de biosynthèse des flavonoïdes d'après Remesy, 1996

Figure 9: Protocole expérimental d'extraction des flavones – flavonols, anthocyanes, acides phénols et des C-glycosides d'après Lebreton., 1967 modifié par Ouafi 2007.

Figure 10 : Protocole expérimental d'extraction des aglycones libres selon Ouafi(2007).

Figure 11 : Protocole expérimental d'extraction des hétérosides d'après Harbone (1973).

Figure 12: schéma du développement chromatographique d'une plaque

Figure 13 : Schéma fonctionnel d'un système typique de la C.L.H.P.

Figure 14: Courbe étalon obtenue à partir d'une solution mère de rutine à 8‰.

Figure 15 : les étapes du protocole expérimental du test antalgique

Figure 15a : numérotation des souris

Figure15 b: injection par voie intragastrique

Figure 15c : injection de 0.5ml des produits à tester

Figure 15d : injection par voie intrapéritonéale

Figure 15e : souris en pleine crampe

Figure16: Schéma de chromatogramme monodimensionnel des aglycones obtenus par fractionnement de l'extrait éthéré d'*Aerva javanica* sur plaque de polyamide.

Figure 17 : schéma du chromatogramme des anthocyanes obtenu par fractionnement de l'extrait butanolique de *Aerva javanica* sur papier Whatman n°3 solvant Forestal.

Figure 18 : Profil CLHP représentant les flavones et les flavonols, détectés à 365 nm en mode gradient d'élution dans le système de solvants (Solvant A : acide acétique à 2%, Solvant B : méthanol).

Figure 19 : Profil CLHP représentant les acides phénols détectés à 260 nm en mode gradient d'élution dans le même système de solvant.

Figure 20 : Profil CLHP représentant les C-glycosides détectés à 370 nm en mode gradient d'élution.

Figure 21 : Profil chromatographique représentant les hétérosides flavoniques détectés par C.H.L.P à 370 nm en mode gradient d'élution

Figure 22: Projection des 15 individus en fonction des 4 variables sur l'axe de l'A.C.P

Figure 23 : Représente Dendrogramme issu de la classification de Neighbour Joining portant sur les 15 individus

Figure 24 : Représente le dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique sur les 15 individus étudiés.

Figure 25 : Zones d'inhibitions obtenues par action des extraits flavoniques de *Aerva javanica* sur la croissance des trois souches de bactéries.

Figure 26 : Activité antimicrobienne des solvants (n-butanol, méthanol, éther di éthylique) sur les bactéries et la levure

Figure 27 : Zones d'inhibitions obtenues par action des antibiotiques commerciaux sur les souches bactériennes et la levure.

Figure 28: Zones d'inhibitions obtenues par action des extraits flavoniques de *Aerva javanica* sur la levure

Figure 29 : Histogramme représentant les diamètres des zones d'inhibition obtenus par action des extraits flavoniques de *Aerva javanica* sur les bactéries et la levure.

Figure 30 : Souris en pleine crampe

Figure 31 : Histogramme représentant le pourcentage de protection des souris en fonction des extraits flavoniques de *Aerva javanica* comparé au produit de référence.

Liste des tableaux

Tableau 1: Caracteristiques climatologiques de l'année 2010 de la région de tamanrasset

Tableau 2 : Tableau représentant les intérêts thérapeutiques de *Aerva javanica*

Tableau 3 : Structure chimique et dénomination des acides phénoliques dérivant de l'acide benzoïque

Tableau 4 : Structure chimique et dénomination des acides phénoliques dérivant de l'acide cinnamique.

Tableau 5 : Pathologies causées par les germes cibles utilisés pour l'activité antimicrobienne des Polyphénols.

Tableau 6 : les conditions de CLHP

Tableau 7 : Conditions opératoires pour la séparation et l'identification des

flavones – flavonols et des acides phénoliques de *Aerva javanica* (Burm) en mode gradient d'élution de la phase mobile.

Tableau 8 : Programme d'élution pour la séparation des hétérosides

Tableau 9 : les temps de rétention des étalons flavoniques

Tableau 10 : Dilutions préparées à partir d'une solution mère à 8‰ de rutine.

Tableau 11 : Tableau représentant les teneurs absolues en aglycones flavoniques de *Aerva javanica* en mg/g.

Tableau 12 : Tableau représentant les teneurs absolues en anthocyanes de *Aerva javanica* en mg.g-1

Tableau 13: Tableau représentant les teneurs absolues en C-glycosides de *Aerva javanica* en mg/g

Tableau 14 : Tableau représentant les teneurs absolues en hétérosides de *Aerva javanica* en mg/g

Tableau 15 : Caractéristiques chromatographiques des composés contenu dans l'extrait éthérée d'*Aerva javanica* après hydrolyse acide

Tableau16 : Caractéristiques chromatographiques de l'extrait butanolique d'*Aerva javanica* identifiés par Chromatographie descendante sur papier Whatman :

Tableau17 : Caractéristiques chromatographiques des flavones-flavonols contenues dans l'extrait éthéré identifiés par C.L.H.P à 365 nm

Tableau18 : Caractéristiques chromatographiques des acides phénols de l'extrait éthéré identifiés par C.L.H.P à 260nm.

Tableau 19 : Caractéristiques chromatographiques des C-glycosides de l'extrait butanolique identifiés par C.L.H.P à 370 nm.

Tableau 20 : Caractéristiques chromatographiques des hétérosides identifiés par C.L.H.P à 370 nm.

Tableau 21 : Tableau représentant les corrélations entre les variables étudiées.

Tableau 22 : Echelle retenue par Chifundera ,1990

Tableau 23 : Echelle retenue par Meena et Sethi, 1994

Tableau 24 : Diamètres des zones d'inhibitions des souches microbiennes

Tableau 25: Tableau représentant les moyennes arithmétiques des crampes

Tableau 26: Tableau représentant le pourcentage de protection

Résumé

Ce travail est une contribution à l'étude des composés phénoliques, de l'espèce végétale *Aerva javanica*, faisant partie de la famille des Amaranthaceae. Choisie pour son intérêt thérapeutique et sa grande capacité antioxydante, très utilisée à Tamanrasset en médecine et pharmacopée traditionnelle.

D'usage très diversifié, Toutes les parties de cette plante sont sollicitées : tiges, feuilles, racines, fruits.

L'extraction des grandes familles de polyphénols, par différents solvants (polaires et apolaires), nous a permis de :

-Quantifier par spectrophotométrie UV visibles les composés suivants (flavones-flavonols : **0.108 mg/g $\pm$ 0.04**, anthocyanes : **0.204 mg/g $\pm$ 0.065** C-glycosides: **0.286 mg/g $\pm$ 0.129**, aglycones flavoniques libres:**0.12mg/g $\pm$ 0.13** et hétérosides:**1.63 mg/g $\pm$ 0.178**).

-révéler et identifier par Chromatographie sur Couche Mince (C.C.M), sur papier (C.P), et Chromatographie Liquide à Haute Performance (C.H.L.P), la composition de chaque famille à savoir **2 Flavones** : Apigénine et la lutéoline révélée pour la première fois **4 Flavonols** : Myricétine, Quercétine, et l'isorhamnétine (révélés pour la première fois) et le Kaempférol. **1 Anthocyane** : identifie pour la première fois la Cyanidine. **8 Hétérosides** identifiés pour la première fois dont **5 C-glycosides** : Vitexine, Isovitexine, 2'' vitexine O rhamnoside, Di-C glycoside d'Apigénine, Mono C glycoside d'Apigénine. **Et 3 O-glycosides** : Di O glucoside de myricétine, Myricétine 3 glucoside, Rutine (di O glyco 3 de quercétine

6 Acide phénols révélés pour la première fois dont **3 de la série benzoïque** Acide gallique, acide p hydroxybenzoïque, acide vanillique et **3 de la série cinnamique** Acide cinnamique, acide caféique, acide sinapique.

1Acide organique : Acide ascorbique, **1 phénol simple** : le Catéchol révélé pour la première fois.

Les résultats de la recherche de la diversité chimique à l'intérieur de notre espèce ont montré que les individus étudiés se répartissent en deux chémotypes distincts ce qui dénoterait de l'éventuelle présence de clones dans l'espèce *Aerva javanica*, bien que l'espèce soit homogène.

. Les tests microbiologiques et pharmacologiques ont montré que:

Les composés phénoliques de *Aerva javanica* possèdent une activité antibactérienne, une forte propriété antalgique relative aux hétérosides flavoniques.

Mots clés : *Aerva javanica*, composés phénoliques, diversité chimique, activité antimicrobienne, activité antalgique, Tamanrasset.

Introduction

Depuis l'antiquité, les hommes ont su développer les extraordinaires vertus médicinales que recèlent les plantes, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique basée sur l'analyse et l'observation s'appelle la phytothérapie.

La flore algérienne est très diversifiée en plantes médicinales surtout dans la région saharienne qui malgré les travaux en cours reste peu étudiée.

A Tamanrasset la médecine traditionnelle occupe une place très importante dans la satisfaction des besoins de santé de la population et est essentiellement basée sur l'utilisation des plantes médicinales.

Car Les plantes sont une véritable usine chimique qui ne cesse de nous épater encore et encore aussi bien par la richesse des constituants qu'elles synthétisent que par les multiples utilisations qu'elles trouvent dans notre vie quotidienne. Elles sont très variées dans leurs compositions systématiques où sont représentées plusieurs familles qui constituent un véritable trésor de santé, grâce aux principes actifs qu'elles renferment (polyphénols, hétérosides, alcaloïdes.). Les propriétés antioxydantes ou anti-inflammatoires des polyphénols suscitent également beaucoup d'intérêt dans le domaine médical par leur caractère préventif à l'égard de diverses pathologies, comme les maladies cardiovasculaires ou dégénératives...(Sarni -Manchado et al., 2006)

Les flavonoïdes forment un très vaste ensemble de substances polyphénoliques issues du métabolisme secondaire, très répandus chez les végétaux surtout dans les organes aériens. En effet ces composés sont connus comme étant les principes actifs pour un grand nombre de plantes médicinales.

C'est pour cela que nous avons choisi d'étudier la partie aérienne (tiges et feuilles, fleurs) de quinze pieds de *Aerva javanica*, récoltés dans la région de Tamanrasset où elle est très utilisée par les Targuis. Elle aurait de nombreuses vertus médicinales. *Aerva javanica* appartient à la famille des *Amaranthaceae* et Dans la pharmacopée traditionnelle africaine, les *Amaranthaceae* sont utilisées dans le traitement de nombreuses affections telles que les problèmes intestinaux, le météorisme (ballonnement du ventre, dû à des gaz). On note également l'utilisation comme diurétique ou antisypilitique. Les *Amaranthaceae* sont également utilisées contre les céphalées infantiles et auraient un effet antidiarrhéique (Lagnika L,2005).

Plusieurs études scientifiques ont confirmé l'intérêt pharmacologique d'un grand nombre d'espèces de la famille des *Amaranthaceae*. Entre autres :

L'activité leishmanicide de l'extrait hydroalcoolique de *Pfaffia glomerata* (Neto et al., 2004).

L'activité anti-histaminique, analgésique et anti-venin d'*Aerva javanica* (El-Seed et al., 1999).

Nos travaux s'inscrivent dans le cadre d'un projet national de recherche PNR entre le LRZA et CRD SAIDAL qui a pour objectif d'inventorier les espèces végétales médicinales du Hoggar. Afin de faire ressortir l'aspect biochimique, anatomique, histologique et pharmacologique de ces plantes médicinales.

La présente étude a pour objectif l'analyse quantitative par spectrophotométrie et qualitative par différentes techniques chromatographiques CP, CCM, CLHP des composés phénoliques présents dans la partie aérienne d'*Aerva javanica* aussi bien sous forme d'aglycones que de glycosides. Ainsi que l'étude de quelques activités biologiques des fractions isolées.

En effet ces composés sont connus comme étant les principes actifs pour un grand nombre de plantes médicinales.

Nos travaux s'organisent donc en deux parties :

- * dans la première partie nous réaliserons une analyse quantitative et qualitative par l'extraction, le dosage des différentes classes de composés phénoliques, sur quinze (15) individus d'*Aerva javanica* de la région de Tamanrasset.

De même que nous ferons l'identification des composés présents dans les différents extraits par les techniques chromatographiques.

Les résultats des analyses quantitatives feront ensuite l'objet d'analyses statistiques menées par une ACP centrée, et des classifications hiérarchiques des données. Ainsi que par des corrélations entre les variables étudiées, ceci en vue de déceler une éventuelle biodiversité chimique intra spécifique par les polyphénols.

- * la deuxième partie consistera à rechercher pour les extraits isolés les activités biologiques suivantes:

- activité antimicrobienne.

- activité antalgique.

Nous concluons notre étude par les perspectives envisagées pour les travaux futurs à partir des résultats obtenus.

1-Généralités sur *Aerva javanica* (Burm)

Aerva javanica est une plante saharienne, c'est un arbuste ligneux entièrement recouvert d'une pilosité très blanche laineuse. Elle est très répandue dans l'Ahaggar et dans tout le Sahara centrale. Connue à Tamanrasset sous le nom de Tamakerzit . (Sahki A et Sahki R., 2004)

1-1-Systématique:

Nous avons adopté la classification de APG III (Bremer et al,2009)

Règne : Plantae

Sous-Règne : Tracheobionta

Embranchement :Spermaphytes

S/Embranchement :Angiospermes

Clade :Eu-Dicotyledones

Classe : Magnolopsides

Sous-classe :Caryophylliidae

Ordre :Caryophyllales

Famille :Amaranthaceae

Genre :*Aerva*

Espèce :*Aerva javanica*.

L'espèce *Aerva javanica* (Burm.f) Schultes possède plusieurs synonymes :

Aerva tomentosa Forssk, *A. persica* (Burm.) Merrill.

Cette espèce possède aussi plusieurs noms vernaculaires :

Nom arabe : Aroua, Ra'a

Nom Tamahaq: Tamkerzit, Tamakerzit Témakarkezt

Nom français : l'envahissante

Nom anglais: Desert cotton, Kapok bush, Snow bush

En Pakistan : Booh

En Niger :Kizzingri

1-2- Répartition géographique d'*Aerva javanica*

Aerva javanica, est très répandue dans l'Ahaggar. Elle est commune dans tout le Secteur du Sahara central, le Sahara occidental par contre très rare dans le Secteur du Sahara septentrional (Quezel et Santa., 1962).

La région de Tamanrasset est située à **2000 kms** d'Alger à **1400m** d'altitude. Petit village, carrefour de rencontre des populations nomades en provenance du Tassili (région située au sud-est du Hoggar), du Niger, du Mali ou de la Libye.

Notre plante a été récoltée au mois de mars 2010 à oued Amsel situé à 30 km au sud de Tamanrasset à 1254 m d'altitude et au mois de decembre 2010 a In tounene située a 25 Km de Tamanrasset (Fig1).

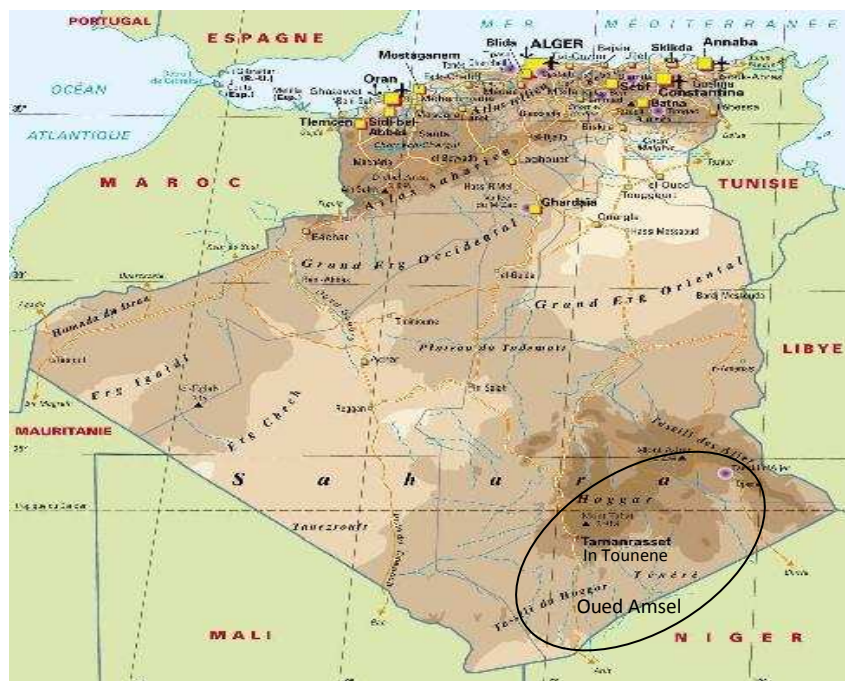


Fig.1 Carte géographique d’Algérie montrant la région de Tamanrasset in
(<http://herguema.kazeo.com/sahara-d-algerie/>)

- **Caractéristiques climatologiques de la région de Tamanrasset :**

Nous avons rassemblé les caractéristiques climatologiques de la région de Tamanrasset pour l’année 2010 dans le tableau 1.

Tableau 1: Caracteristiques climatologiques de l’année 2010 de la région de Tamanrasset(Monographie de Tamnrasset 2010)

Mois	T° min	T° max	Précipitation	Humidité	Vitesse du vent
Javier	5,2	23,7 /		16	2,9
Fevrier	10,4	26,9 /		25	3,7
Mars	13,7	29,1 /		16	4,1
Avril	19,1	33 /		16	4,5
Mai	21,5	35,1 /		16	4,5
Juin	24,5	36,4	21,6	24	408
Juillet	23,6	36,2	25,1	26	4,6
Aout	23,4	35,8	11,1	32	4
Septembre	22	34,4	16,6	30	3,8
Octobre	19,5	31,8	0,2	29	3,8
Novembre	12,9	27	2,8	28	3,4
Decembre	8	24,8 /		19	2,9

1-3-Description morphologique de *Aerva javanica*

C’est un arbuste rameux à feuillage touffu d’une blancheur laineuse, provenant de poils crème, fins et denses qui recouvrent toutes les parties de la plante (fig2).

Aerva javanica est d’une hauteur d’environ 50 à 60 cm. La période de floraison s’étend de janvier à octobre.

Cette plante prend de la place et étouffe les autres plantes, quand elle pousse près d'une autre plante elle la met à l'étroit d'où le nom Témakarkezt qui vient de tekrazt qui veut dire étroit, plus de place. D'où le nom aussi de l'envahissante. Elle forme des fourrés impénétrables autour des marres semi permanentes. Plante fourragère appréciée des moutons et des chèvres. C'est aussi un bon pâturage pour les chameaux.



Figure 2 : Appareil végétatif d'*Aerva javanica* prise à Tamanrasset (In tounène)

1-3-1-Feuilles : Elles sont velues, alternes, allongées, ovales, lancéolés, sessiles, blanchâtres sur leurs faces, denses dans la partie inférieure de la plante (fig3).



Figure3 : Feuilles et inflorescences de *Aerva javanica* prise à Tamanrasset (In tounène)

1-3-2 Inflorescences : Les inflorescences sont groupées en épis denses duveteuse portant des fleurs unisexuées minuscules aux tépales 5 étamines avec 5 staminodes lineaire ,oblongs 2-3 mm d'un blanc rosé. (Quezel et Santa,1962., Sahki ,2004)(fig4).



Figure4 : Inflorescences de *Aerva javanica* prise à Tamanrasset(In tounène)

1-3-3 Fruits : les fruits sont indéhiscents pyxidaires, Ovoïdes entourés par le périanthe persistant.(Quezel et Santa,1962)

1.4 Intérêts pharmacologiques et thérapeutiques de la plante étudiée

Aerva javanica est une espèce très utilisée par les targuis elle aurait de nombreuses vertus médicinales. Les propriétés et usages de *Aerva javanica* sont rassemblés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Intérêts thérapeutique de *Aerva javanica* selon la bibliographie

La partie utilisée	Intérêts thérapeutiques	Références bibliographiques
Les graines et inflorescences	Coagulation du sang et problèmes rénaux	Kiambi, 1999
Plante entière	Infections dermatologiques Douleurs et inflammations abdominales	Zafar M et al ., 2006
Racines	Maux de têtes, diurétique, vermifuge, désordre rénal, effet néphroprotecteur.	Sumit L et al.,2008
Feuilles	Antihyper glycémique	Srinivas et al.,2009
Plante entière	Anti parasites	
Racine	morsure de serpents	Ali omar M,2009
Feuilles et tiges	Piqûre de scorpion	

Les graines et inflorescences	Contre la diarrhée des bovins	Fraz M khan ,2009
Racines	Traite les hémorroïdes	Qureshi et al,2010
Plante entière	Sécheresse et fissure de la peau, maux de dents (décoction de la plante et par gargarisme	
Pate faite à base de feuilles et d'inflorescence	Blessures et inflammation de la peau en application externe	

2-Généralités sur les composés phénoliques

Avec plus de 8000 structures phénoliques connues, les polyphénols constituent l'une des plus grandes familles de molécules largement répandues dans le règne végétal.

Ce sont des métabolites secondaires des végétaux présents dans toutes les parties de la plante (Beta et *al.*, 2005).les polyphénols prennent une importance croissante, notamment à cause de leurs effets sur la santé (Stanley et *al.*,2003). En effet, leurs rôles d'antioxydant naturels suscitent de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer (Chen et *al.*,2008), des maladies inflammatoires , des maladies cardiovasculaires (Frankel et *al.*,1996), des maladies neurodégénératives .

Ils sont également utilisés comme additifs pour l'industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Les polyphénols sont caractérisés par la présence de plusieurs groupements phénoliques et possèdent d'autres fonctions (alcoolique, carboxylique.....)

Ils regroupent un vaste ensemble de substances chimiques comprenant au moins un noyau aromatique et un ou plusieurs groupements hydroxyles.

Ils peuvent aller de molécules simples comme les acides phénoliques, à des composés hautement polymérisés comme les tanins. Selon leurs caractéristiques structurales, les polyphénols se répartissent dans différentes familles et sont communément subdivisés en formes simples : phénols simples, acides phénols (dérivés de l'acide benzoïque ou cinnamique) et coumarines, en naphthoquinones, en stilbénoides (deux cycles C6 liés par C3), en flavonoïdes, isoflavonoïdes et anthocyanes (structure C6-C3-C6) .En formes polymérisées : lignanes, lignines, tanins condensés. Ces squelettes carbonés de base sont issus du métabolisme secondaire des plantes, élaborés par la double voie shikimate/acétate.

2-1-Les acides phénols et les coumarines

Les acides phénols sont définis par l'existence d'un seul noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxylés. Ils se trouvent en général à l'état combiné (sous forme de liaison ester ou osidique) chez les végétaux. Ils appartiennent à deux groupes: les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques (Sarni-Manchado et Cheynier, 2006).

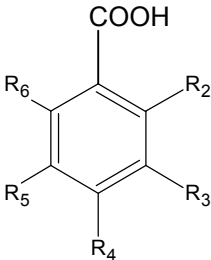
a-

Les acides phénols dérivés de l'acide benzoïque

Ils sont à 7 atomes de carbone, ont une formule de base de type : C₆-C₁. Ce sont des composés largement répandus chez les angiospermes.

Le tableau 3 illustre les groupes d'acide phénoliques dérivant de l'acide benzoïque d'après Riberau-Gayon 1968

Tableau n°3 : Structure chimique et dénomination des acides phénoliques dérivant de l'acide benzoïque

STRUCTURE GÉNÉRALE	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	DÉNOMINATION CHIMIQUE	DÉNOMINATION USUELLE
	H	H	H	H	H		Acide benzoïque
	OH	H	H	H	H	Acide orthohydroxy-benzoïque	Acide salicylique
	H	OH	H	H	H	Acide hydroxy-3-benzoïque	Acide méta hydroxy benzoïque
	H	H	OH	H	H	Acide hydroxy-4-benzoïque	Acide para hydroxy benzoïque
	H	OH	OH	H	H	Acide-3,4-dihydroxybenzoïque	Acide protocatéchique
	H	OH	H	OH	H		Acide résorcylique α
	OH	H	OH	H	H		Acide résorcylique β
	OH	H	H	H	OH		Acide résorcylique δ

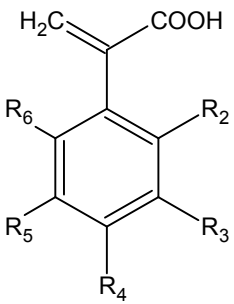
	H	OH	OH	OH	H	Acide-3, 4,5-trihydrobenzoïque	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	H	H	Acide-4-hydro-3-methoxybenzoïque	Acide vanillique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Acide-4-hydro-3,5-dimethoxybenzoïque	Acide syringique

b-

Les acides phénols dérivés de l'acide cinnamique

Ce sont des dérivés du phényle propane à chaîne latérale et à 9 atomes de carbone C6-C3 ils sont rarement libres, très souvent estérifiés. Les acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique ont une distribution très large alors que d'autres : o-coumarique, o-férulique sont peu fréquents. Le tableau 4 illustre les groupes d'acides phénoliques dérivant de l'acide cinnamique d'après Riberau-Gayon 1968.

Tableau N°4 : Structure chimique et dénomination des acides phénoliques dérivant de l'acide cinnamique.

STRUCTURE GÉNÉRALE	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	DÉNOMINATION CHIMIQUE	DÉNOMINATION USUELLE
	H	H	H	H	H		Acide cinnamique
	OH	H	H	H	H	Acide-2-hydroxy cinnamique	Acide-o-coumarique
	H	OH	H	H	H	Acide-3-hydroxy cinnamique	Acide-m-coumarique
	H	H	OH	H	H	Acide-4-hydroxy cinnamique	Acide-p-coumarique
	H	OH	OH	H	H	Acide-3,4-dihydroxy cinnamique	Acide caféique
	H	OCH ₃	OH	H	H	Acide-4-hydroxy-3-methoxycinnamique	Acide férulique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	Acide-4-hydroxy-3,5dimethoxycinnamique	Acide sinapique

c-Les coumarines

Les coumarines dérivent du noyau benzo α pyrane qui est la lactone de l'acide O-hydroxy cinnamique. Elles comportent une ou plusieurs fonctions phénoliques libres ou estérifiées (méthoxylées). A l'état naturel elles existent sous forme hétérosidique ou libre (Hopkins., 2003).

d-Biosynthèse des acides phénols

La voie de l'acide shikimique représente le principal mode d'accumulation des phénols dans les plantes, en particulier c'est par ce mécanisme que sont formés les acides aminés aromatiques et les acides benzoïques. (Bruneton.,1993). (Figure 5)

e -Intérêts biologiques et physiologiques des acides phénols et coumarines

Les acides phénols sont anti-inflammatoires, antiseptiques urinaires, anti radicalaires, hépato protecteurs (Bruneton, 1999).

Les Acides phénoliques, tels que l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide protocatéchique, l'acide vanillique, l'acide férulique, l'acide sinapique et l'acide gallique, sont contenus dans de nombreuses plantes cultivées et médicinales (Postova et *al.*, 2003 ; Hale, 2003). Ils ont des effets prébiotiques, antioxydants, de chélation et anti-inflammatoire.

Ils sont considérés comme non toxiques. Pharmacologiquement, le mieux caractérisé est l'acide caféique (Postova et *al.*, 2003).

Ainsi, l'acide caféique et l'acide férulique limiteraient la formation du cancer des poumons chez les souris tandis que l'acide gallique empêcherait la formation du cancer œsophagien chez les rats (Hale, 2003).

Les phénols ont également été décrits dans plusieurs processus physiologiques :

Croissance cellulaire, différenciation, organogenèse, dormance des bourgeons, floraison et tubérisation (Marcheix et *al.*, 2005) .

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et solvants organiques tel que l'éther ou les solvants chlorés dans lesquels ils sont extractibles. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. Elles ont un spectre UV caractéristique, fortement influencé par la nature et la position des substituants. Elles sont également antivirales, immunostimulantes, tranquillisantes, et bénéfique en cas d'infections cutanées.

2-2-Les flavonoïdes : biosynthèses et structures

Le terme flavonoïdes regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On distingue différents types de noyaux. Les flavonoïdes ont tous une origine biosynthétique

commune et par conséquent, possèdent tous un même squelette de base de quinze atomes de carbone constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en C₆ (appelés par convention A et B) reliés par une chaîne en C₃. (fig.6)

Les flavonoïdes font partie d'une classe de composés naturels largement répandue chez les végétaux. Ils sont très présents dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs de plantes, abondants dans les légumes et présents dans les aliments d'origine végétale (légumes, céréales, légumineuse, fruit, etc.) et les boissons (vin, thé, cidre bière, cacao, etc.). cette présence est en grande partie influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales (Lugasi et *al.*, 2003).

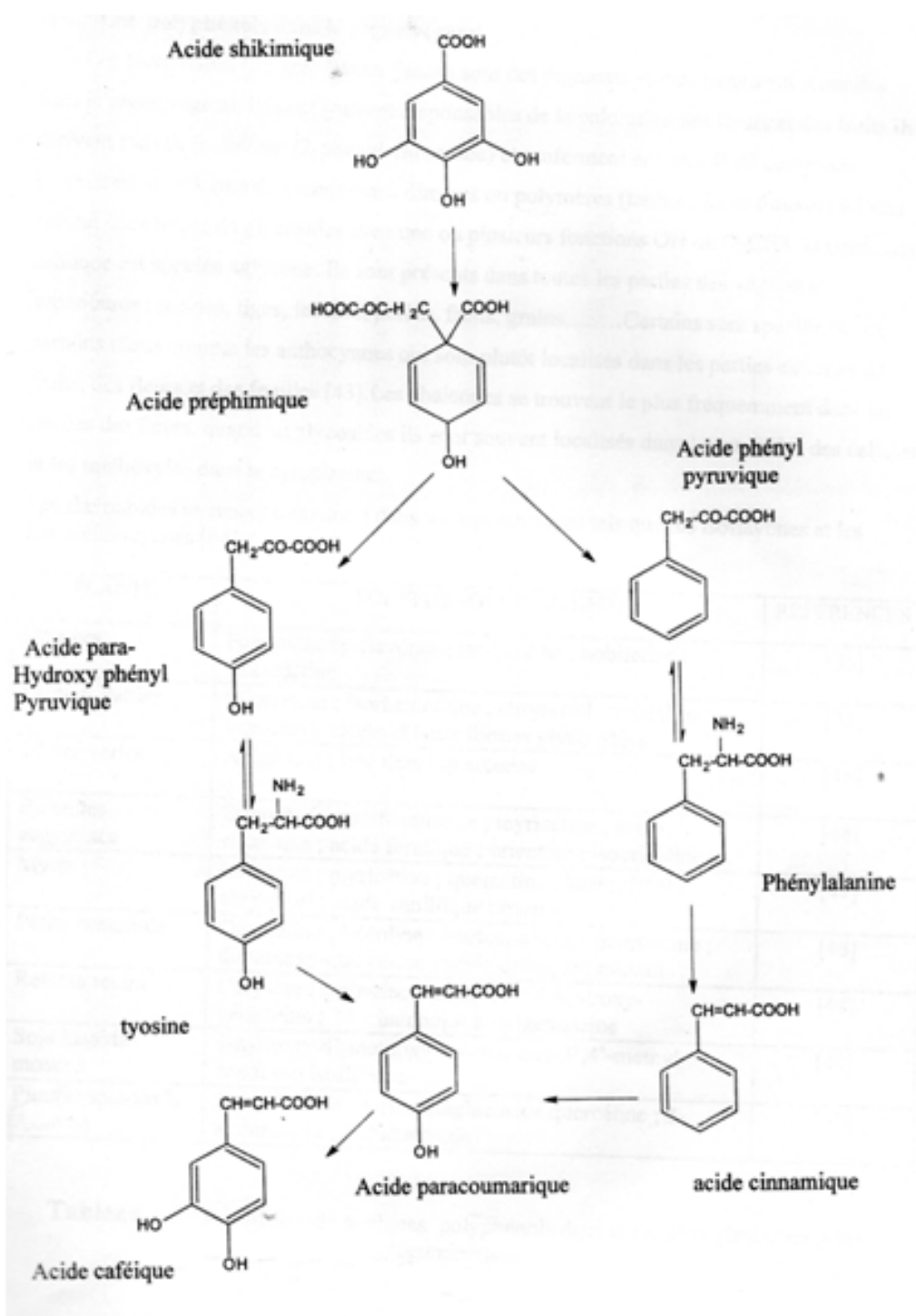


Figure 5 : schéma de biosynthèse des acides phénoliques (Bruneton, 1993)

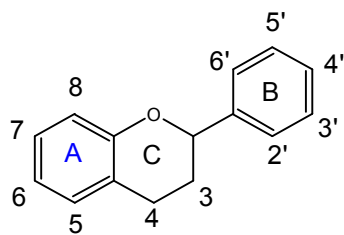


Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes

Cette structure de base est sujette à 2 types de substitutions sur plusieurs sites, les différentes formes structurales ont été présentées par Harborne où les positions les plus fréquemment substituées sont 3,5 et 7.

1/ O- substitution : hydroxylation (OH)

O-methylation (O-CH₃)

O-glycosilation (O-osides)

2/ C-substitution : C-methylation (C-CH₃)

C-glycosilation (C-osides)

Ces substitutions mènent à une diversité de classes de flavonoïdes non seulement dans leurs structures mais aussi dans leurs propriétés biochimiques et pharmacologiques.

Tous les flavonoïdes dérivent d'un précurseur commun une chalcone en C15 découlant elle-même de 2 charnières métaboliques le shikimate et l'acétate (fig 8).

a- Les Hétérosides flavoniques

Généralement les flavonoïdes existent dans la nature sous forme de combinaisons hétérosidique, ces derniers résultent de la condensation du groupement hémi-acétalique d'un ose ou d'un acide avec une substance non glucidique appelée génine ou aglycone (Hakkinen et *al*, 1998).

La classification des hétérosides repose sur la nature de l'atome de la génine portant l'hydrogène qui se condense avec l'oxygène hémi-acétalique de l'ose ou de l'acide.

La molécule glucidique peut être fixée sur n'importe quel OH de la molécule de flavonoïdes mais il y a certaines positions privilégiées, par ex : les anthocyanes possèdent un glucide en position 3 et un deuxième glucide est fixé en 5. Pour les flavones, les hétérosides possèdent un glucide en 7 et chez les flavonols c'est la position 3 qui est privilégiée.

La glycosylation est particulièrement importante dans les milieux biologiques car elle solubilise le flavonoïde et le rend physiologiquement stable. Ces hétérosides sont de deux types : des O-glycosides ou des C-glycosides.

Les combinaisons de type O-glycosides dont la partie osidique peut être mono-di ou tri saccharidique.

On note également des combinaisons du type C-glycosides ou une molécule glucidique est liée par son carbone à un aglycone qui est le plus généralement une flavone en faisant intervenir une liaison carbone-carbone.

On distingue plusieurs types de structures :

1-Les mono-C-glycosyl flavonoïdes

2-Les di-C-glycosyl flavonoïdes

3-les C-glycosyl-O-glycosyl flavonoïdes

4-les acyl-C-glycosyl flavonoïdes.

Les C-glycosides les plus connus sont la vitexine (C-glycoyl-8-apéginine) et l'orientine (C-glycosyl-8-lutéoline).

Parmi les sucres qui interviennent dans la structure des hétérosides : le D-glucose, D-galactose, des pentoses (le L-rhamnose, le L-arabinose, D apiose et le D-xylose). Harbone , 1988,Bouchama,2000, Ouafi., 2007.

b- Les aglycones flavoniques

Les différents aglycones se distinguent fondamentalement par leur degré d'oxydation qui varie essentiellement suivant :

-la présence ou non de double liaison sur l'hétérocycle

-la présence ou non d'une fonction carbonyle sur l'hétérocycle

-le nombre et la position de groupements hydroxyles sur l'aglycone.

- **Les flavones, flavonols et leurs dérivés voisins (fig.7)**

Ils représentent environ 80% des flavonoïdes connus et sont abondants au niveau des tiges, des feuilles et rares au niveau des graines et des racines (Ribereau- Gayon, 1968).

- **Les flavonols** : (hydroxy-3-flavones) ce sont les composés les plus répandus, les trois structures principales sont le kaempférol, la quercétine et la myricétine.

- **Les flavones** : elles sont très répandues dans les différentes familles d'angiospermes,

Sous formes deux composés l'Apigénine et la lutéoline. Mais leur rôle est moins important que celui des flavonols, l'hydroxylation de l'apigénine et de la lutéoline correspondent respectivement à celle du kaempférol et de la quercétine.

- **Les flavanones** : (dihydro-2,3 flavones), sont peu répandus dérivent des flavones par disparition de la double liaison de l'hétérocycle central. La principale substance est la naringénine.
- **Les isoflavones** : n'ont pas la structure classique en C6-C3-C6 des flavonoïdes, la génistéine est le composé le plus répandu.
- **Les flavanonols** : (dihydro-2,3 flavonols), dérivent des flavonols par hydrogénation de la double liaison 2-3. La taxifoline est la principale structure.
- **Les flavanes** : dans ces composés l'hétérocycle centrale est entièrement saturé et ne possède pas de groupements CO. Parmi les structures les plus répandues on trouve la catéchine, la gallo-catéchine, la leucocyanidine, et la leucodelphinidine.
Les flavanes existent dans la nature sous forme d'aglycones le plus souvent polymérisées, ce qui les différencie des autres flavonoïdes qui se trouvent sous formes hétérosidiques (Bruneton, 1993).

- **Les chalcones, dihydrochalcones et aurones**

Ces composés ont toujours une structure en C6-C3-C6 sauf que l'élément en C3 n'est pas sous forme d'hétérocycle (chalcone) ou sous forme d'un hétérocycle à 5 chaînons.

Les chalcones et les aurones sont des pigments jaunes de fleurs, leur coloration vire au rouge ou rouge orangé en présence d'ammoniaque. Ces substances sont limitées et peu répandues.

c- Les Anthocyanes

Les anthocyanes sont présents dans la nature sous forme hétérosidique ou anthocyanine, les plus répandus sont la cyanidine et la delphinidine . (Hadj Mahamed.,1992).

Les anthocyanes ont une structure en C6-C3-C6, l'élément en C3 est sous forme d'ion pyrylium dans lequel l'oxygène a une structure d'oxonium ionique.

La figure 7 illustre les différentes classes de flavonoïdes.d'après Harbone, 1988., Ouafi ,1987

d-Intérêts biologiques et physiologiques des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasi universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des feuilles et des fruits. Présents dans tous les organes aériens, dans la cuticule foliaire et dans les cellules épidermiques des feuilles, ils ont une teneur maximale dans les organes jeunes (feuilles et boutons floraux).

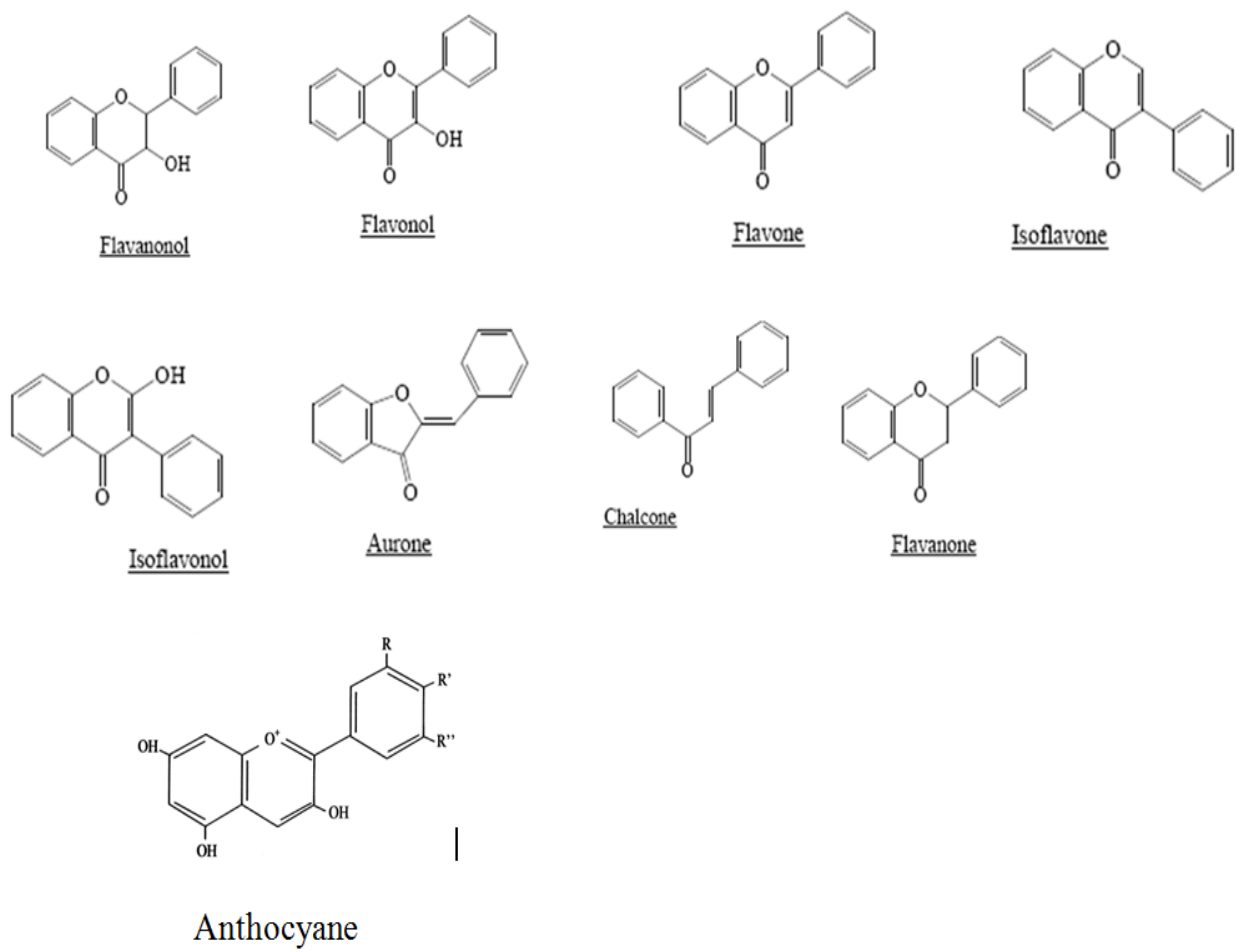


Figure 7 : structures de quelques flavonoïdes

Ils sont susceptibles d'assurer la protection des tissus contre les effets nocifs des rayonnements UV (Marcheix *et al.*., 2005). Les pigments responsables de la coloration des fleurs constituent des signaux visuels qui attirent des animaux pollinisateurs. La plus part de ces pigments sont des anthocyanes, des aurones et des chalcones. D'autres polyphénols incolores tels que des flavonols et flavanones interagissent avec des anthocyanes pour contribuer, par copigmentation, à la couleur des fleurs et des fruits (Brouillard *et al.*.,1995).

Des données récentes en biologie moléculaire ont montré que des flavonoïdes étaient nécessaires à la germination et au développement du tube pollinique chez le maïs et le tabac (Mo *et al.*, 1992 ; Ylstra *et al.*1993).

3-Généralités sur les micro-organismes à tester

Dans les pays en voie de développement, les maladies infectieuses et parasitaires constituent un problème de santé publique à cause de leur fréquence et leur gravité.

La situation est davantage plus préoccupante à cause de l'apparition des souches des microorganismes antibiorésistants et l'émergence des infections non communes (Vanden et Vlietinck, 1991) qui compromettent les traitements à l'aide des médicaments existants.

Face à ces nombreux obstacles que présente l'utilisation des antibactériens disponibles, il est Indispensable de rechercher de nouvelles substances antibactériennes efficaces et à large spectre d'action.

Une des stratégies pour cette recherche consiste à explorer les plantes utilisées en médecine traditionnelle.

En effet, l'OMS (2002) estime que, pour se soigner, 80 % de la population africaine recourt toujours à la médecine traditionnelle pour laquelle la majeure partie des thérapies implique l'exploitation des principes actifs des plantes médicinales. Ces espèces végétales d'une aussi grande importance pour la santé des populations méritent d'être étudiées scientifiquement pour leur meilleure utilisation.

Ce d'autant plus que la flore Algérienne et surtout la région saharienne est riche et variée, mais elle demeure très peu exploitée scientifiquement.

Pour étudier les propriétés antagonistes des polyphénols extraits de l'*Aerva javanica* plusieurs germes cibles (bactéries et levure) ont été utilisés.

Escherichia coli : c'est une bactérie de forme bacillaire, à Gram négatif, de la famille des enterobacteriaceae, aérobie facultative, mobile grâce à une ciliature pérित्रique de dimension moyenne (0.5μ à 3μ) se développe aisément sur milieux ordinaires. C'est un parasite commensal normal de l'intestin de l'homme et des animaux. Il est souvent retrouvé en petit nombre dans les urines saines. E.coli est aussi une bactérie largement répandue dans le milieu extérieur. Certaines souches sont pathogènes, chez l'homme ce pouvoir est étendu ; nous retrouvons cette bactérie surtout dans les infections génito-urinaires.

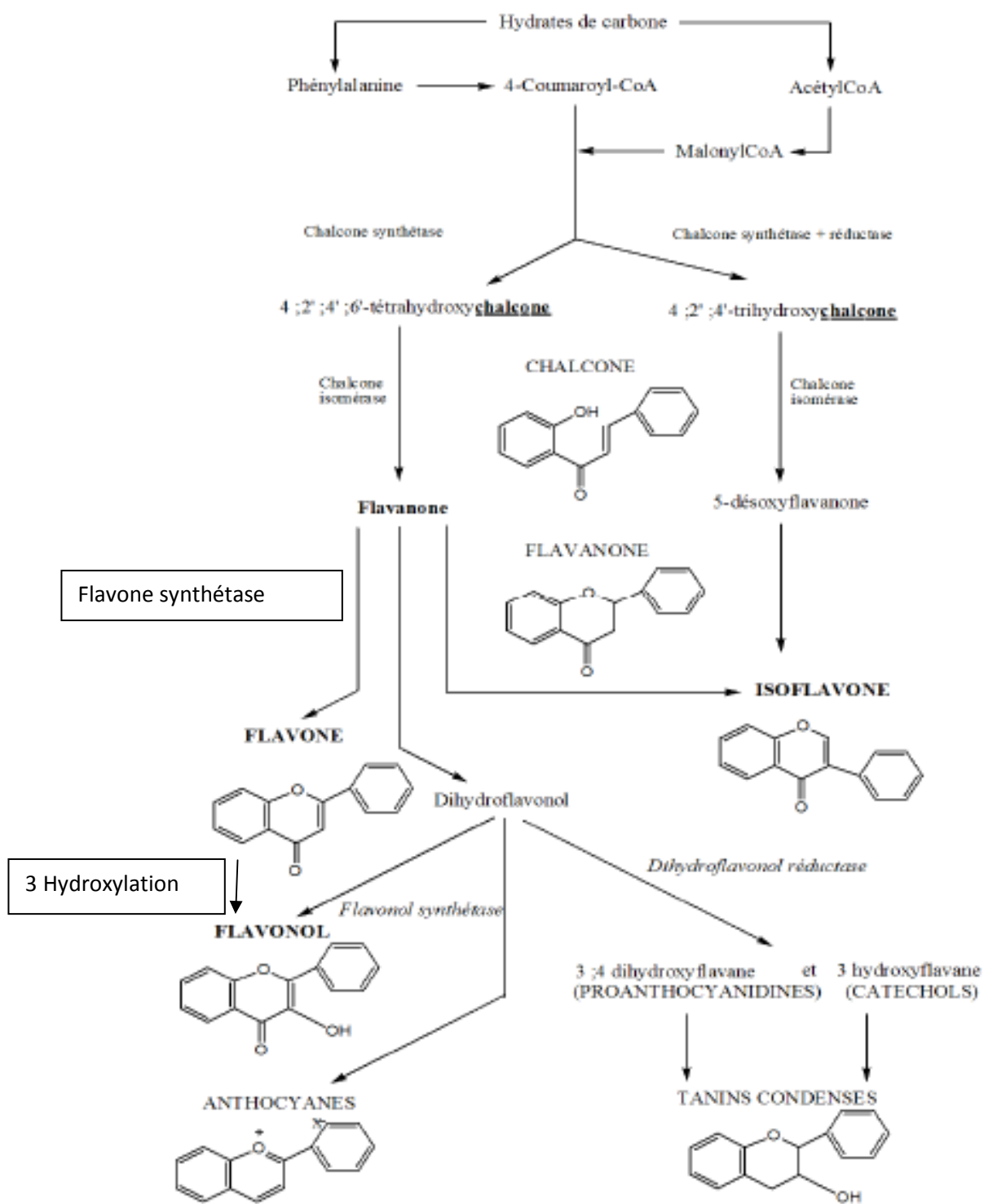


Figure 8 : Schéma de biosynthèse des flavonoïdes d'après Remesy, 1996

recouvre tous les côtés de la surface d'une bactérie). Elle est aérobie stricte, sa température optimale est de 40 degrés (espèce mésophile). Enfin, son temps de génération est d'environ 26 minutes. Les conditions optimales de croissance de cette souche se situent pour un pH compris entre 5,5 et 8,5, et à une température de 10°C à 50°C. Comme d'autres espèces, *Bacillus subtilis* peut se constituer une coque protectrice dure (endospore) lui permettant de tolérer des conditions environnementales difficiles ou extrêmes, mais contrairement à plusieurs autres espèces bien connues, *B. subtilis* est une aérobie stricte. Il peut produire ou co-produire des biofilms qui peuvent abriter d'autres espèces, éventuellement pathogènes. *B. subtilis* n'est pas considéré comme pathogène pour l'Homme, mais elle peut contaminer des aliments et peuvent exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire.

-***Staphylococcus. aureus*** est une bactérie anaérobie facultative préférentielle, de la famille des micrococcaceae, ce sont des coques gram positif arrondis d'environ 1 µm de diamètre, immobile, dépourvus de spores, ils possèdent une capsule polysaccharide. Elle se développe bien sur les milieux minimums (milieux de bases). C'est une bactérie mésophile (37 °C de croissance optimale), neutrophile (pH 7 optimal) et halophile (se développe à de fortes concentrations de NaCl). Elle est aussi relativement résistante aux inhibiteurs bactériens comme le cristal violet et le tellurite de potassium. *S. aureus* possède aussi de nombreuses résistances aux antibiotiques qui varient selon les souches. (Rayan et al., 2004).

-***Candida albicans*** est un champignon luviriforme unicellulaire asexué de taille moyenne, c'est l'espèce de levure la plus importante et la plus connue du genre *Candida*. Elle provoque des infections fongiques (candidiase ou candidose) essentiellement au niveau des muqueuses digestive et gynécologique.

Tableau 5. Pathologies causées par les germes cibles utilisés pour l'antibiogramme des Polyphénols.

Germes à testés		Pathologies
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	- staphylococcies cutanées, sous cutanées et muqueuses - toxi-infection-alimentaire - entéocolites aiguës
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC9372	- intoxications alimentaires - indicateur utile de manque d'hygiène
Bactéries à Gram négative	<i>Escherichia coli</i> ATCC24157	- infections intestinales, - gastro-entérites - méningite néo natale - crampes abdominales avec diarrhée - cystite (infection limitée à la vessie sans fièvre) - pyélonéphrite (infection du rein avec fièvre) - colites hémorragiques
Levure	<i>Candida albicans</i> CLM	-atteinte oculaire, broncho-pulmonaire, cardiaque, neurologique et digestive

4-Traitement multi varié

L'analyse multi variée permet de rendre perceptible les proximités entre les individus sur les quelles des mesures ont été faites (Saporta, 1990).

4-1- Analyse en composante principale (A.C.P)

C'est une méthode descriptive, elle permet de visualiser l'information contenue dans le tableau de données quantitatives (Diday , 1979).

-Principe de l'analyse en composante principale

Le principe de la méthode est d'obtenir une représentation approchée du nuage des n individus dans un sous espace de dimension faible, ceci s'effectue par projection.

Matériels et Méthodes

1-Matériels

1-1- Matériels biologiques

1-1-1-Matériel végétal

Notre étude a portée sur 15 individus de l'espèce *Aerva javanica* dans la région de Tamanrasset dont 8 individus récoltés au mois de Mars 2010 à oued Amsel d'une Altitude de 1254m et de longitude 5°30,816 E et d'une latitude de 22°40-644 N et 7 individus récoltés au mois décembre 2011 à In Tounene .

La partie utilisée de la plante est l'appareil aérien (tige feuille fleurs) que nous avons mis à sécher à l'air libre et à l'abri de la lumière et l'humidité ensuite couper en petits morceaux puis broyé à l'aide d'un moulin à café électrique jusqu'à obtention d'une poudre fine.

I-1-2-Matériel microbiologique

Les tests antibactériens ont été réalisés sur les souches suivantes:

-les bactéries Gram +

Staphylococcus aureus **ATCC 6538**

Bacillus subtilis **ATCC 9372**

-la bactérie Gram -

Escherichia coli **ATCC 4157**

-la levure

Candida albicans **ATCC 24443**

Ces souches proviennent du laboratoire de microbiologie du CRD Sidal

1-1-3- Matériel Animal

Les tests pharmacologiques ont été réalisés sur des souris albinos dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Régime alimentaire : alimentation : granulés; boisson : eau de ville)
- poids : $25\text{g} \pm 5\text{g}$
- Conditions d'élevage :
(Température : 20 à 24 °C; humidité : 50 à 65 %; éclairage : 12 h/j.)

1-2-Matériel non biologique

1-2-1-Milieus de culture

Pour les bactéries, nous avons utilisé le milieu Müller Hinton à l'état solide (gélose) vu sa richesse en nutriments nécessaires à la croissance des microorganismes, ce dernier est utilisé pour réaliser les épreuves de sensibilité des bactéries pathogènes, sa composition chimique est la suivante (Eyquena et *al.*, 1998) :

infusion de viande de bœuf déshydratée.....	300 g
amidon de maïs.....	17.5 g
agar agar.....	1.7 g
eau distillée.....	100 ml
PH final.....	7.4
[Ca^{2+}].....	5-100 mg / l
[Mg^{2+}].....	25-35 mg / l

Pour la levure, nous avons utilisé le milieu Sabouraud dont la composition est la suivante :

Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar Agar.....	15g
Eau distillée.....	1000ml

1-2-2-Médicaments

Différents disques d'antibiotiques ont été utilisés notamment : céfotaxime, vancomycine, miconazole.

Céfotaxime pour *Escherichia coli*.

Chloramphénicol pour *Bacillus subtilis*.

Vancomycine pour *Staphylococcus aureus*

Miconazole pour *Candida albicans*

2-Méthodes

2-1-Méthode d'extraction des composés phénoliques (flavonoïdes et Acides phénols)

Nous avons suivi le protocole mis au point par Lebreton et al en 1967 à partir d'un schéma initial de Bate-Smith en 1954 puis modifié par Ouafi 2007.

2-1-1 Extraction hydrolytique (fig9)

Les principales étapes du protocole consistent en :

-une hydrolyse chlorhydrique à chaud du matériel végétal qui provoque la libération des aglycones flavoniques de leur O-glycosides.

-un épuisement de la phase aqueuse hydrolytique par l'éther diéthylique permet l'extraction et le dosage des aglycones et laisse les anthocyanidines et les C-glycosides en phase aqueuse.

Dans un bécher nous mettons 1g de poudre végétale au contact de 80ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2N dans un bain Marie à une température de 40°C pendant 40mn. Sans oublier d'insuffler de l'air dans le bécher à l'aide d'une pipette Pasteur toutes les 10mn afin que les prothocyanidines se transforment en anthocyanidines correspondantes par oxydation. Après refroidissement le décocté est transféré dans une ampoule à décanter dans laquelle nous effectuons trois bains successifs de 50ml d'éther diéthylique chacun.

Nous obtenons deux phases : une supérieure appelée épiphase et l'autre inférieure appelé hypophase.

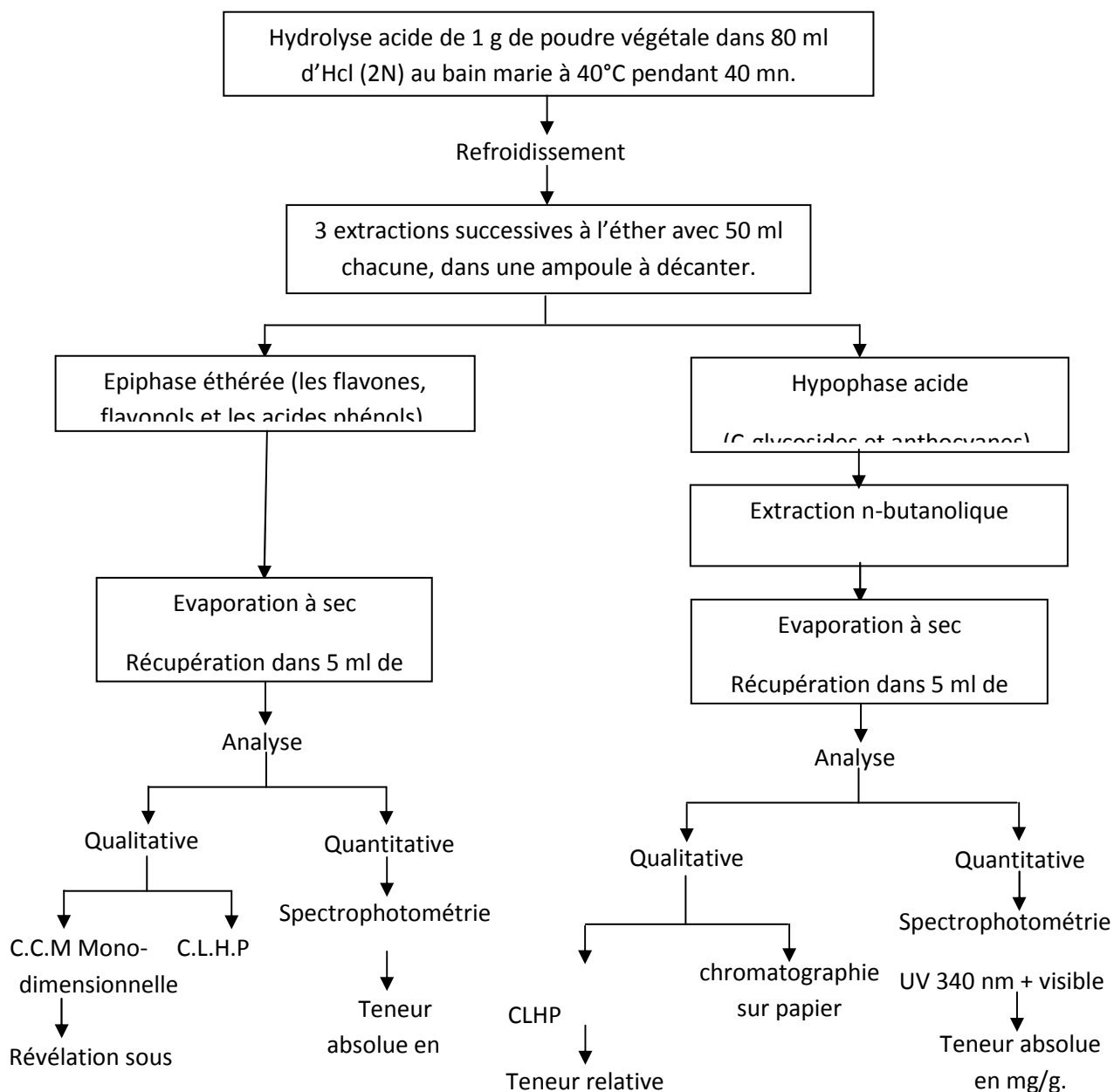


Figure 9: Protocole expérimental d'extraction des flavones – flavonols, anthocyanes, acides phénols et des C-glycosides d'après Lebreton., 1967 modifié par Ouafi 2007.

Dans un bécher nous mettons 1g de poudre végétale au contact de 80ml d'acide chlorhydrique (HCl) 2N dans un bain Marie à une température de 40°C pendant 40mn. Sans oublier d'insuffler de l'air dans le bécher à l'aide d'une pipette Pasteur toutes les 10mn afin que les prothocyanidines se transforment en anthocyanidines correspondantes par oxydation. Après refroidissement le décocté est transféré dans une ampoule à décanter dans laquelle nous effectuons trois bains successifs de 50ml d'éther diétylique chacun.

Nous obtenons deux phases : une supérieure appelée épiphase et l'autre inférieure appelé hypophase.

Epiphase éthérée : apparaît jaunâtre elle contient les aglycones flavoniques (flavones et flavonols) et les acides phénols. Elle est récupérée après chaque bain d'éther diétylique dans une boîte de pétrie et mise sous hotte ventilée. Après évaporation le résidu sec est récupéré dans 5ml de méthanol et conservé au frais.

Hypophase acide : apparaît brunâtre elle contient les C-glycosides et les anthocyanes. Cette phase est récupérée et rajoutée à 50ml de n- butanol , après 30mn de décantation l'épiphase est récupéré dans une boîte de pétrie et mise sous hotte ventilée. Après évaporation le résidu sec est récupéré dans 5ml de méthanol et conservé au frais.

Les deux extraits obtenus serviront pour une analyse quantitative par spectrophotométrie UV visible et une analyse qualitative par chromatographie sur couche mince (C.C.M), chromatographie sur papier(C.P) et par chromatographie liquide à haute performance(C.L.H.P).

2-1-2 Extraction des aglycones libres (Ouafi,2007) fig.10.

Nous mettons à macérer 1g de poudre végétale dans 50ml d'éther diéthylique pendant 30mn. On récupère la phase étherée qui contient les aglycones libre dans une boîte de pétrie puis nous la mettons sous hotte ventilée. Le résidu sec est récupéré dans 5ml de méthanol qui sera conservé au frais pour une analyse quantitative par spectrophotométrie UV visible .

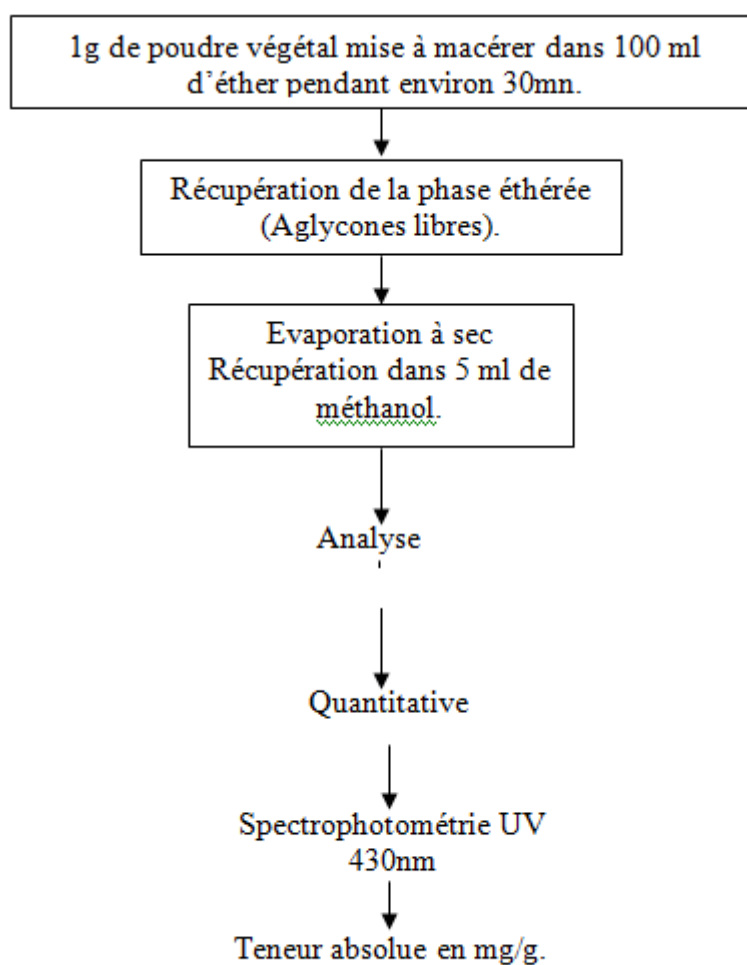


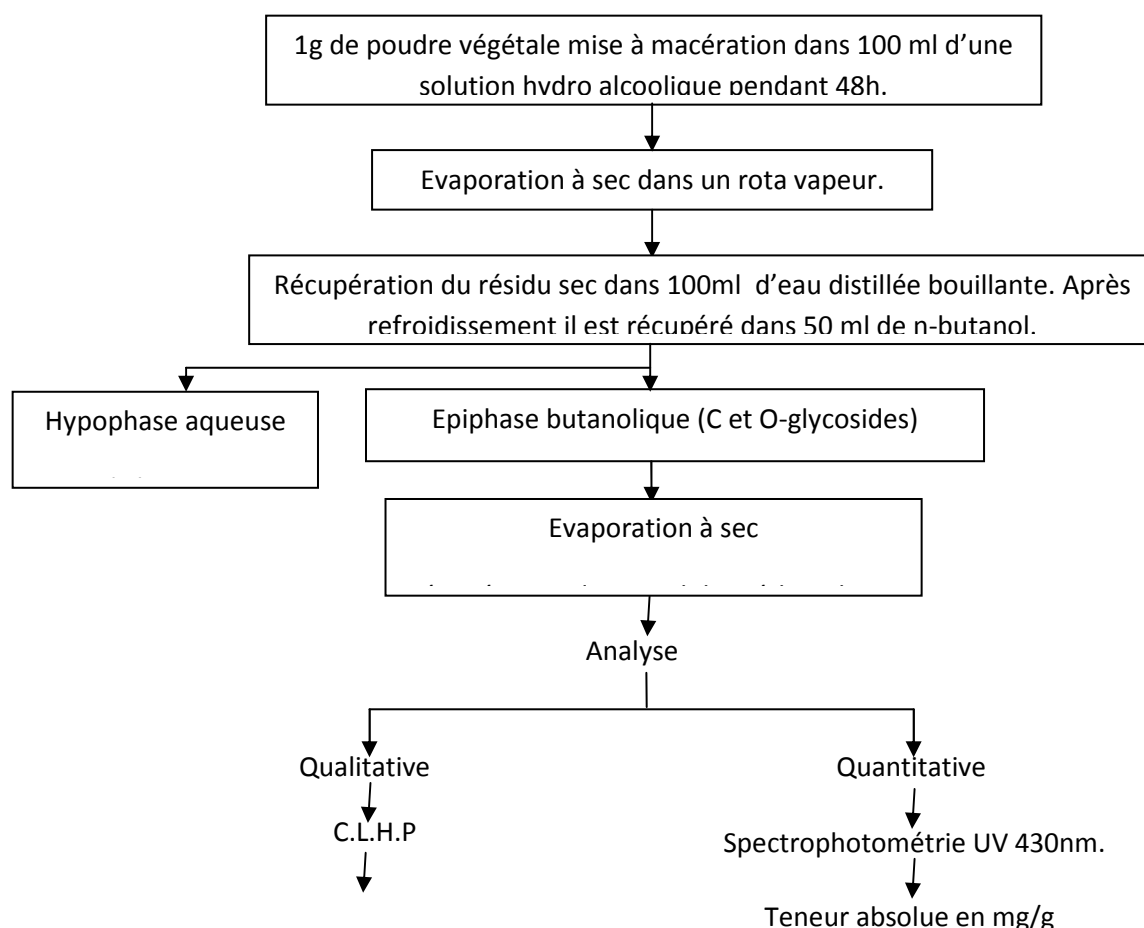
Figure 10 : Protocole expérimental d'extraction des aglycones libres selon Ouafi(2007).

2-1-3 Extraction des hétérosides flavoniques, macération hydro-Ethanolique (Harbone,1973).fig.11.

Nous introduisons 1g de poudre végétale dans un bécher puis nous rajoutons 100ml de solution hydro alcoolique (éthanol à 70°/ eau 30) après macération pendant 48h. Le mélange est évaporé à sec dans un rota vapeur jusqu'à ce qu'il sèche ensuite nous récupérons le résidu sec dans 100ml d'eau distillée bouillante. Une fois le mélange refroidit il est décanté avec 50ml de n-butanol dans une ampoule à décanter pendant 30mn. Deux phases apparaissent (Harbone, 1973) :

Une hypophase aqueuse brunâtre qui sera éliminée.

une épiphase butanolique verdâtre qui contient les hétérosides flavoniques (C-glycosides + O-glycosides) que nous récupérons et mettons à évaporer sous hotte ventilée. L'extrait sec est récupéré avec 5ml de méthanol et conservé au frais pour des dosages quantitatifs et qualitatifs.



**Figure 11 : Protocole expérimental d'extraction des hétérosides
d'après Harbone (1973).**

2-2 Techniques d'analyse qualitative

2-2-1 Techniques chromatographiques

La chromatographie est aujourd'hui, une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes.

2-2-1-1-Chromatographie de partage sur papier (C.P).

Elle est utilisée dans le but de déterminer la composition chimique en anthocyanes de *Aerva javanica*.

Son principe est basé sur le phénomène de partage qui utilise la différence de solubilité dans un solvant, qui se déplace par capillarité au sein d'une couche de papier wathman (Kamoun., 1987).

- **Phase mobile (solvant)**

Elle est constituée par un mélange de solvants non miscibles . Le solvant de développement utilisé pour la séparation des anthocyanes est le forestal : acide acétique, eau distillée, acide chlorhydrique (30/10/3).

Le développement du chromatogramme dure 16 heures (Lebreton et Netien., 1967).

- **Phase stationnaire (papier)**

L'analyse qualitative des anthocyanes est effectuée sur une grande feuille (59×46) cm de papier wathman N°03 car il est suffisamment épais et très résistant afin qu'il ne se déchire pas sous le poids du solvant. De plus le papier wathman N°03 permet d'isoler une quantité appréciable de substances et possède une grande capacité d'absorption. (Bourdon et Yonger., 1977).

- **Cuve**

C'est une cuve de verre de grandes dimensions sur laquelle repose un couvercle constitué par une plaque également en verre, dont les bords sont enduits de vaseline pour assurer une étanchéité parfaite afin d'éviter toute évaporation. La saturation de la cuve est obtenue deux heures environ après introduction de l'auge contenant le solvant pour maintenir une atmosphère saturée en vapeurs du solvant.

Protocole expérimentale

Pour déposer l'échantillon à séparer, nous traçons à l'aide d'un crayon une ligne horizontale à 10 cm au dessus du bord inférieur de la feuille pris dans le sens longitudinal car la chromatographie est descendante.

En suite sur la ligne horizontale tracée, nous effectuons à l'aide d'un capillaire de volumes de 10 µl des spots de l'extrait butanolique, de 2 à 3 cm de large en couches successives avec séchage après chaque dépôt. Ces spots sont distants entre eux de 15cm et disposés à 12 cm des deux cotés de la feuille, car la migration est irrégulière au voisinage des extrémités latérales, c'est ce qu'on appelle « effet de bord » (Kamoun., 1987).

Enfin, lorsque le développement est terminé, les feuilles sont retirées très soigneusement de la cuve et séchées à l'air libre.

• Révélation

Les taches des anthocyanes apparaissent à l'œil nu de couleur rouge, rouge orangé ou violacée. (Lebreton et Netien., 1967).

2-2-1-2 La chromatographie sur couche mince

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption : (L'adsorption est la fixation des molécules dissoutes par la phase fixe ; solide. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface entre l'adsorbant et la molécule adsorbée (liaison dipôle – ion ou liaisons Vander waals).

Elle s'applique aux molécules pures, aux extraits (mélange complexes de métabolites) et aux échantillons biologiques. Elle permet d'avoir une idée globale des métabolites présents dans un extrait ou une fraction. Permet un contrôle aisé et rapide de la pureté d'un composé lorsque les conditions opératoires sont bien déterminées. Elle permet également de suivre la progression d'une réaction étant donné qu'elle indique le nombre de composants dans un mélange réactionnel.

Dans cette étude cette technique a été utilisée dans le but de déterminer la composition chimique de la partie aérienne de *Aerva javanica* en flavones, flavonols, acides phénols et hétérosides.

Elle a presque totalement remplacé la chromatographie sur papier en raison de ses performances plus élevées du fait de l'utilisation de nouveaux supports récemment apparus et qui ont offert des efficacités notablement accrues.

La mise en œuvre d'une CCM nécessite plusieurs matériels tel que :

- Une cuve chromatographique : c'est un récipient en verre, de forme variable (selon les manipulations à effectuer) fermé par un couvercle maintenu étanche.
- Une phase stationnaire : c'est une couche d'absorbant étalé uniformément sur un support en aluminium ou en verre de dimensions variables (généralement 20 x 20 cm, 10 x 10cm ou 5 x 10cm) avec une épaisseur comprise entre 0.5 et 2 mm. L'adsorbant que nous avons utilisé est le gel de polyamide DC6 (Merck) qui permet la séparation de substances lipophiles et hydrophiles d'un mélange.
- La phase mobile : c'est l'éluant, il est composé d'un solvant unique ou d'un mélange de solvant qui migrent lentement le long de la plaque en entraînant les composants de l'échantillon déposé. Le choix du solvant dépend de la nature des substances à séparer, le solvant polaire sépare mieux les substances hydroxylés tandis que le solvant apolaire sépare mieux les substances peu hydroxylés (Ribereau -Gayon., 1968 ; Randerath., 1971).

Le solvant utilisé est un Solvant organique : Benzène, méthanol, méthyle éthyle cétone (40, 30, 30). (Jay et *al.*, 1975).

Protocole expérimental

- **Saturation des cuves**

Nous introduisons le solvant dans la cuve en verre de dimension (20,5×21×9) cm hermétiquement fermée pour s'assurer que l'atmosphère de la cuve de séparation soit saturée en vapeurs dégagées par le solvant. La saturation dure en moyenne deux heures de temps avant d'introduire les plaques.

- **Préparation des plaques**

Pour l'obtention de la phase stationnaire (support), nous avons préparé une suspension homogène par agitation de 10g de poudre de polyamide DC6 (Merck) à 55ml d'éthanol à 96°, la suspension homogène est uniformément étalée sur des plaques en verre préalablement rincées à l'alcools à l'aide d'un étaleur de plaque.

- **Dépôts**

Une fois les plaques séchées, l'extrait est spoté au moyen de capillaire très fin par petite quantité successive au même endroit, sur une ligne horizontale de 2 cm du bord inférieur de la plaque de chromatographie car la chromatographie est ascendante. Entre les dépôts nous procédons à un séchage à l'aide d'un sèche cheveux.

- **Développement (Figure 12)**

Les plaques tests sont introduites verticalement dans la cuve fermée contenant le solvant (phase mobile). Les dépôts restent toujours au-dessus du niveau de la phase mobile, cette dernière monte par capillarité en entraînant les différents solutés à des vitesses différentes.

(Hadj-Mahamed , 1992).

Au cours de ce travail nous avons utilisé :

- **C.C.M monodimensionnelle**

La chromatographie est développée dans une seule direction, elle est utilisée pour l'analyse qualitative des flavones, flavonols (aglycones), des acides phénols de l'extrait éthéré et des aglycones libres de la macération, en utilisant le solvant organique. Ce dernier présente une bonne séparation des taches en une seule et rapide migration.

La migration de l'échantillon dans la couche mince s'effectue par capillarité, on arrête l'expérience lorsque le front du solvant se trouve à quelques centimètres du bord supérieur de la plaque. La durée de ce développement est relativement rapide (Jay et *al.*, 1975). La plaque est ensuite séchée rapidement à l'air libre car les solvants sont très volatils.

- Les échantillons : ils sont le plus souvent solubilisés dans un solvant volatil qui n'est pas forcément le même que l'éluant. Les échantillons à analyser sont appliqués en petits spots sous forme de points ou de bandes sur l'absorbant. La plaque est déposée verticalement dans la phase mobile constituée, comme on a préalablement indiqué, par un ou plusieurs solvants organiques. Pour une bonne élution, la cuve contenant le solvant d'élution doit être saturée (figure 12).

Une fois le développement du chromatogramme effectué, la plaque est séchée à température ambiante puis examinée à l'UV (longueurs d'ondes $\lambda = 254$ nm et 365 nm). Si nécessaire, les taches

du chromatogramme sont révélées par pulvérisation de réactifs appropriés. On détermine alors, pour chaque constituant, le Rapport frontal :

$R_f = \text{Distance parcourue par le soluté} / \text{Distance parcourue par le solvant}$

$$R_f = d/D$$

- Le R_f est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant(solvant) déterminé sur un support «phase stationnaire» donné.
- Le R_f est le même, que le constituant soit pur ou dans un mélange.
- Le R_f ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange .

Pour déterminer le R_f il faut délimiter au moyen d'un crayon fin les taches révélées et marquer le centre de ces taches. Il faut ; ensuite mesurer les distances parcourues par le solvant (D) et les distances parcourues par les taches (d), les références frontales sont calculées par le rapport :

Les R_f obtenus expérimentalement sont comparés à ceux de la bibliographie et à ceux des témoins analysés dans les mêmes conditions chromatographiques (Audigie et Zous Zain., 1991).

Couleur des taches

D'après Markham (1982) les aglycones et les hétérosides émettent des fluorescences, en lumière ultraviolette (200-365) nm donnant ainsi :

➤ La fluorescence violette

Témoigne soit de l'absence d'un hydroxyle libre, soit de la présence d'un hydrogène en position 3, correspond ainsi aux flavones, C-glycosides et aux hétérosides.

➤ La fluorescence bleue ou bleu verdâtre

Témoigne de la présence d'un acide phénol.

➤ La fluorescence jaune

Indique la présence d'un groupement hydroxyle en position 3, correspond au flavonols.(Lauranson., 1989).

Fluorescence : pour les aglycones et les hétérosides elle est déterminée sous lumière UV 365 nm, pour les acides phénols sous UV à 260 nm. Par contre les anthocyanes sont visibles à la lumière du jour sous forme de spots rouges (Ouafi, 1987).

Les plaques de chromatographie étant très fragiles les résultats obtenus sont conservés en calquant le chromatogramme avec du papier transparent en notant les couleurs des taches observées. Ainsi les composés peuvent être identifiés en comparant leurs positions avec celle des composés connus et chromatographiés dans les mêmes conditions.

Cette technique nous a surtout permis d'acquérir une première approche de la composition flavonique de nos échantillons.

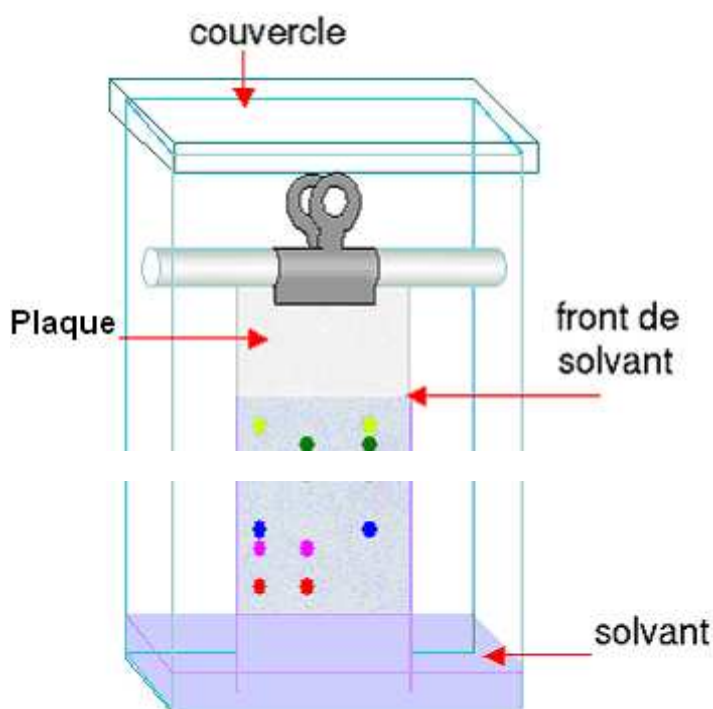


Figure 12: schéma du développement chromatographique d'une plaque

2-2-1-3-Chromatographie liquide à haute performance (C.L.H.P)

Avec l'objectif d'identifier les flavones –flavonols, les acides phénols et les glycosides flavoniques existants dans l'extrait brut, nous avons opté pour une méthode de choix très précise : c'est la chromatographie liquide à haute performance.

Principe

La C.L.H.P n'est pas une variété particulière de chromatographie dont le principe de séparation serait basé sur une méthodologie spéciale, applicable à tous les types de chromatographie en colonne avec élution en phase liquide. Elle utilise comme support des particules de faible diamètre, la pression nécessaire à l'élution est donc élevée. Elle nécessite l'emploi d'un appareillage lourd, dont le fonctionnement est contrôlé par ordinateur.

C'est une technique très pratique et très fiable pour la séparation de très faibles quantités de produits non volatils ou thermo-dégradables (comme les polyphénols) dans les mélanges les plus complexes. Cette capacité est directement liée à la faible dimension de la colonne et à la fine granulométrie de la phase stationnaire (Hostettman et *al.*, 1998).

La séparation des composés dépend de leurs affinités pour les deux phases non miscibles : une phase stationnaire et une phase mobile liquide.

L'échantillon à analyser est déposé au sommet de la colonne, la phase mobile va faire migrer les différents constituants de l'échantillon et ceci d'autant plus rapidement que leur affinité suivant un gradient de solvant (Lauranson., 1989).

- Appareillage de la C.L.H.P

L'appareillage de la C.L.H.P est représenté schématiquement sur la **(figure 13)**, il est constitué essentiellement de :

- deux réservoirs de la phase mobile.

- Un système de pompe assurant un mélange et un débit.
- Un système d'injection d'échantillon.
- Une colonne assurant la séparation des produits.
- Un système de détection et d'enregistrement.

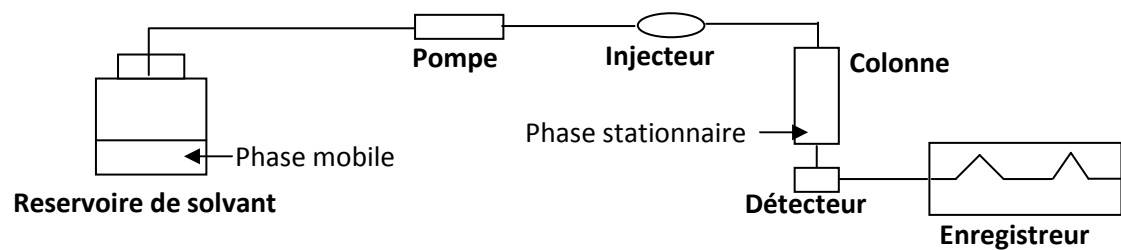


Figure 13 : Schéma fonctionnel d'un système typique de la C.L.H.P.

(Roberts et al., 1956).

- **Réservoir de la phase mobile**

Contrairement à la chromatographie classique, le volume de la phase mobile nécessaire est relativement réduit et elle peut être constituée par une seule substance ou par un mélange de deux ou plusieurs composés, d'autre part la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'analyse, c'est le fonctionnement avec gradient d'élution.

Pompe

La pompe a pour rôle de provoquer dans la colonne un écoulement de la phase mobile compatible avec la séparation chromatographique. Les pompes utilisées en chromatographie en phase liquide

sont soit à pression d'entrée et donnant une pression constante en tête de colonne, soit à débit et maintiennent un débit constant de la phase mobile pendant l'analyse.

- **Injecteur**

L'injection des échantillons à faibles quantités (20 µl) se fait par un dispositif d'injection automatique (Roberts et *al.*, 1956 ; Skoog et Holler., 2002).

- **Colonne**

Les colonnes utilisées en C.L.H.P se caractérisent par leur géométrie et par la nature des phases qu'elles contiennent. Elles sont remplies par voie humide sous pression. Pour la séparation des flavonoïdes il existe deux types de phases stationnaires (colonnes) généralement utilisées : la phase inverse en C18 nonapak et la phase inverse en C8 octadecylsilyl.

- **Système de détection et d'enregistrement**

Ils ont pour rôle de suivre la présence des composés dans la phase mobile au fur et à mesure de leurs élution. Les types de détecteurs les plus utilisés sont : les détecteurs UV visible et les réfractomètres différentiels (Yost et *al.*, 1981).

Protocole expérimentale

Nous avons soumis successivement les extraits bruts des: aglycones flavoniques obtenus après extraction acide, acides phénoliques, C- glycosides et les hétérosides flavoniques à l'analyse par C.L.H.P dans les conditions expérimentales suivantes :

a) Analyse des aglycones flavoniques et des acides phénoliques

Les aglycones flavoniques et les acides phénoliques ont été analysés selon le mode à gradient d'élution à la longueur d'onde 365 nm pour les flavones – flavonols et à la longueur d'onde 260 nm pour les acides phénols (Rostagno et *al.*, 2003)

- **Mode gradient d'élution**

Pour notre étude nous avons travaillé dans les conditions chromatographiques regroupées dans le tableau 6

Tableau 6 : Conditions et caractéristiques pour la CLHP

Matériels et produits	Types et caractéristiques
Colonne	Type: C18 nonapak ODS Hypersil 120 A°. Dimension : 250×4.6 mm ; 5µm.
Pompe	Débit : 0.8 ml/mn.
Détecteur multifaisceaux	260nm ≤ λ ≤ 380 nm
Solvant	Solvant A : Acide acétique à 2%. Solvant B : Méthanol.

Après le choix de la phase mobile et de la phase stationnaire, nous avons mis au point un programme d'élution selon le tableau 7:

Tableau 7 : Conditions opératoires pour la séparation et l'identification des flavones – falvonols et des acides phénoliques de *Aerva javanica* (Burm) en mode gradient d'élution de la phase mobile.

Temps (mn)	Solvant B (%)	Solvant A (%)
0	5	95
30	70	30
40	70	30
44	5	95
+44	5	95

b)-Analyse des C-glycosides et des hétérosides

Les C-glycosides et les hétérosides sont séparés en mode gradient d'élution avec le même appareil utilisé pour l'analyse des aglycones et des acides phénoliques, à la longueur d'onde $\lambda=370$ nm correspondant au maximum d'absorption de ces composés.

La phase mobile est constituée par les deux solvants suivant et selon un programme d'élution comme suit :

Solvant A : eau/ acide acétique (98 :2)

Solvant B : Acétonitrile/ eau/ acide acétique (79 :19 :2)

Tableau 8 : Programme d'élution pour la séparation des hétérosides

Temps (mn)	Solvant B (%)	Solvant A (%)
0	12	88
20	17	83
30	22	78
45	37	63
60	40	60
65	70	30
68	70	30
73	12	88
83	12	88

La présence d'acide acétique dans les solvants contribue à obtenir une meilleure résolution, la présence d'eau peut réduire la force d'élution et l'acétonitrile est un solvant très adéquat pour la séparation des glycosides sur colonne en phase inverse (Hutabarat et *al.*,2000).

D'autres solvants sont aussi connus tel que le méthanol mais il présente des forces d'élution plus spécifiques pour les aglycones sur ce même type de colonne.

Nous avons injecté des étalons en même temps et dans les mêmes conditions que les échantillons, ils sont illustrés dans le tableau 9 avec leurs temps de rétention.les profils HPLC des étalons sont représentés en annexe1.

Tableau 9 : les temps de rétention des étalons flavoniques

Témoins	Temps de rétention en mn
Acide ascorbique	3.594
Acide caféique	14.399
Acide cinnamique	28.252
Acide gallique	5.667
Acide sinapique	19.497
Acide vanillique	14.769
Kaempférol	30.034
Lutéoline	28.538
Myricétine	23.474
Quercétine	27.116
Quercétine 3 -B-D- glucoside	29.925
Vitexine 2' O- Rhamnoside	27.686
Rutine hydrate	28.300
Rutine tri hydrate	28.513

2-3-Analyse quantitative

C'est une analyse qui a été menée par la technique spectrophotométrique UV-visible

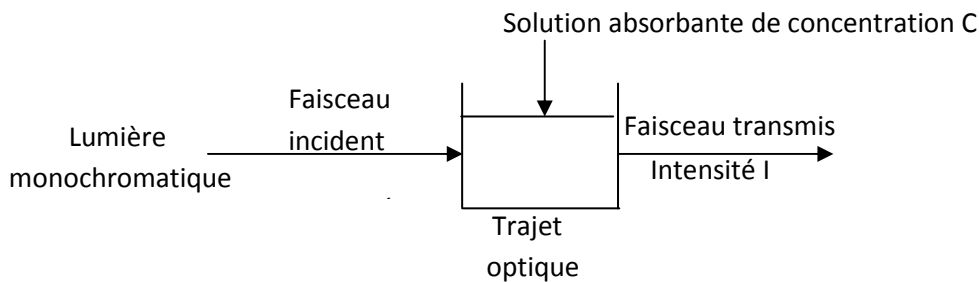
2-3-1 Par Spectrophotométrie

C'est une méthode couramment employée pour la détermination de la concentration d'un composé qu'il soit natif ou qu'il résulte d'une hydrolyse acide. Méthode colorimétrique qui se prête bien à une évaluation quantitative des flavones- flavonols, des anthocyanes et des hétérosides présents dans les extraits végétaux.

Principe

Sous le terme de colorimétrie, on rassemble aujourd'hui de façon générale les techniques de mesure physico-chimiques par des solutions colorées, utilisées pour l'évaluation quantitative de la substance dissoute (Schwedt., 1993). Elle se base sur la propriété de certains composés qui absorbent davantage la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques avec le spectrophotomètre UV visible (Plummer., 1989).

Elle permet de réaliser des dosages grâce à la loi de Beer Lambert qui montre une relation de proportionnalité entre l'absorbance et la concentration aussi bien que l'étude structurale des complexes par l'étude des spectres d'absorptions (Meyer., 1999).



La loi de Beer Lambert : $\log I_0/I = K \cdot e \cdot c$

I_0 : lumière incidente.

I : lumière émergente.

e : épaisseur de la substance colorée.

c : concentration de la substance.

k : coefficient d'extinction lié à la nature de la substance et à la longueur d'onde.

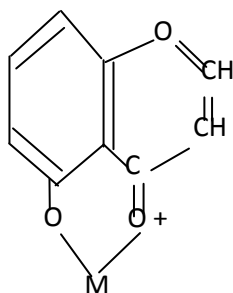
Au cours de notre travail nous avons utilisé le spectrophotomètre UV- visible UVIKON 941 plus, ce dernier comprend deux sources S1 (lampe au deutérium) et S2 (lampe tungstène - halogène) et deux cuves V1 (cuve témoin) et V2 (cuve essai). La lecture de la densité optique des extraits est précédée du réglage zéro d'absorbance (100% de transmission) avec du méthanol pure.

Le protocole que nous avons suivi pour la mesure des densités optiques (D.O) est décrit par Jurd (1962) repris par Mabry et *al.* (1970) et complété par Voirin (1983).

Formation des complexes avec les métaux (le chlorure d'aluminium) :

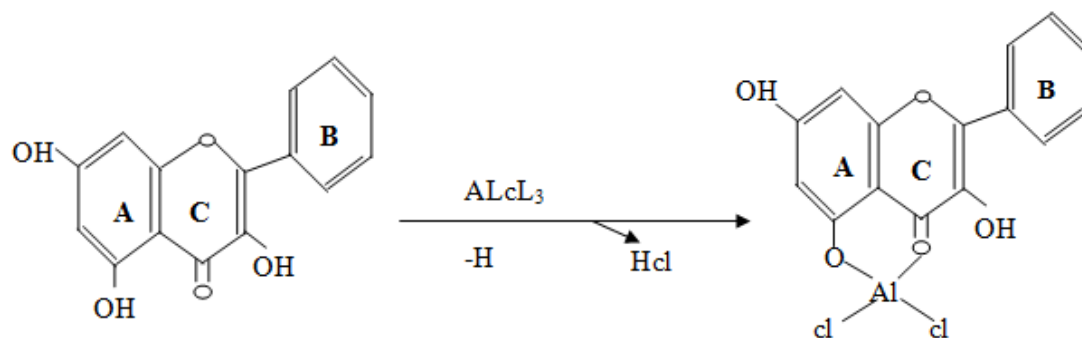
La formation par chélation de complexes entre les composés phénoliques et les métaux est largement utilisée pour la réalisation des spectres d'absorption.

Jurd et Geissman en 1956 ont représenté l'ion métallique intervenant dans la formation du complexe quelque soit le réactif utilisé $AlCl_3$, $FeCl_3$, Ce ci traduit le fait que le métal ait perdu deux électrons pour s'unir à deux O_2 de la molécule phénolique agissant comme donneur d'électrons :

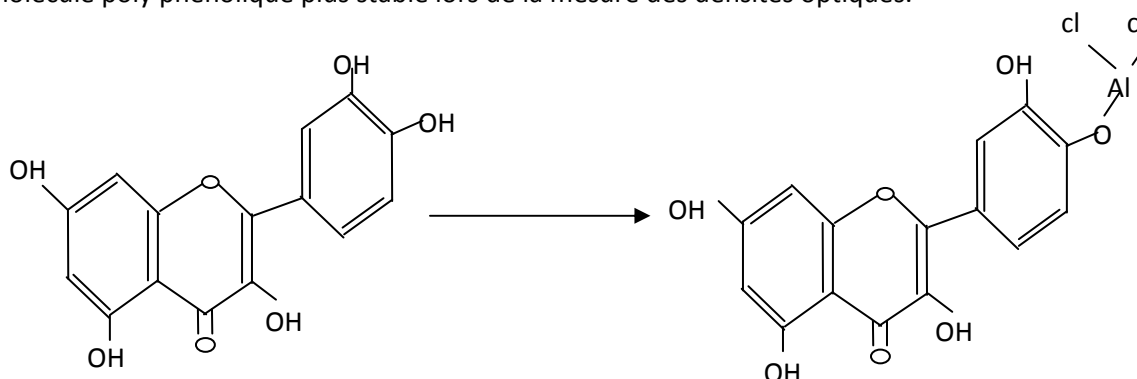


Le réactif utilisé dans notre travail est le $AlCl_3$ (chlorure d'aluminium). Ce dernier est préparé en solution méthanolique à 1%.

Le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) fait intervenir les propriétés chélatantes des ions (Al^{3+}) à l'égard des composés phénoliques et forme un complexe avec les composés ayant un hydroxyle en position 3 ou 5 comme suit :



Mabry et *al.*, 1970 ont montré que le chlorure d'aluminium, formait dans le méthanol un complexe avec les systèmes orthodihydroxyles (4'-5' dans le noyau B, 6-7 dans le noyau A), cette réaction rend la molécule poly phénolique plus stable lors de la mesure des densités optiques.



Mode opératoire

Le dosage différentiel spectrophotométrique des extraits aglyconiques et hétérosidiques fait intervenir les propriétés chélatantes des ions Al^{3+} sur les composés. Il est donc nécessaire de préparer pour chaque extrait à analyser deux solutions :

- Une solution référence (témoin) composée de : (X= 4 ml) de méthanol + (Y= 1ml) de la solution à doser.
- Une solution test (essai) composée de : (X= 4 ml) de chlorure d'aluminium à 1% dans le méthanol + (Y= 1 ml) de la solution à doser.

Par contre le dosage spectrophotométrique des anthocyanes et des C-glycosides ne fait pas intervenir les propriétés chélatantes des ions Al^{3+} sur les composés.

a) Dosage des flavones- flavonols

Les deux séries de solution (témoin, essai) sont passées dans le spectrophotomètre pour lecture à 430 nm. La teneur absolue en aglycones totaux est exprimée comme quercétine selon la formule suivante (Lauranson., 1999) :

$$T \text{ (mg/g)} = DO. M. V.d/p$$

DO : densité optique du pic différentiel.

V : volume de la solution méthanolique d'aglycone en ml (5ml).

M : masse moléculaire de la quercétine (M : 302).

P : poids sec du matériel hydrolysé en gramme (2g).

d : facteur de dilution éventuel (5): $\frac{X+Y}{Y}$

Soit :

$$T \text{ (mg/g)} = 1.3. 10^{-2} DO.V. d/p$$

b) Dosage des anthocyanes

La lecture des extraits s'établit par spectrophotomètre à 520 nm et la teneur absolue en anthocyanes est calculée par la formule suivante :

$$T \text{ (mg/g)} = \eta DO / E .M.V.d/p$$

DO : densité optique.

V : volume de la phase méthanolique (5ml).

d : facteur de dilution (5).

M : masse moléculaire de la procyanidine (M =306).

P : poids sec du matériel végétal sec hydrolysé (2g).

E : coefficient d'absorption molaire de l'orientine égale à 18850

η : Facteur de corrélation du rendement de l'oxydation des proanthocyanidines en anthocyanidines.

Soit :

$$T \text{ (mg/g)} = 5.2. 10^{-2} \text{ DO. V. d/p}$$

c) Dosage des C- glycosides

La lecture des extraits s'établit également par spectrophotométrie mais à 340 nm et la teneur absolue en C-glycosides est exprimée en orientine et elle est calculée par la formule suivante (Lauranson., 1999) :

$$T \text{ (mg/g)} = \text{Do/E} . M. V. d/p$$

DO : densité optique.

V : volume de la phase butanolique mesurée après concentration à l'HCl 2N (5ml).

d : facteur de dilution (5).

M : masse molaire de l'orientine égale à 448g.

P : poids sec du matériel (2g). E : coefficient d'absorption molaire de l'orientine égale à 18850.

Soit :

$$T \text{ (mg/g)} = 2.5 \cdot 10^{-2} \text{ DO} \cdot V \cdot d/p$$

d) Dosage des hétérosides

Comme pour les aglycones, les hétérosides sont dosés au spectrophotomètre à 430 nm.

Parallèlement des dilutions sont préparées à partir d'une solution mère de rutine à 8‰ dans le méthanol (Tableau 10), pour établir une courbe d'étalon (Figure 14). L'extrapolation de D.O différentielles sur la courbe étalon permet de connaître la teneur absolue des hétérosides en mg/g.

Tableau 10 : Dilutions préparé à partir d'une solution mère à 8‰.

[Rutine] 8‰	8	4	2	1.3	1	0.8
D.O	0.405	0.28	0.135	0.09	0.06	0.051

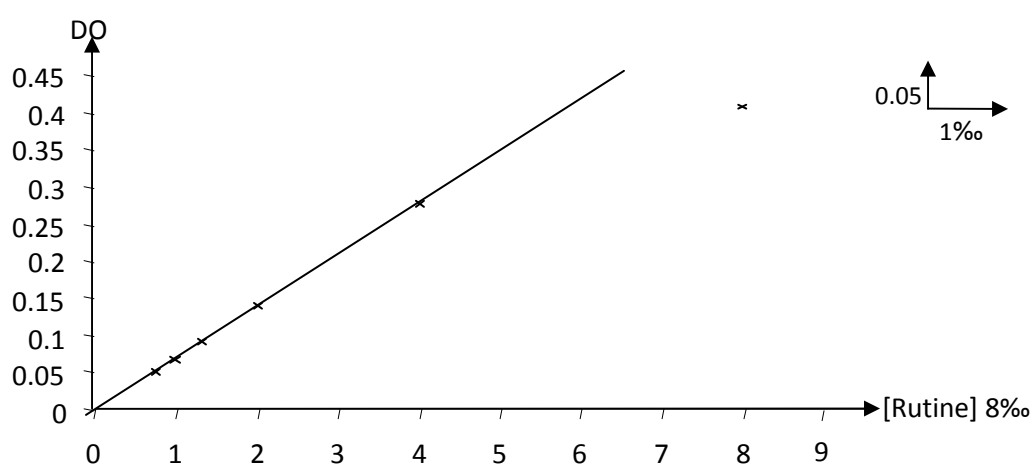


Figure 14: Courbe étalon obtenue à partir d'une solution mère de rutine à 8‰.

2-4 Analyse statistique des données

Les teneurs absolues déterminées par le dosage spectrophotométrique sont traitées pour une évaluation de la biodiversité intra spécifique de *Aerva javanica* par rapport aux 4 variables phénoliques. La mise en œuvre de ce traitement s'est faite à partir des logiciels Winstat , dont l'Analyse en composante principales (ACP) qui revient à comparer les variables entre elles (Legendre et Legendre, 1994). En effet, nous avons établi une ACP à partir de la matrice de corrélation des données brutes (les écarts-types relatifs aux variables étant hétérogènes).

Par la suite, nous avons projeté le nuage des individus (observations) dans l'espace des variables.

2-5- Tests microbiologiques

Le but de ces tests est de mettre en évidence une éventuelle activité antimicrobienne (bactéries Gram+ et Gram- et levure) des composés phénoliques extraits des feuilles d'*Aerva javanica*.

Il existe quatre extraits polyphénoliques de la plante à tester (extrait des flavones-flavonols après hydrolyse acide, aglycones libres, C-glycosides et des hétérosides).

2-5-1. Evaluation qualitative de l'activité antimicrobienne

C'est une méthode dont le principe est tiré de la pharmacopée européenne pour étudier la résistance des souches bactériennes et des levures.

- Principe

L'évaluation qualitative de l'activité antibactérienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes dont la concentration est de 10^6 - 10^7 germes. ml⁻¹ (Cavallo, 2006) mis au contact des polyphénols de *Aerva javanica*, et ceci par la méthode de diffusion sur gélose en utilisant des disques absorbants stériles.

Les disques absorbants de 9 mm de diamètre sont imprégnés d'une quantité des différents extraits et déposés sur une gélose inoculée par les souches testées. La diffusion de ces extraits au sein de la gélose permet d'observer après incubation, en cas d'action bactéricide une zone claire autour du disque appelée zone d'inhibition.

- Protocole expérimental

Cette technique est basée sur l'utilisation de deux couches de gélose dont l'une est inoculée avec le germe testé.

*** Préparation de la première couche de milieu**

Le milieu de culture, MH est fondu dans un bain-marie à 60°C puis coulé aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre (15- 20 ml / boîte). La gélose est mise à refroidir et à solidifier sur la paillasse.

***Préparation de l'inoculum**

A partir d'une jeune culture de 24 heures pour les bactéries et 48 h pour les levures, nous réalisons des suspensions en prélevant avec une anse flambée au bec bunzen 3 à 5 colonies bien isolées que nous déposerons dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis nous agitons pendant quelques secondes. Une lecture de l'absorbance au spectrophotomètre est réalisée à une longueur d'onde de 620 nm et qui doit être comprise entre 0.22 et 0.32 pour les bactéries sauf pour *staphylococcus aureus* qui est entre 0.3 et 0.4. Elle est comprise entre 2 et 3 pour la levure. L'ensemencement doit se faire dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.

***Préparation de la deuxième couche de milieu**

Nous ensemençons 200 µl de chaque suspension microbienne dans 50 ml de MH pour les bactéries et 50 ml du milieu GS pour les levures et on agite les flacons.

Nous déposons rapidement 4 ml de chaque milieu inoculé en deuxième couche sur la surface des boîtes contenant déjà la première couche de gélose solidifiée. Nous faisons pivoter la boîte sur elle-même pour avoir une surface uniforme et nous laissons solidifier.

***Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérile, nous prenons un disque stérile dont nous imbibons l'extrémité par l'extrait à tester qui sera absorbé progressivement jusqu'à imprégnation totale du disque. Ce dernier est déposé sur la surface de la gélose. Nous laissons diffuser 30 mn. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et 48h à 25°C pour la levure.

***Lecture**

L'activité biologique se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition de la croissance microbienne autour du disque contenant l'extrait à tester. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé. Le résultat de cette activité est exprimé par le diamètre de la

zone d'inhibition (l'échelle de performance de Chifundera). Les souches sont considérées comme résistantes, peu sensibles, sensibles, très sensibles quand les diamètres de la zone d'inhibition sont respectivement de:

$D < 9 \text{ mm}$ / $10 \text{ mm} \geq D \leq 16 \text{ mm}$ / $16 \text{ mm} \geq D \leq 22 \text{ mm}$ / $D > 22 \text{ mm}$ (Chifundera, 1990).

2-6 -Etude pharmacologique

La réalisation de cette étude a été faite au laboratoire de pharmacologie du C.R.D. Elle nous a permis de tester l'activité antalgique d'*Aerva javanica*.

2-6-1- Activité antalgique (technique du Cramping test à l'acide acétique a 1%)

- Principe

Le principe consiste en l'évaluation de l'activité antalgique d'un produit par injection intra péritonéale d'acide acétique chez la souris afin de provoquer une réaction douloureuse qui se manifeste par des mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures (crampes), qui peut être réduite par un produit antalgique.

Cette étude permet de comparer la réduction du nombre de crampes après administration de doses égales du produit antalgique et du produit de référence correspondant.

-Produit à tester : Extraits (butanolique, étheré et hétérosidique) d'*Aerva javanica*.

-Produit de référence (Fèldène).

- Protocole expérimental

L'étude a porté sur 50 souris divisées en quatre lots de dix souris chacun de même sexe, nourris avec des granulés, abreuvés avec de l'eau du robinet et maintenus en stabulation dans une animalerie à T° 20-24°C, H 50% et éclairage de 10h .

Les souris sont mise à jeun la veille du test .Elles sont ensuite pesées et numérotées de 01 à 10 et cela pour les différents lots : Témoin, Essai1 : extrait butanolique, Essai2 : extrait étheré, Essai3 : extrait hétérosidique, Essai4 : référence Fèldène. **Fig 15a**

A T=0 min: T : temps

Les souris du lot Témoin reçoivent par voie intragastrique 0.5 ml d'eau physiologique à 0.09%. **fig15 b**

Les souris du lot E1B (extrait butanolique) reçoivent toutes par voie intragastrique un volume de 0.5ml d'extrait butanolique dilué 5fois.

Les souris du lot E2E (extrait étheré) reçoivent toutes par voie intragastrique un volume de 0.5ml d'extrait étheré dilué 5fois.

Les souris du lot E3H (extrait hétérosidique) reçoivent toutes par voie intragastrique un volume de 0.5ml d'extrait hétérosidique dilué 5fois.

Les souris du lot E4F (Fèldène : produit de référence) reçoivent toutes par voie intra gastrique une dose de 1 comprimé =20mg (Fèldène). sous un volume de 0.5ml par souris. **Fig 15c**

A T=30min : T : temps

Injection de 0.2 ml d'acide acétique à toutes les souris (lot Témoin, lots E1B, E2E, E3H, E4F) par voie intra péritonéale **fig15 d**

A T=35min : T : temps

Comptage des crampes chez toutes les souris des 5 lots (lot Témoin, lots E1B, E2E, E3H, E4F) Par observation directe pendant 10 mn .**fig15 e**

Résultats

- Calculer les moyennes arithmétiques et la variance des crampes pour chaque lot

La moyenne= $\sum xi/n$ la variance : $s^2= \sum xi^2-1/n(\sum xi)^2/n-1$

- Calculer le pourcentage de réduction de crampes (pourcentage de protection) chez les souris traitées par rapport aux témoins
- % de protection = $\frac{\text{moyenne des crampes du lot T} - \text{moyenne des crampes du lot E}}{\text{moyenne des crampes du lot T}} \times 100$
- L'étude statistique sera calculée selon la loi de Student $t = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{s^2/n_1 + s^2/n_2}}$
 $s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$



Fig15.a : numérotation des souris



fig .15b injection par voie
intragastrique



Fig15.c. injection de 0.5ml des produits à tester



fig .15d. .injection par voie
intrapéritonéale



Fig.15e. souris en plein crampe

Figure : 15 Les étapes du protocole expérimentale du test antalgique

Résultats et Discussions

1-Etude biochimique des composés phénoliques de *Aerva javanica*

Elle comprendra l'analyse quantitative des composés phénoliques présents dans les différents extraits obtenus d'*Aerva javanica* par dosages spectrophotométriques UV-visible et l'analyse qualitative de ces mêmes fractions par les techniques chromatographiques : CCM, CP, CLHP.

1-1- L'analyse quantitative des composés phénoliques par dosages spectrophotométriques

L'étude quantitative des composés phénoliques est réalisée par des dosages spectrophotométriques de 15 individus d'*Aerva javanica*.

1-1-1-Dosage des aglycones flavoniques (flavones-flavonols)

Un dosage spectrophotométrique différentiel (par chélation au chlorure d'aluminium) est effectué à une longueur d'onde de 430 nm pour les flavones-flavonols (extrait étheré après hydrolyse acide), aglycones libres (extrait étheré sans hydrolyse acide).

Les teneurs absolues des aglycones flavoniques sont exprimées en mg par gramme de poudre végétale.

Tableau 11 : représentant les teneurs absolues en aglycones flavoniques de *Aerva javanica* en mg/g

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	moyenne	variance	Ecart type	Coefficient de variabilité
Tmg/g	0.03	0.018	0.102	0.091	0.099	0.141	0.117	0.179	0.100	0.16	0.125	0.1	0.120	0.093	0.150	0.108	$1.73.10^{-3}$	0.04	37.04

Les résultats obtenus montrent que les teneurs totales en aglycones varient entre 0.03mg/g et 0.160 mg/g avec une moyenne de 0.108 ± 0.04 .

Le coefficient de variabilité est de 37.04% c'est un taux élevé en effet sa valeur est supérieure à 20 %, par conséquent il existerait une variabilité infraspécifique en ces composés.

1-1-2-Dosage des anthocyanes

Un dosage spectrophotométrique est effectué à une longueur d'onde de 520nm pour les anthocyanes (extrait butanolique) .Les teneurs absolues des anthocyanes sont exprimées en mg par gramme de poudre végétale.Les résultats sont regroupés dans le tableau 12

Tableau 12 : représentant les teneurs absolues en anthocyanes de *Aerva javanica* en mg/g

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	moyenne	variance	Ecart type	Coefficient de variabilité
Tmg/g	0.198	0.31	0.21	0.352	0.228	0.307	0.154	0.172	0.123	0.156	0.143	0.208	0.13	0.227	0.149	0.204	$4.84 \cdot 10^{-3}$	0.069	34.07

Les résultats obtenus montrent que les teneurs absolues en anthocyanes varient entre 0.123mg/g et 0.352 mg/g avec une moyenne de 0.204 ± 0.07 . Le coefficient de variabilité est de 34.07% et reste toujours supérieure à 20 % il existerait une variabilité significative entre les individus, signe d'une variabilité intraspécifique

1-1-3-Dosage des C- glycosides flavoniques

Un dosage spectrophotométrique (sans chélation) est effectué à une longueur d'onde de 340nm pour les c-glycosides (extrait butanolique) .

La teneur absolue en C-glycosides flavoniques est exprimée en orientine en mg par gramme de poudre végétal. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau 13

Tableau 13: représentant les teneurs absolues en C-glycosides de *Aerva javanica* en mg/g

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	moyenne	variance	Ecart type	Coefficient de variabilité
Tmg/g	0.299	0.184	0.175	0.168	0.155	0.181	0.168	0.456	0.265	0.309	0.593	0.295	0.298	0.15	0.30	0.286	0.0167	0.129	45.10

Sur la gamme de quinze échantillons dosés nous avons relevé une moyenne de 0.29 mg/g $\pm$ 0.13 et un coefficient de variabilité de 45.10% qui est nettement supérieur à 20% ce qui indique la présence de variabilité intra spécifique chez *Aerva javanica* pour ces composés.

1-1-4-Dosage des hétérosides flavoniques

Nous avons également utilisé un dosage spectrophotométrique différentiel (par chélation au chlorure d'aluminium) à une longueur d'onde de 430 nm pour la détermination des densités optiques de l'extrait hydro éthanolique. Nous avons tracé une courbe d'étalonnage d'une solution mère de rutine à 8%, en suite nous avons reportés les différentes valeurs des Do sur la droite d'étalonnage et par extrapolation nous avons calculés les teneurs absolues des hétérosides totaux (c-glycosides et o-glycosides) qui sont exprimés en mg/g de rutine. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 14.

Tableau 14 : représentant les teneurs absolues en Hétérosides (C-glycosides+ O-glycosides) de *Aerva javanica* en mg/g

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Moyenne	variance	Ecart type	Coefficient de variabilité
Tmg/g	1.54	1.55	1.92	1.67	1.69	1.87	1.5	1.72	1.5	1.68	1.79	1.1	1.6	1.67	1.65	1.631	0.032	0.178	10.913

La teneur absolue moyenne en hétérosides est de 1.63mg/g $\pm$ 0.18, avec un coefficient de variabilité de 10.913%.

1-2-Analyse qualitative des composés phénoliques

1-2-1-Identification des aglycones flavoniques (flavones, flavonols) par chromatographie sur couche mince monodimensionnelle (CCM)

L'analyse qualitative des aglycones flavoniques flavones flavonols se fera par fractionnement de la phase étherée (EE) par CCM monodimensionnelle sur plaque de polyamide élué par un mélange de solvants organiques constitué de : Benzène /méthanol/méthyle éthyle cétone (40 :30 :30).La chromatographie monodimensionnelle sur couche mince de polyamide permet d'isoler un certain nombre de flavones-flavonols. L'observation des chromatogrammes à la lumière ultraviolette à 365 nm révèle la présence de taches de fluorescences différentes à des distances variables. À l'aide d'un papier calque nous avons reproduit le chromatogramme monodimensionnel de l'extrait étheré sur plaque de polyamide. (Fig16) afin de mieux observer le sens et le niveau de migration des composés phénoliques pour pouvoir calculer le Rf de chaque composé.

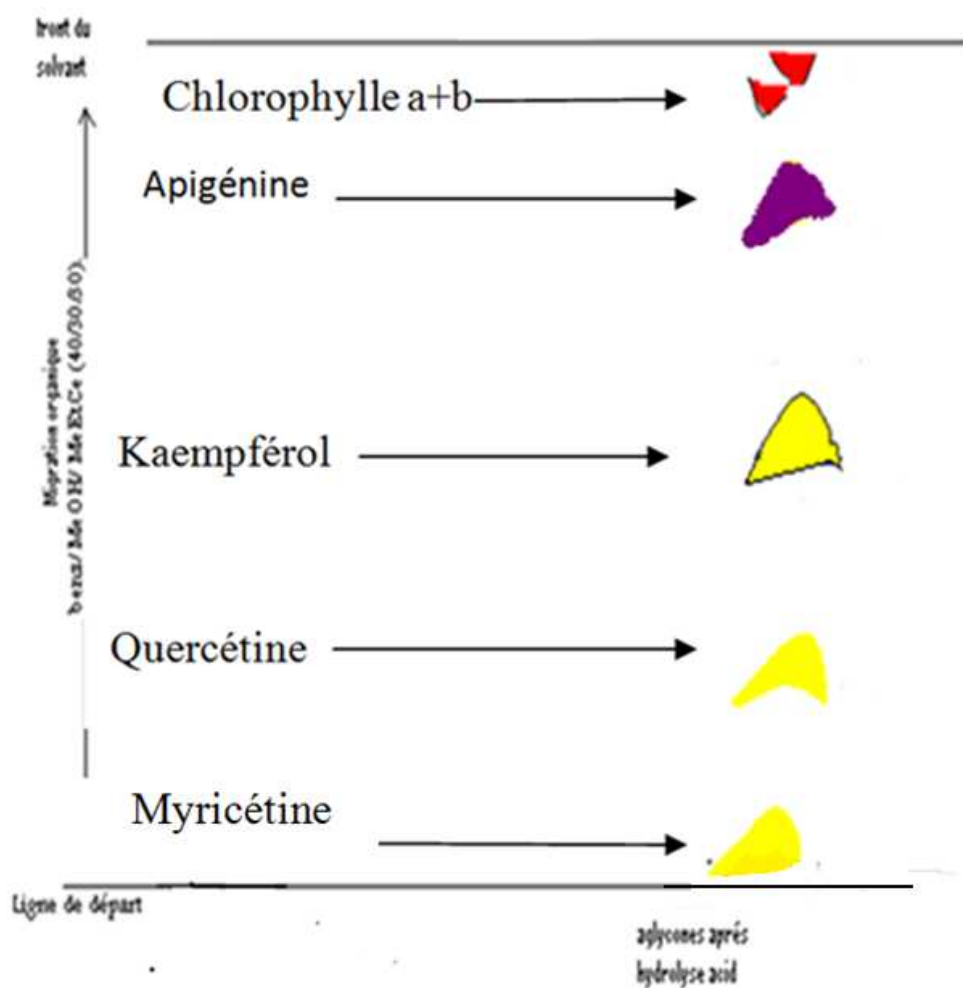


Fig16 : Schéma du chromatogramme monodimensionnel sur couche mince de polyamide obtenu par fractionnement de l'extrait étheré d'*Aerva javanica*.

Ces taches sont identifiées par comparaison de leurs Rf et de leurs fluorescences à ceux de la bibliographie (Lebreton, 1967 ; Ouafi, 1987 et 2007) et avec ceux des témoins qui ont migré dans les mêmes conditions chromatographique.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Caractéristiques chromatographiques des composés contenu dans l'extrait étheré d'*Aerva javanica* après hydrolyse acide.

Taches	Fluorescence UV	Rf	Composé correspondant
1	Jaune	0.0416	Myricétine
2		0.20	Quercétine

	Jaune		
3	Jaune	0.42	Kaempférol
4	Violette	0.79	Apigénine

L'analyse chromatographique par CCM des aglycones nous a permis d'identifier les composés phénoliques suivants :

Un flavone : Apigénine

Trois flavonols : Myricétine, quercétine, kaempférol.

D'après les résultats obtenus nous pouvons noter que l'espèce *Aerva javanica* est une plante à dominance flavonols avec trois composés contre un seul flavone.

1-2-2-Identification des anthocyanes par chromatographie descendante sur papier

L'analyse qualitative de l'extrait butanolique (EB) est réalisée par chromatographie descendante sur papier Whatman n° 3 dans le mélange de solvants Forestal constitué de : l'acide acétique/eau/acide chlorhydrique (30 :10 :3). La migration dure 16 h.

La révélation des chromatogrammes se fait à la lumière du jour. Nous observons à l'œil nu la présence d'une seule tache de couleur rouge pale (fig 17). L'identification de cette tache est réalisée par comparaison de son Rf, de sa fluorescence à ceux données par la bibliographie, étalons utilisés et représenté dans le tableau 16.

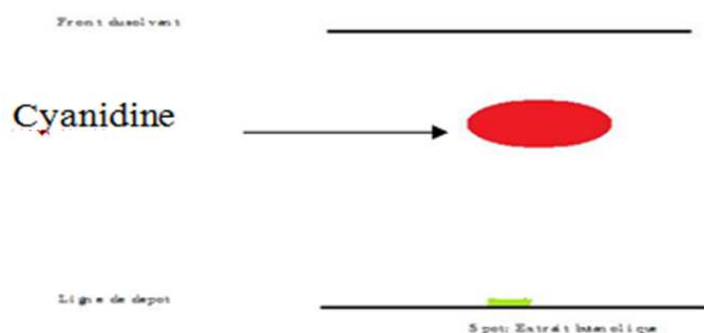


Fig17 : schéma du chromatogramme sur papier Whatman n°3 solvant Forestal des anthocyanes obtenu par fractionnement de l'extrait butanolique de *Aerva javanica*..

Tableau16 : Caractéristiques chromatographiques de l'extrait butanolique *d'Aerva javanica* identifiés par Chromatographie descendante sur papier Whatman :

Tache	Fluorescence	Rf (cm)	Composés identifié
1	Rouge pale	0.449	Cyanidine

A travers les données de ce tableau nous avons noté la présence d'une tache unique qui correspond à un seul composé.

Le seul composé identifié par la chromatographie sur papier correspond à la Cyanidine, qui est l'unique anthocyane de l'espèce *Aerva javanica* .

1-2-3-Fractionnement de l'extrait éthéré contenant les aglycones flavoniques (flavones flavonols) et des acides phénols par CLHP

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est une méthode de séparation qui permet d'obtenir autant de pics qu'il y a de composé dans le mélange à analyser. Les difficultés rencontrées par la complexité de certains extraits sont considérablement atténués lorsqu'on utilise la technique par gradient d'élution (Hamlat ,2006).

Le passage en CLHP de l'extrait éthéré après hydrolyse acide des flavones-flavonols à 365nm dans le mode gradient d'élution nous a permis d'obtenir le profil représenté dans la figure 18.

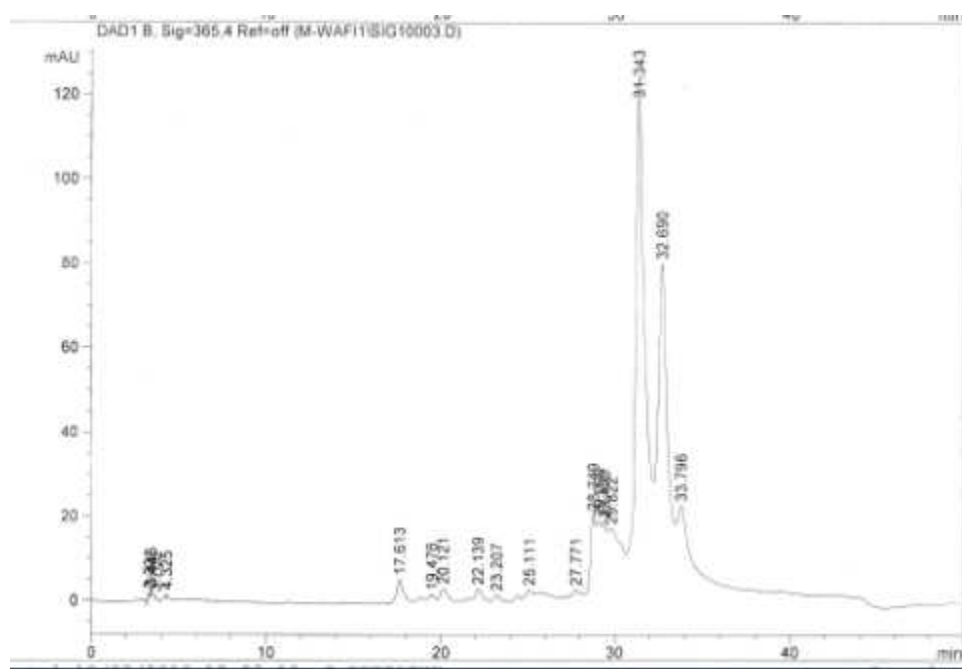


Fig18 : Profil CLHP représentant les flavones et les flavonols, détectés à 365 nm en mode gradient d'élution dans le système de solvants (Solvant A : acide acétique à 2%, Solvant B : méthanol).

Le profil CLHP fait apparaître des pics correspondants à 6 composés flavoniques, dont les caractéristiques chromatographiques sont regroupées dans le tableau 13

Tableau17 : Caractéristiques chromatographiques des flavones-flavonols contenues dans l'extrait éthéré identifiés par C.L.H.P à 365 nm

N° des Pics	Temps de retention (min)	Composés identifiés	Teneurs relatives (%)
1	22.139	Myricétine	0.68
2	27.771	Quercétine	1.37
3	28.538	Lutéoline	8.96
4	31.343	Kaempférol	46.89
5	32.690	Isorhamnétine	29.65
6	33.796	Apigénine	12.41

Par comparaison avec les temps de rétention des étalons injectés dans les mêmes conditions, nous confirmons la présence des mêmes composés que ceux révélés et identifiés par CCM : Myricétine, quercétine, Kaempférol et l'Apigénine mais aussi l'apparition de deux nouveaux composés : lutéoline et l'isorhamnétine.

Deux flavones : lutéoline, Apigénine,

Quatre flavonols : Myricétine, quercétine, Kaempférol, isorhamnétine.

D'après le tableau 13, nous avons remarqué qu'il ya prédominance des flavonols avec une valeur élevée en teneur relative globale 78.59% contre seulement 20.37% pour les flavones.

Le changement de la longueur d'onde à 260 nm (longueur d'onde caractéristique des acides phénoliques), nous a permis d'avoir un nouveau profil CLHP pour le même extrait (**Fig19**).

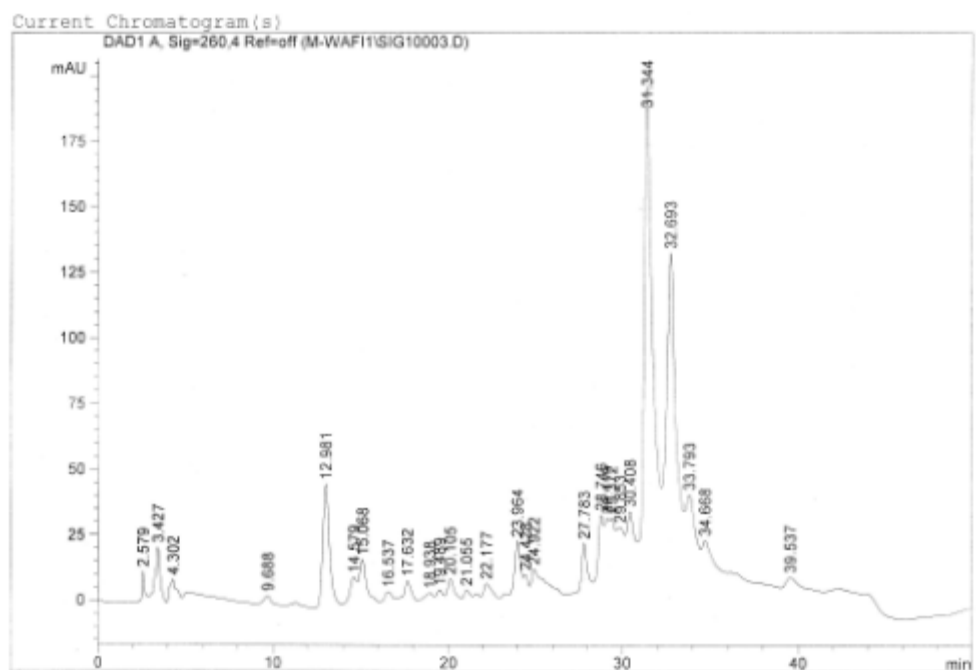


Fig 19 : Profil CLHP représentant les acides phénols détectés à 260 nm en mode gradient d'élution dans le même système de solvant.

la comparaison des temps de rétention des pics obtenus avec ceux des témoins injectés dans les mêmes conditions chromatographiques ,nous a permis d'identifier la présence de 08 composés détectés sur le profil dont les caractéristiques sont regroupées dans le tableau 18.

Tableau18 : Caractéristiques chromatographiques des acides phénols de l'extrait étheré détectés par C.L.H.P à 260nm.

Pics	Teneurs relatives (%)	Composés identifiés	Temps de retention (min)
1	16.28	Acide ascorbique	3.427
2	6.98	Acide gallique	4.302
3	34.88	Catéchol	12.981
4	9.3	Acide vanillique	14.579
5	13.95	Acide caféique	15.068
6	6.98	Acide sinapique	17.632
7	6.98	Acide p hydroxybenzoïque	20.105

8	4.65	Acide cinnamique	22.177
---	------	------------------	--------

D'après les résultats obtenus nous avons identifiés :

Six acides phénols dont quatre acides phénoliques de **la série benzoïque** qui sont : Acide gallique, acide vanillique, acide p hydroxybenzoïque, et trois **de la série cinnamique** : acide cinnamique, acide caféïque, acide sinapique,

Un acide organique : l'acide ascorbique.

Un phénol simple : le catéchol.

D'après le tableau 18, nous avons remarqués que la teneur relative en acides phénols de la série cinnamique est de 25.58% et elle est de 23.26% pour les acides phénols de la série benzoïque. Il ya donc parité chez *Aerva javanica* en acides phénols des deux séries.

En ce qui concerne les teneurs relatives du phénol simple le catéchol et de l'acide organique qui est l'acide ascorbique sont respectivement de 34.88% et 16.28%.

1-2-4- Identification des C-glycoside par C.L.H.P

Le passage en C.L.H.P de l'extrait butanolique contenant les C-glycosides flavoniques à 370nm dans le mode gradient d'élution, nous a permis d'obtenir le profil représenté dans la (Fig20).

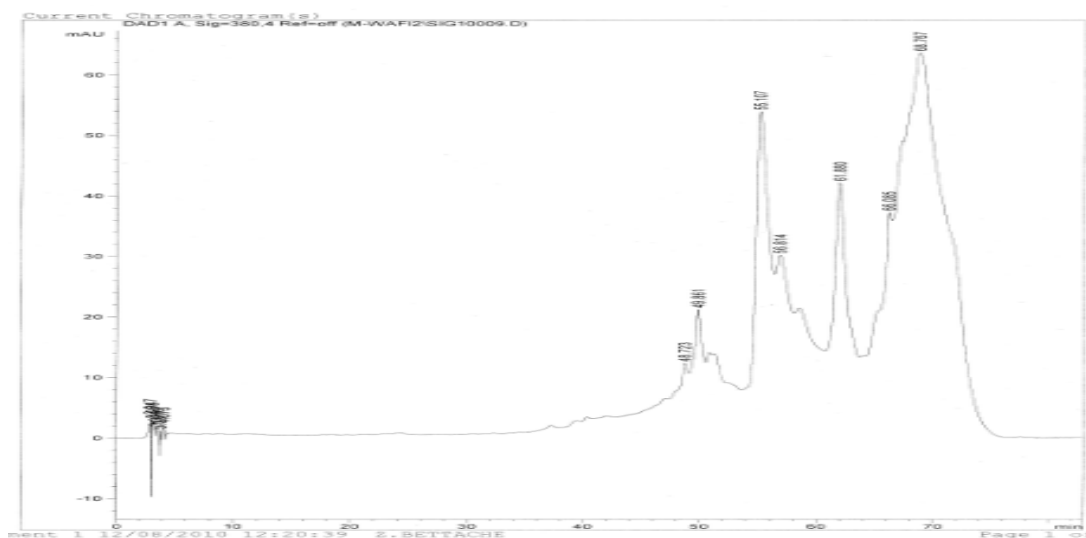


Fig20 : Profil CLHP représentant les C-glycosides détectés à 370 nm en mode gradient d'élution.

Le profil CLHP montre la présence de plusieurs pics dont nous avons identifié 4 composés. Après comparaison du temps de rétention avec celui des étalons injectés dans les mêmes

conditions chromatographiques, les caractéristiques chromatographiques sont regroupées dans le (tableau 19).

Tableau 19 : Caractéristiques chromatographiques des C-glycosides de l'extrait butanolique identifiés par C.L.H.P à 370 nm

Pic	Temps de rétention (min)	Composés identifiés	Teneurs relative (%)
1	48.723	Vitexine	10.47
2	49.861	Isovitexine	18.58
3	61.880	Di-C glycosides d'apigénine	37.83
4	66.085	Mono-C glycosides d'apigénine	33.1

A partir du tableau 19 nous avons identifiés les composés suivants :

Quatre C glycosides : la Vitexine (mono-C-apigénine), son isomère optique l'Isovitexine (mono-C-apigénine), un autre mono C-glycoside d'apigénine et le Di-C glycoside d'apigénine.

Nous constatons que la génine de ces C glycosides est une flavone : l'apigénine. Ce sont donc des C- glycoflavones.

1-2-5-Identification des hétérosides flavoniques (O- glycosides et C glycosides) par C.L.H.P à 370nm en mode gradient d'élution

Le passage en C.L.H.P de l'extrait méthanolique contenant les hétérosides (C glycosides et O-glycosides) obtenus après extraction hydro alcoolique à 370 nm dans le mode gradient d'élution, nous a permis d'obtenir le profil représenté dans la (**Fig21**).

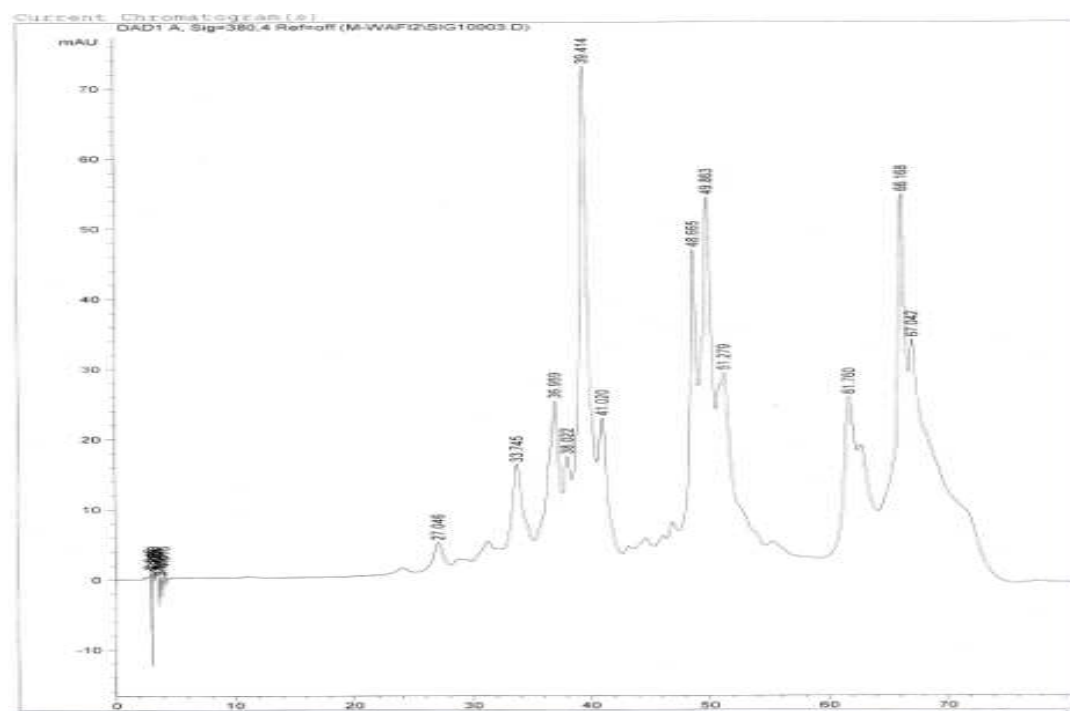


Fig21 : Profil chromatographique représentant les hétérosides flavoniques détectés par C.H.L.P à 370 nm en mode gradient d'élution.

Le profil obtenu montre la présence d'un grand nombre pics, ces derniers correspondent aux composés flavoniques.

A partir de ce profil, nous avons pu identifier 11 composés flavoniques(C-glycosides et O-glycosides) dont les caractéristiques sont regroupées dans le tableau 20

Tableau 20 : Caractéristiques chromatographiques des hétérosides identifiés par C.L.H.P à 370 nm.

Pics	Teneurs relatives (%)	Composé identifié	Temps de rétention (min)
1	2.554	Quercétine	27.046
2	5.516	Kaempférol	33.745
3	8.486	Apigénine	36.959
4	5.799	Di-o-glycoside	38.022

		de myricétine	
5	24.10	Myricétine 3 glucoside	24.186
6	7.637	Rutine: di-o-glycoside de quercétine	41.020
7	15.558	Vitexine	48.665
8	17.963	Isovitexine	49.863
9	9.759	2''vitexine o rhamnoside	51.279
10	8.628	Di-C glycosides d'apigénine	61.760
11	18.104	Mono C-glycoside d'apigénine	66.168

Nous avons identifié 11 composés flavoniques après comparaison du temps de rétention avec celui des témoins injectés dans les mêmes conditions chromatographiques, dont les caractéristiques sont regroupées dans le (**tableau20**).

Le tableau 20 montre que nous avons **huit hétérosides flavoniques** dont **cinq C-glycosides flavoniques** qui sont la Vitexine (mono-C-apigénine), son isomère optique l'Isovitexine, le Di-C-glycoside d'apigénine, le mon-C-glycoside d'apigénine et la 2'' Vitexine o-rhamnoside (2''mono-C-apigénine-O-rhamnoside), et **trois O-glycosides flavoniques** qui sont : le di-o-glycoside de myricétine, la myricétine 3 glucoside (O-glyco-3-quercétine), la rutine (di-o-glycoside de quercétine). Concernant les teneurs relatives en hétérosides flavoniques, elles sont respectivement de 60.25% pour les C-glycosides et de 47.38% pour les O-glycosides.

Nous retrouvons aussi la présence des aglycones libres : flavone (apigénine) et flavonols (quercétine, kaempférol) avec des teneurs relatives de 8.48% pour le flavone et de 8.07% pour les flavonols. Donc les aglycones libres ont une teneur relative de 16.55%.

Par comparaison avec le chromatogramme des C-glycosides flavoniques détecté par CLHP, en plus des 4 C-glycosides initialement identifiés, nous avons trouvés une autre molécule qui est : la 2'' Vitexine o rhamnoside qui est un C-glycosyl-O-glycosyl flavonoïde.

Nous remarquons que notre plante possède aussi bien des C- glycosides que des O- glycosides flavoniques.

Conclusion de l'analyse qualitative des extraits d'*Aerva javanica*

La CP a révélé la présence d'un seul anthocyane (la Cyanidine) dans l'extrait butanolique après hydrolyse acide.

La CCM monodimensionnelle de l'extrait étheré a permis de mettre en évidence un seul flavone (l'Apigénine), trois flavonols (Myricétine, quercétine et Kaempférol)

L'utilisation d'une technique chromatographique plus fine qui est :la CLHP de l'extrait étheré a révélé sur le profil obtenu à 365 nm avec gradient d'élution la présence de deux flavones (api génine et la lutéoline) confirmation de la présence de l'apigénine et détection de la lutéoline non révélée par la CCM. Le passage à une longueur d'onde de 260nm du même extrait a permis de mettre en évidence sur le profil CLHP de six acides phénols dont trois de la série benzoïque (acide gallique, acide vanillique , et l'acide p hydroxybenzoïque) et trois de la série cinnamique (acide cinnamique, acide caféique et l'acide sinapique),un acide organique (acide ascorbique), un phénol simple (catéchol). L'extrait butanolique après hydrolyse acide fractionné en CLHP à une longueur d'onde de 370 nm a révélé la présence sur le profil de quatre C-glycosides flavoniques (Vitexine, Isovitexine, mono-C glycoside d'apigénine, di-C glycoside d'apigénine).

Le profil CLHP de l'extrait méthanolique contenant les hétérosides flavoniques obtenu après extraction hydro alcoolique a une longueur d'onde de 370nm nous a permis d'identifier **cinq C-glycosides** qui sont : la Vitexine (mono-C-apigénine), son isomère optique l'Isovitexine, le Di-C-glycoside d'apigénine , le mon-C-glycoside d'apigénine et la 2'' Vitexine o-rhamnoside (2''mono-C-apigénine-O-rhamnoside), et **trois O-glycosides flavoniques** qui sont : le di-o-glycoside de myricétine, la myricétine 3 glucoside (O-glyco-3-quercétine) , la rutine (di-o-glycoside de quercétine) .Donc nous confirmons la présence des 4 C-glycoside révélés en CLHP des C-glycosides mais en plus nous signalons la présence d'un nouveau C-glycoside qui est 2'' Vitexine o-rhamnoside qui n'a pas été détecté en CLHP des C-glycosides.

Comme nous l'avons signalé plus haut certains composés qui par CLHP et n'ont pas été révélé par CCM ceci est du à la haute précision de la CLHP. Et d'autres comme pour le C-glycoside 2'' Vitexine O rhamnoside qui n'a pas été révélé par CLHP des C-glycoside a été révélé par la CLHP des Hétérosides flavoniques est du au fait que l'extraction hydro alcoolique est spécifique des O-glycosides et C-glycosides.

Nous pouvons conclure que les deux techniques chromatographiques sont complémentaires.

En comparant les résultats obtenus sur *Aerva javanica* avec ceux de la bibliographie sur la même plante, nous constatons que cette étude confirme la présence de trois aglycones flavoniques : un flavonol (Kaempférol) et un flavone (Apigénine) déjà identifié par (Sharif A et al. ,2011). La présence d'un acide organique : l'acide ascorbique (Khare 2007), Nous signalons que les composés flavoniques suivants ont été isolés pour la première fois des

extraits de la partie aérienne de l'espèce *Aerva javanica* **1 flavone** : lutéoline, **3 flavonols** : la Myricétine, Quercétine et l'isorhamnétine, **1anthocyane** : la Cyanidine, **5 C-glycosides** : Vitexine, Isovitexine, 2'' Vitexine O rhamnoside, Di-C glycoside d'apigénine et un mono C glycoside d'apigénine, **3 O glycosides** : Di O glucoside de myricétine, myricétine 3 glucoside et la rutine.

6 Acides phénols : Acide gallique, acide p hydroxybenzoïque, acide vanillique, acide cinnamique, acide caféique, acide sinapique.

1 Phénol simple : le Catéchol.

Par contre nous n'avons pas identifié l'**isoquercétine** dans les extraits de la partie aérienne de *Aerva javanica* ce qui contredit les résultats trouvés par (Sharif A et al., 2011) sur *Aerva javanica* du Pakistan.

Notre plante est très riche en composés phénoliques, notamment flavones, flavonols, aglycones libres, C-glycosides et O-glycosides flavoniques, acides phénols et anthocyanes.

Nous tenons à signaler que l'espèce *Aerva javanica* n'a pas fait l'objet de grande et profonde recherche sur le plan biochimique et reste très peu exploitée malgré sa grande utilisation et sa grande importance dans les régions sahariennes (Algérie, Niger, Pakistan..).

1-3-Analyse statistique des composés phénoliques

Nous avons réalisé une analyse statistique pour les quinze individus étudiés en vue de tester la biodiversité phénolique au sein de l'espèce *Aerva javanica* et cela par rapport à quatre variables qui sont les teneurs absolues des : flavones-flavonols, C- glycosides, anthocyanes et les hétérosides flavoniques. Les valeurs ont constitué une matrice de données qui a servi aux analyses statistiques.

1-3-1-Analyse en composantes principales (A.C.P)

La projection des 15 individus sur les axes de l'A.C.P nous a permis d'obtenir les figures regroupées en **Fig22**.

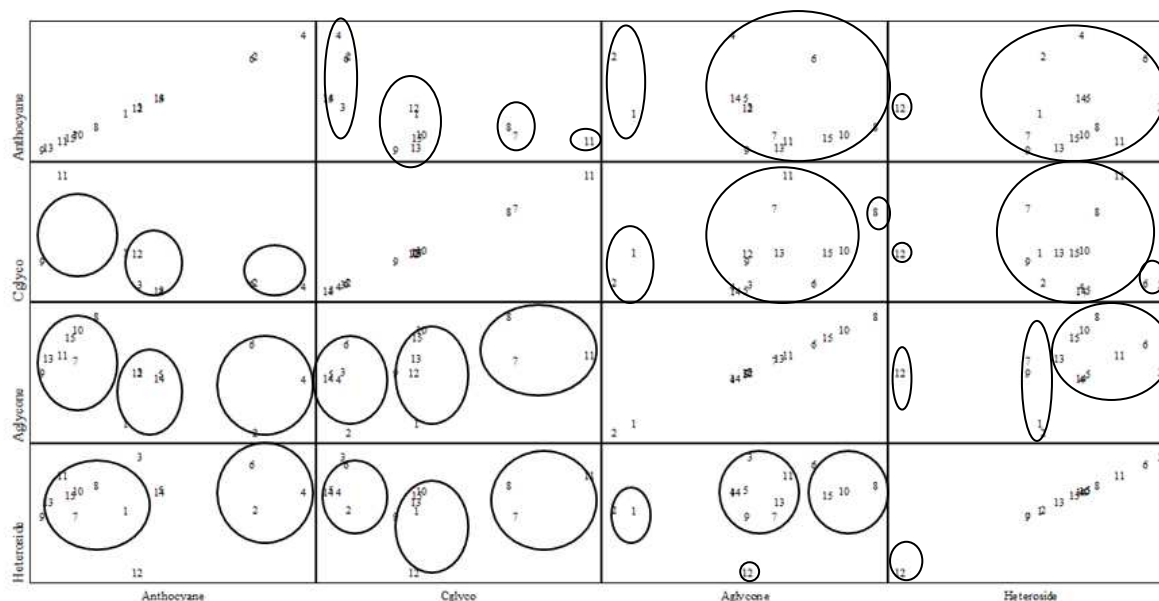


Figure22 : Projection des 15 individus en fonction des 4variables sur l'axe de l'A.C.P

L'allure des Acp obtenus à partir de la projection des individus en fonction des quatre variables étudiées est la meme à quelques petites différences près. En effet les individus sur chaque tracé se distribuent en plusieurs endroits (3). Ceci dénote que les variables étudiées sont des variables de dispersion et non d'agrégation pour notre plante.

Pour comprendre cette disposition un tableau (tab 21)de corrélation entre les variables est réalisé .

Tableau 21 : représente les corrélations entre les variables étudiées.

	Var1 Anthocyanes	Var 2 C- glycosides	Var 3 Aglycones	Var 4 Heterosides
Var1 Anthocyanes	1	-0.62	-0.42	0.15
Var 2 C-	-0.62	1	0.40	-0.08

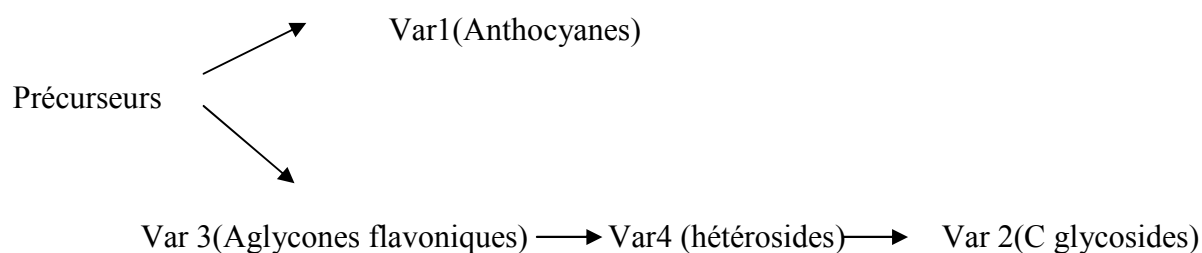
glycosides				
Var 3 Aglycones	-0.42	0.40	1	0.30
Var 4 Heterosides	0.15	-0.08	0.30	1

Var1: Anthocyanes, Var2 : C-glycosides flavoniques .

Var3 : Aglycones flavoniques, Var4 : Hétérosides flavoniques.

Le tableau de corrélation ($p < 0.05$) montre que la variable 1 est corrélée négativement avec les variables 2 et 3 et positivement avec la variable 4. Cette dernière est corrélée négativement avec la variable 2 et positivement avec les deux autres (1 et 3).

A partir de ces corrélations entre les variables nous pouvons déduire que les fractions étudiées se disposeraient dans la chaîne de biosynthèse pour *l'Aerva javanica* selon le schéma suivant :



a)-Classification de Neighbour Joining:

L'application de la classification de Neighbour Joining entre les 6 première coordonnées factorielles de l'ACP est représentée dans la figure 23, les coupures ont été déterminées et expriment des niveaux d'agrégation qui traduisent une bonne qualité de classification.

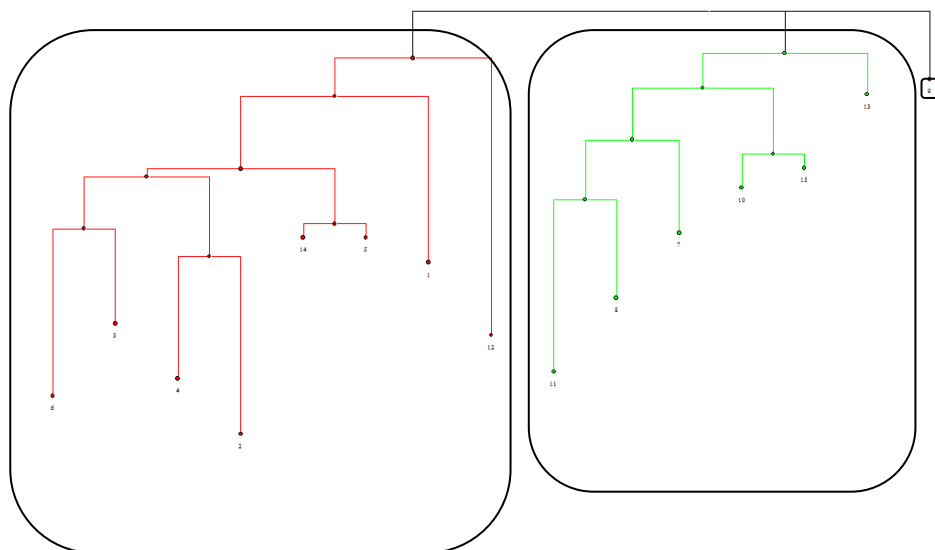


Fig 23 : Représente Dendrogramme issu de la classification de Neighbour Joining portant sur les 15 individus.

Les individus étudiés se répartissent de façon équitable selon deux groupes. L'individu n°9 reste mal attribué sur cette ACP centrée. En conclusion les individus se répartissent en deux chémotypes distincts ce qui dénoterait de l'éventualité de la présence de clones dans l'espèce *Aerva javanica*(Burm).

b)- Classification ascendante hiérarchique à partir de l'ACP centrée

L'application de la classification ascendante hiérarchique entre les coordonnées factorielles de l'ACP nous a permis d'obtenir un dendrogramme dont les coupures expriment des niveaux d'agrégation qui traduisent une bonne qualité de classification (**Figure 24**).

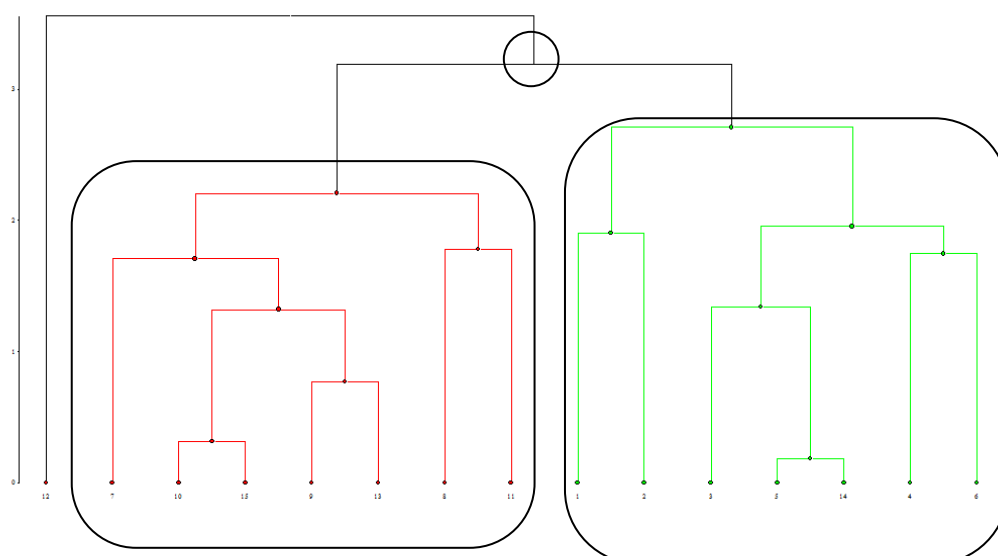


Fig24 : Représente le dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique sur les 15 individus étudiés.

Même constatation que pour la classification précédente. En effet l'arbre présente la même allure avec les deux groupes d'individus déterminés par la coupure de ward.

Nous pouvons déduire que les quinze individus étudiés se répartissent encore en deux chémotypes distincts, ce qui renforcerait l'éventualité de la présence de clones dans l'espèce *Aerva javanica*.

2-Résultats des activités biologiques

2-1- Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de nos quatre extraits : extrait butanolique, extrait d'aglycones libre, extrait éthéré et l'extrait hétérosidique de *Aerva javanica* a été évaluée par un test qualitatif : diamètre des zones d'inhibition, qui vari selon la sensibilité du germe. Sachant que 3 essais ont été réalisés pour chaque extrait.

Après la période d'incubation 24 h pour les bactéries et 48 h pour la levure, si le germe cible est sensible à l'extrait végétal sa croissance s'arrête et une zone d'inhibition se forme autour du disque.

Au cours de notre étude nous avons testés les quatre extraits d'*Aerva javanica* sur trois souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) et une souche fongique (levure : *Candida albicans*).

Nous résumons dans les tableaux 22 et 23 les valeurs références de la littérature basées sur deux échelles de performance ;Chifundera1990, et celle de Meena et Sethi, 1994.

Tableau 22 : Echelle retenue par Chifundera ,1990

Diamètre de la zone d'inhibition	Nature de la souche
0 à 9 mm	Souche résistante
10 à 15 mm	Souche peu sensible
16 à 22 mm	Souche sensible
Plus de 22 mm	Souche très sensible

Tableau 23 : Echelle retenue par Meena et al ; 1994 et Ela et al ; 1996

Diamètre de la zone d'inhibition	Action de l'extrait
0 à 9 mm	Non inhibitrice
10-15 mm	Légèrement inhibitrice
16 à 28 mm	Modérément inhibitrice

En parallèle, nous avons testé les solvants de récupération des molécules extraites. Il s'agit du n-butanol, du méthanol, et de l'éther di éthylique. Ce test a été réalisé dans le but de confirmer que les solvants ne présentent aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes. D'après Yrjonen, 2004 si les extraits doivent être soumis aux essais antimicrobiens, la toxicité du solvant peut également être critique car même en trace, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique.

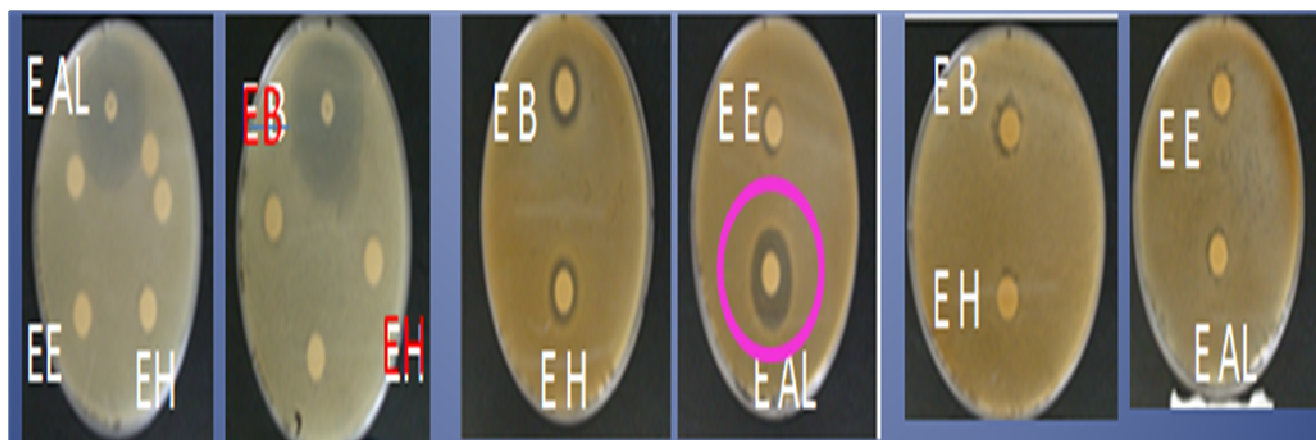
Les antibiotiques utilisés sont la céfotaxime contre *E. coli*, la vancomycine contre *staphylococcus aureus*, La chloramphénicol contre *Bacillus subtilis*, et le miconazole contre la levure.

Les résultats des antibiogrammes des souches bactériennes Gram+ et Gram- et de la levure traduits par les diamètres des zones d'inhibition des extraits d'*Aerva javanica* sont regroupés dans le **tableau 24**. Illustrés par les photographies **Fig : (25 ,26,27 ,28)**

Tableau 24 : Diamètres des zones d'inhibitions des souches microbiennes

Catégories de souches		Espèces des souches microbiennes	Diamètres des zones d'inhibition (mm)					Echelle chifundera	Echelle Meena
								Souche	Action
Bacteries	Gram-	<u>Escherichia coli</u>	E B 10	E A I 0	E E 0	E H 10	Atb 25	Peu sensible	Légèrement inhibitrice
	Gram +	<u>Bacillus subtellis</u>	13	11	14	13	17		
			<u>Staphylococcus aureus</u>	16	23	13	14	23	Très sensible
Levure		<u>Candida albicans</u>	0	0	0	0	18	Résistante	Non inhibitrice

EB : extrait butanolique, E AL : extrait des aglycones libres, E E : extrait étheré, E H : extrait hétérosidique, ATb : Antibiotique.



Photos A

Antibiogramme de l'activité antibactérienne des extraits (EB, E AL, EE, EH) de *Aerva javanica* Sur *E coli*

Photo C

Antibiogramme de l'activité antibactérienne des extraits (EB, E AL, EE, EH) de *Aerva javanica* sur *S. aureus*

Photos B

Antibiogramme de l'activité antibactérienne des extraits (EB, E AL, EE, EH) de *Aerva javanica* sur *B. subtilis*

E B : Extrait butanolique ,E AL : Extrait Aglycones libres, EE : Extrait étheré, E H : Extrait hétérosidique

E coli : *Escherichia coli*, B. subtilis : *Bacillus subtilis*, S.aureus : *Staphylococcus aureus*

Figure 25: Zones d'inhibitions obtenues par action des extraits flavoniques de *Aerva javanica* sur la croissance des trois souches de bactéries.



Figure 26 Antibiogramme de l'activité antimicrobienne des solvants (n-butanol, méthanol, éther di éthylique) sur les bactéries et la levure

Photos D: AntibioGramme de l'activité antimicrobienne des Antibiotiques

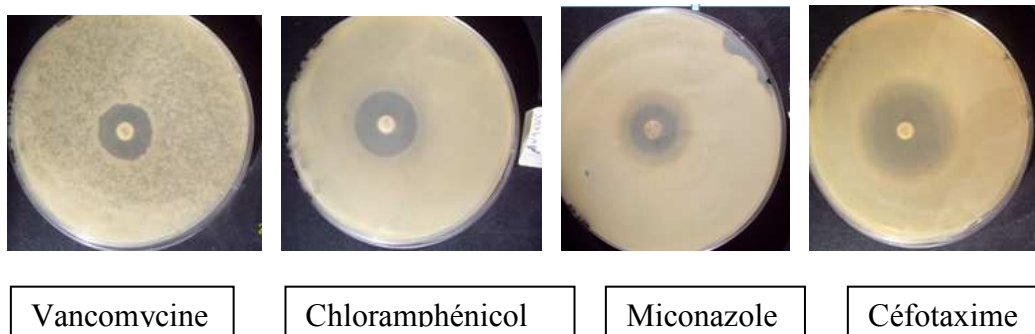


Figure 27: Zones d'inhibitions obtenues par action des antibiotiques commerciaux sur les souches bactériennes et la levure.

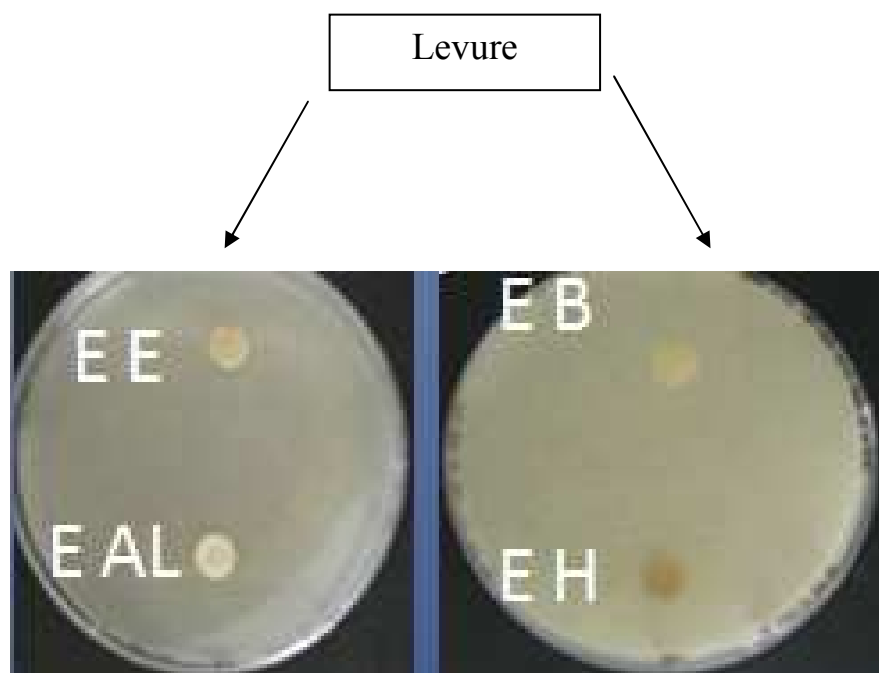


Photo E

AntibioGramme de l'activité antifongique des extraits butanolique, aglycones libres, étheré et hétérosidique d'*Aerva javanica* sur *Candida albicans*

Fig 28: Zones d'inhibitions obtenues par action des extraits flavoniques de *Aerva javanica* sur la levure

En comparant les résultats obtenus aux valeurs critiques figurants dans les tableaux 22,23 , nous constatons que l'extrait butanolique (anthocyane et c-glycosides) et l'extrait hétérosidique(O-glycosides et C-glycosides) présentent une activité légèrement inhibitrice pour la souche E.coli donc c'est une souche peu sensible vis-à-vis de ces deux extraits :fig27 par contre les extraits aglycones libres et étheré (flavones flavonols)n'ont aucune activité vis-à-vis de la même souche et donc résistante à ces deux extraits. Cependant la souche Gram- E coli est sensible aux extraits butanolique et hétérosidique (anthocyane : la cyanidine, c-glycosides et o- glycosides) par contre résistante aux extraits aglycones libres et étheré (flavones flavonols, acides phénols

La souche *Ecoli* est responsable des gastro-entérites (diarrhée) et des infections urinaires, ce qui explique donc l'utilisation d'*Aerva javanica* pour traiter les diarrhées des bovins (Fraz M.Khan., 2009)

Les quatre extraits testés vis-à-vis de la souche Bacillus subtilis ont montré que cette dernière est peu sensible aux C-glycosides O-glycosides, flavones flavonols et des acides phénols d'*Aerva javanica*.

La bactérie Gram+ Bacillus subtilis n'est pas considéré comme pathogène pour l'homme, elle est inoffensive, mais elle peut contaminer des aliments et peut exceptionnellement provoquer une intoxication alimentaire et peut s'avérer comme indicateur utile de manque d'hygiène (Fandrois, 1976). Ce qui explique l'utilisation de notre plante pour traiter les douleurs et inflammations abdominales (Zafar et al., 2009).

Les quatre extraits flavoniques sont très actifs vis-à-vis de la souche Staphylococcus aureus. Cette dernière est très sensible aux composés phénoliques. Les diamètres des zones d'inhibitions est considérables pour l'extrait butanolique contenant la Cyanidine et les C-glycosides et l'extrait des aglycones libres (flavones flavonols) et ce dernier présente un diamètre d'inhibition égale a celui de l'antibiotique témoin correspondant (vancomycine).

Nous déduisons que les flavonoïdes et les acides phénoliques extraits de la plante *Aerva javanica* ont une activité antibactérienne vis-à-vis de cette souche.

La bactérie Staphylococcus aureus est responsable des staphylococcies cutanées et sous cutanée et des toxi-infections alimentaires. La richesse de cette plante en composés phénoliques connus par leurs effets antispasmodiques, leurs propriétés antibactériennes, antifongique justifie son utilisation en médecine traditionnelle dans le traitement de certaines maladies de la peau : blessure et inflammation de la peau en application externe (Qureshi R et al ; 2010), infection dermatologique, morsure de serpents et piqure de scorpion (Ali omar ; 2009).

Les résultats de l'activité antifongique ne montrent aucune action inhibitrice vis-à-vis du Candida albicans . fig 28 Les quatre extraits sont inactifs .Donc cette Souche est résistante.

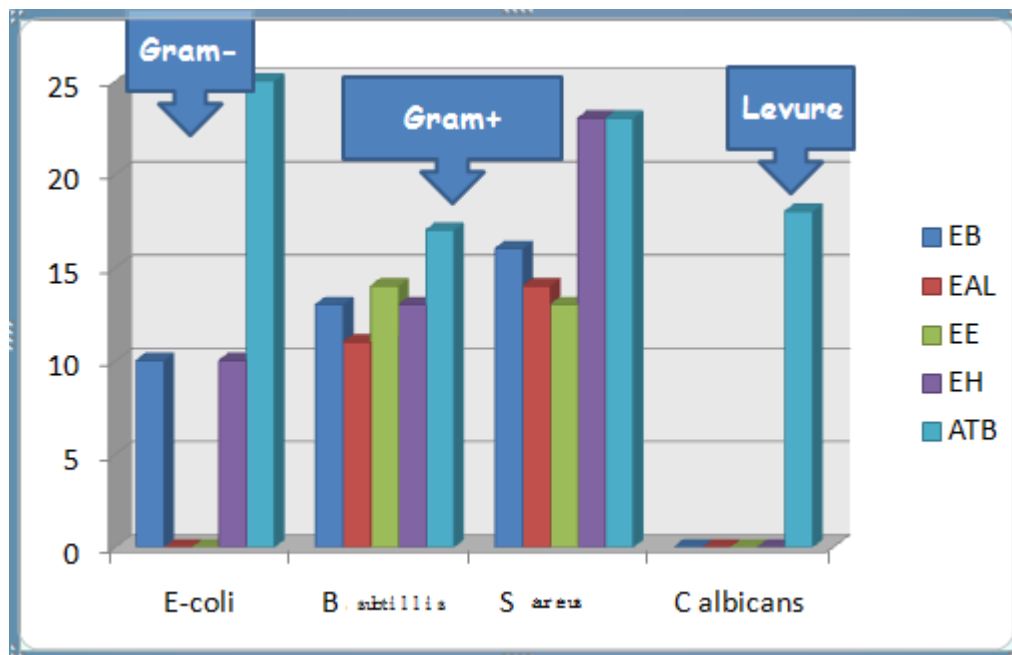


Fig 29 : histogramme représentant les diamètres des zones d'inhibition obtenus par action des extraits flavoniques d'*Aerva javanica* sur les bactéries et la levure.

L'histogramme de la figure 29 montre que par rapport aux diamètres des antibiotiques, nos quatre fractions ont une activité légèrement inhibitrice vis-à-vis des Gram-, une activité modérée vis-à-vis des souches Gram+ et aucune activité vis-à-vis de la levure.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Sharif Ahsan et al., 2011 sur *Aerva javanica* du Pakistan. Concernant la levure elle s'est montrée résistante aux quatre fractions ce qui contredit les résultats du même auteur.

2-2-Activité antalgique:

L'activité antalgique de nos trois extraits : extrait butanolique, étheré et hétérosidique d'*Aerva javanica* a été évaluée par la réduction du nombre de crampes causés par l'acide acétique chez des souris (injection intra péritonéale) afin de provoquer une réaction douloureuse qui se manifeste par des mouvements de torsion de l'abdomen avec étirement des pattes postérieures (crampes) fig30. Ces dernières peuvent être réduites par un produit antalgique.



Fig30 : souris en plein crampe

Pours notre étude nous avons utilisé un produit antalgique de référence : fêldène et nous l'avons comparé aux produit testés qui sont nos trois extraits. Des moyennes arithmétiques des crampes pour chaque lot de souris sont calculées, les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 25

Tableau 25: représentant les moyennes arithmétiques des crampes

<i>Souris/nbre de crampes</i>	<i>Lot témoin</i>	<i>Lot essai 1 B</i>	<i>Lot essai 2 E</i>	<i>Lot essai 3 H</i>	<i>Lot essai 4 F</i>
<i>1</i>	<i>29</i>	<i>7</i>	<i>9</i>	<i>5</i>	<i>13</i>
<i>2</i>	<i>26</i>	<i>6</i>	<i>3</i>	<i>8</i>	<i>6</i>
<i>3</i>	<i>26</i>	<i>18</i>	<i>3</i>	<i>6</i>	<i>10</i>
<i>4</i>	<i>26</i>	<i>3</i>	<i>1</i>	<i>4</i>	<i>15</i>
<i>5</i>	<i>25</i>	<i>6</i>	<i>18</i>	<i>2</i>	<i>10</i>
<i>6</i>	<i>15</i>	<i>0</i>	<i>2</i>	<i>5</i>	<i>8</i>
<i>7</i>	<i>18</i>	<i>10</i>	<i>12</i>	<i>6</i>	<i>15</i>
<i>8</i>	<i>13</i>	<i>15</i>	<i>11</i>	<i>4</i>	<i>8</i>
<i>9</i>	<i>16</i>	<i>4</i>	<i>7</i>	<i>7</i>	<i>15</i>
<i>10</i>	<i>16</i>	<i>12</i>	<i>8</i>	<i>1</i>	<i>8</i>
<i>Moyenne</i>	<i>21</i>	<i>8.1</i>	<i>7.4</i>	<i>4.8</i>	<i>10.8</i>
<i>Ecart type</i>	<i>5.90</i>	<i>5.606</i>	<i>5.35</i>	<i>2.149</i>	<i>3.425</i>

Le pourcentage de réduction de crampes chez les souris traitée par rapport aux témoins est calculé et les résultats sont regroupés dans le tableau 26.

Tableau 26: représentant le pourcentage de protection

<i>Lots</i>	<i>Moyenne de crampes</i>	<i>Pourcentage de protection</i>
<i>Essai 4 F(Fèldène) référence</i>	<i>10.8</i>	<i>48.57</i>
<i>Essai 1 B(extrait butanolique)</i>	<i>8.1</i>	<i>61.428</i>
<i>Essai 2 E(extrait étheré)</i>	<i>7.4</i>	<i>64.76</i>
<i>Essai 3 H (extrait hétérosidique)</i>	<i>4.8</i>	<i>77.142</i>

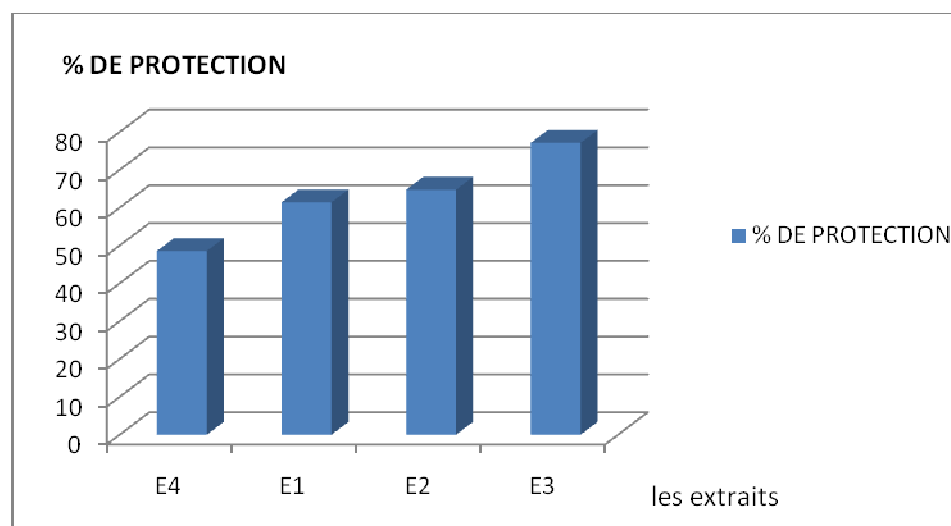


Fig 31 : histogramme représentant le pourcentage de protection des souris en fonction des extraits flavoniques de *Aerva javanica* comparé au produit de référence.

La signification statistique de ces résultats est calculée selon la loi de Student

$$t = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{s^2/n_1 + s^2/n_2}}$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

$$\alpha = 0.05, t_{\alpha} = 2.17$$

Hypothèse H_0 : il n'y a pas de différence significative entre Essai 4(Fèldène) et Essai à testé

Nous avons calculé le « t » de nos trois extraits (EB, EE, EH) et le comparer à t_{α} .

Les résultats sont les suivants : $t_1(EB) = 1.88$, $t_2(EE) = 1.69$, $t_3(EH) = 4.724$.

D'après nos résultats $t_1(EB)$ et $t_2(EE)$ sont inférieure à $t_{\alpha} 2,17$ donc nous dirons qu'il n'y a pas de différence significative entre le médicament Fèldène et les deux extraits butanolique et étheré. Par contre $t_3(EH)$ est supérieure à $t_{\alpha} 2,17$ donc il y a une différence significative entre le médicament Fèldène et l'extrait hétérosidique.

D'après les résultats du tableau 26 et l'histogramme fig 31, nous remarquons que les essais 1,2 et 3 donnent de meilleurs résultats par rapport au produit de référence Fèldène (essai 4) avec une moyenne de crampes qui est respectivement de 8.1, 7.4 et 4.8. De plus nous notons que l'injection de notre essai 3, qui représente les hétérosides flavoniques d'*Aerva javanica*, est nettement plus efficace. Et ceci est confirmé par le test de Student.

Nous pouvons conclure que les trois fractions flavoniques donnent un meilleur pourcentage de protection par rapport au produit de référence : Fèldène, et fait important de notre étude c'est la révélation de l'activité antalgique de la Cyanidine comme unique anthocyane présent. *l'Aerva javanica* a une forte propriété antalgique, ce qui justifie son utilisation en médecine traditionnelle par les populations du Sud algérien pour soigner les maux de tête et douleurs abdominales (Sumit, 2008).

Conclusion

Le travail que nous avons réalisé est une contribution à l'étude de la biodiversité par les composés phénoliques présents dans *Aerva javanica*, en plus de la recherche de quelques activités biologiques de ces mêmes composés.

L'étude phytochimique a en pour premier objectif l'extraction des différents composés phénoliques pour obtenir 4 extraits : un extrait des flavones, flavonols, extrait des hétérosides (O-glycosides et C-glycosides), extrait des aglycones libres, extrait des C-glycosides et anthocyanes.

Nous avons utilisé la chromatographie sur papier, la chromatographie sur couche mince, la chromatographie liquide à haute performance pour réaliser l'analyse qualitative et la spectrophotométrie UV-visible pour réaliser l'analyse quantitative de nos quatre fractions.

C'est ainsi que nous avons révélé la présence des flavonoïdes suivants :

***Proanthocyane** : La Cyanidine révélée pour la première fois

*** Deux flavones** :

Apigénine

Lutéoline révélée pour la première fois

***Quatre flavonols** :

Kaempférol, **Myricétine**, **Quercétine**, **Isorhamnétine** dont les trois derniers ont été révélés pour la première fois.

***Huit hétérosides flavoniques** révélés pour la première fois dont Cinq C-glycosides flavoniques :

Vitexine (mono-C-apigénine)

Isovitexine (mono-C-apigénine)

Un autre mono C-glycosides d'apigénine

Di-C glycoside d'apigénine

La 2'' Vitexine o-rhamnoside (2''mono-C-apigénine-O-rhamnoside).

Et trois O-glycosides flavoniques :

Le di-O-glycosides de myricétine

La myricétine 3 glucoside

La rutine (di-o-glycoside de quercétine)

-Parmi les acides phénoliques présents dans les extraits nous avons pu identifier pour la première fois :

***Six acides phénols** dont trois acides phénoliques de **la série benzoïque** :

Acide gallique

Acide vanillique

Acide p hydroxybenzoïque

Et trois autres acides phénoliques **de la série cinnamique** :

Acide cinnamique

Acide caféique

Acide sinapique

***Un acide organique** : l'acide ascorbique.

***Un phénol simple** : identifié pour la première fois le catéchol.

Les teneurs relatives en aglycones flavoniques déterminées par la chromatographie liquide à haute performance donnent une valeur de 16.55% pour les aglycones libres. En ce qui concerne les aglycones flavoniques libérés après hydrolyse acide il ya prédominance des flavonols avec une teneur relative de 78.59% contre 21.37% pour les flavones. Ce résultat est confirmé par la dominance des fluorescences jaunes caractéristiques des flavonols sur les plaques chromatographiques sur couche mince réalisées.

Les teneurs relatives en hétérosides flavoniques (C-glycosides et O-glycosides) déterminés par la CLHP présentent une valeur de 60.25% pour les C- glycosides et une valeur de 47.38% pour les O- glycosides.

Les teneurs relatives du phénol simple : catéchol est de 34.88%, 16.28% pour l'acide organique qui est l'acide ascorbique.

Concernant les teneurs relatives en acides phénols déterminés par la CLHP de l'extrait butanolique, sont de 25.58% pour les acides phénols de la série cinnamique et de 23.26 % pour les acides phénols de la série benzoïque. Il ya donc parité chez *l'Aerva javanica* en acides phénols des deux séries.

L'analyse quantitative par dosage spectrophotométrique UV visibles des quatre extraits de composés phénolique de *Aerva javanica* nous a permis d'évaluer les teneurs moyennes en: Flavones, flavonols : 0.108 mg/g $\pm$ 0.041, Hétéroside : 1.631 mg/g $\pm$ 0.178, Aglycone libre : 0.12mg/g $\pm$ 0.13, C-glycosides : 0.286 mg/g $\pm$ 0.129, Anthocyanes : 0.204 mg/g $\pm$ 0.069.

Les analyses quantitatives et qualitatives des composés phénoliques ont montré que notre plante est d'une grande richesse polyphénoliques puisque trois familles flavoniques ont été rencontrés : pro anthocyanine, flavonols-flavones (ces deux dernières sous formes O et C-glycosylés et libres) et les acides phénols.

Les résultats de la recherche de la diversité chimique à l'intérieur de notre espèce ont montré que les individus étudiés se répartissent en deux chémotypes distincts ce qui dénoterait de l'éventualité de la présence de clones dans l'espèce *Aerva javanica*.

En effet l'analyse des composés polyphénoliques issus des extraits de la partie aérienne d'*Aerva javanica* a été complétée par des tests microbiologiques via des bactéries à gram négatif (*Escherichia coli*), gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) et levure (*Candida albicans*).

L'activité microbiologique des extraits de notre plante a été prouvée surtout vis-à-vis des souches Gram positif.

Les résultats obtenus à partir de ces tests ont montré que *Aerva javanica* possède une activité antibactérienne dû principalement aux C- glycosides et O-glycosides flavoniques et à la Cyanidine.

Aerva javanica est une plante très utilisée dans la pharmacopée traditionnelle, pour le traitement des maux de têtes, douleurs et inflammations abdominales ce qui nous a conduits à faire une étude de l'activité antalgique.

Tous nos extraits polyphénoliques ont montré un pouvoir antalgique supérieur au produit de référence (Fèldène), nous devons toute fois relever le fort pourcentage de protection propre à la Cyanidine que nous avons révélé pour la première fois chez les plantes médicinales.

De ce fait nous avons confirmé l'utilisation de notre plante en médecine traditionnelle comme ayant des propriétés antalgiques (pour le traitement des maux de têtes, douleurs et inflammations abdominales ...)

Malgré la maîtrise d'une grande partie de ce travail, notre étude qualitative est appelée à être affinée par couplage de la CLHP avec la spectrométrie de masse c'est-à-dire la LC MS des composés de toutes les fractions, de façon à rechercher les activités biologiques vis-à-vis de chaque composés. Et surtout Confirmer l'identification de la Cyanidine comme seul anthocyane.

Il est souhaitable qu'à l'avenir on puisse augmenter l'échantillonnage et multiplier les stations et faire la correspondance entre chémotypes et aspects morphologiques

Il est souhaitable aussi de faire une analyse antimicrobienne avec un nombre plus grand de pathogènes *in vivo*, et déterminer la CMI. (Concentration Minimale Inhibitrice)

Il serait intéressant d'utiliser les principes actifs de cette plante en pharmacognosie pour la fabrication de remèdes notamment des pommades.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ali Omar M., 2009 Pharmacopée traditionnelle et valorisation d'autres ressources naturelles par la femme Toubou dans le Termit-Niger. Mém. Master, institut international d'ingénierie de l'eau et de l'environnement .Rep. du Niger,88p.

Audigie C et Zous Zain F., 1991. Biochimie structurale, Ed, Doin, 226p.

Bate-Smith E. C., Ostone L. & Lermioglu F., 1954. Leucoanthocyanidins II, the nature and distribution in leaves. *Planta medica*, p34-37.

Beta T. , Nam.S., Dexter JE., Sapirstein H.D. (2005). Phenolics content and antioxidant activity of pearled wheat and Roller-Milled fraction. *Cereal chem.*, 82,390-393.

Bouchama K.E, 2000. Thèse de Magister, Université Mentouri, Constantine. *In* Hamlat-Lazib N. Etude des flavononoides et des acides phénoliques du lentisque. Mém. Magister. ENS. Alger. 101p.

Bremer B, Bremer K., Chase MW., Fay M F,Reveal J L., Soltis D.E., Soltis P.S et Stevens, P.F(comp), 2009. An Update of the Angiosper, Phylogeny Group Classification for the Orders and families of Flowering Plant: APG III. *Botanical Journal of Linnean Society of London.* 161p.

Brouillard R., Jay M. & Scalberat A., 1995. 17^{ème} journée internationale d'étude des polyphénols, communication 94. I.N.R.A, France, Vol 1, 209p.

Bruneton J., 1993 Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, 2^{ème} Edition Lavoisier

Bruneton J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie et plantes médicinales. *Techniques et documentation.* Lavoisier. Paris, 915p.

Cavallo J. D., Chardon H., Chidiac C., Choutet P., Courvalin P., Dabernat H., Drugeon H., Dubreuil L., Goldstein F., Jarvalier V. R., Leclerc Q. M. H., Nicolas-Chanoine, Philipon A., Quentin C., Rouveix B., Sirot J. & Soussy C. J., 2006. Communiqué de la Comité Française de l'Antibiogramme. *Société Française de Microbiologie.* p180-210.

Chen D., Dou Q.P.,2008. Tea polyphenols and their roles in cancer prevention and chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 9,1196-1206.

Chifundera k., Bury W. M. & Kizungub., 1990. Screening phytochimique et antibactérien des extraits de *Ficus sycomorus*-short communication. *Fitoterapia* 6 : p535-539.

Cowan M.M.(1999). Plant product as antimicrobial agent. *Clin.Microbiol. Rev.*, 12, 564-582.

Diday E. 1979 – Optimisation en classification automatique, 2 vols, inria.in **Ouafi S., 2007.** Contribution à l'étude biochimique du Palmier dattier, analyse des polyphénols des folioles de palme de cultivars du *Phoenix dactylifera* L. Dans un but chimiotaxonomique. Thèse d'état en science de la nature, physiologie végétale, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, 140p.

Ela M.A., El Shaer NS.et Ghanem N.B.,1996. Antimicrobial evaluation and chromatographie analyses of some essential and fixed oil pharmacie. Vol.51.pp.993-995.

El-Seed H.R., Sobaih S.A., 1999. Triterpenes and flavonol glycosides from *Aerva javanica*. *Revista Latinoamericana de Quimica* 27 (1): 17-21.

Eyquena A ; J.Alouf; L.Montragnier,1998. Traité de microbiologie clinique, Ed, Piccin Nerova libreria, Italie 1304-1328.

Flandrois J. P., 1997. Bactériologie médicale, Presse universitaires, Lyon, 309p.

Frankel E.N., Huang S.W., Aeschbach R., Prior E.,(1996). Antioxidant activity of rosemary extract and its constituent, carnosic acid, carnosol and resmarinic acid in bulk oil and oil- in – water emulsion. *J.Agric.Food Chem.*44,131-135.

Fraz M.Khan., 2009 Ethno-veterinary Medicinal Usage of Flora of Greater Cholistan Desert (Pakistan) p75-80.

French C. J. & Tozersg H., 1992. Inhibit of infectivity of potato virus X by flavonoïds. *Phytochemistry*, 31 (9) : p3017-3220.

Frobisher F., 1976. Microbiologie clinique, HRW, 507p.

Ghestem A., Seguin E., Paris M. & Orecchioni A. M., 2001. Le préparateur en pharmacie, dossier 2, botanique- pharmacognosie phytothérapie- homéopathie, Tech et Doc, Paris. p108-117.

Gerhard R., 1993. Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie, Ed française, presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. 526p.

Gazengel J. & Orecchioni A., 2001. Le préparateur en pharmacie, Technique et documentation, Paris, 271p.

Hadj-Mahammed M., 1992. Analyse des flavonoïdes par chromatographie sur couche mince, 1^{er} journée de chromatographie, institut de chimie, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, p1-3.

Hakkinen S; S.Auriola., 1998. Journal of Chromatography A 829, 91,100.

Hale A.L. (2003). Screening potato genotypes for antioxidant activity , identification of the responsible compounds , and differentiating russet norkatah strains using aflep and

microsatellite marker analysis. Office of graduate studies of texas A&M university. Genetics,260.

Hamlat-Lazib N.,2006 Etude des flavononoides et des acides phénoliques du lentisque. Mém. Magister. ENS. Alger. 101p.

Harborne J. B., 1973. Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis, Chapman and Hall, Ed London, 378p.

Harborne J B,1988. The flavonoids, Chapman and Hall Edition .

Harborne J. B., 1993. New naturally occurring plant polyphenols. *In* Scalbert A. Polyphenolic phenomena. Ed INRA. 19-22. *In* Vercauteren J. Polyphénols 96. INRA, Paris, p31-43.

Hopkins.W.G, 2003. Physiologie végétale, , 2^{ème} édition , Ed de Boeck Université.279

Hostettman K., Marston A. & Hostettman M., 1998. Preparative chromatography techniques: Application in natural product isolation, Springer, Berlin, 244 p.

Hutabarat LS ; H.Greenfield; M.Mulholland.,2000. Journal of chromatography A, 886 55-63.

Jay M, Gonnet J.F, Wollen Weber E et Voirin B., 1975. Analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxonomique. *Phytochem*, 14 (7), 1605-1612p.

Jurd L. & Geisman T. A., 1956. Arch biochimie biophysique, N°63, 376p. *In* Hamlat-Lazib N. Etude des flavononoides et des acides phénoliques du lentisque. Mém. Magister. ENS. Alger. 101p.

Jurd L et Geissman., 1962.Chemistry of flavonoids compounds, Ed, Pergamon, Press Now York.

Kamoun P., 1987. Appareil et méthodes en biochimie. Troisième Ed, Flammarion, France.

Khare. C P,2007. Indian Medicinal plant: An illustrated dictionary . Springer Amazon France. 778p.

Kiambi D., 1999 Assessment of the status of Agrobiobiodiversity in Djibouti. A contribution to the national Biodiversity strategy and action plan.

Lagnika L., 2005. Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes Béninoise. Thèse de doctorat, Univ d' Abomey-Calavi Benin.280p

Lauranson J., 1989. Exploitation de la diversité biochimique chez les conifères : contribution à l'étude de l'hybridation *Pinus uncinata* (Ram).X *Pinus sylvestris* (L) et à la connaissance du complexe spécifique *Pinus nigra*_(Arn). Thèse de doctorat, université Claude Bernard, Lyon I, 255p

Lebreton P., Jay M., Voirin B. & Boucher M. P., 1967. Analyse qualitative et quantitative des flavonoïdes, *Chimie analytique* N°49, p375-385.

Lebreton Ph et Netien G., 1967. Sur les flavonoides et autres substances poly phénoliques du *Millepertuis hypericum nummularium* L. Ed, Annales pharmaceutiques françaises, n°1, 69-79p.

Lugasi., Hovari J.Sagi KV., Birol.2003. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases . Acta.Biol.S Zeged., 47,119-125.

Mabry T. J., Markham K. R. & Thomas M. B., 1970. The systematic identification of flavonoïds. Springer verlag, Berlin, 345p.

Marcheix J.J., Fleuriet A., Jay- Allemand C. (2005). Les composes phénoliques des vegetaux : Un exemple de métabolites d'importance économique . PPUR presses polytechniques,84-86.

Markham K. R., 1982. Technique of flavonoïds identification, Académie press, London. 103p.

Markham K. R. & Mabry T. J., 1968. The identification of twenty-three 5-deoxy-and ten 5 hydroxy-flavonoids from *Baptisia lecontei* (Leguminosea). *Phytochemistry*, Vol 7: p791-801.

Meena MR. Et Sethi V., 1994. Antimicrobial of essential oils from spieces. J food. SCI and tech mysore, vol.31.pp.68-70.

Merah S.,2010. Analyse des composés phénoliques de *Inula viscosa* L. Recherche de leurs activités biologiques. Mém. Magister. USTHB. Alger. 109p.

Meyer V.R., 1999. Practical high performance liquid chromatography. Ed, Willey, Chichester, 338p.

MO. Y., NAGEL C., TAYLOR P. 1992 – Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonoïds in functional pollen.Proc. Natl. Acad. Sci. USA (89) 7213 – 7217 p.

Mushtaq A., Ajab Khan M., Manzoor S., Zafar M., and Sultana S., 2006. Chek list of Medicinal flora of Tehsil Isakhel, District Mianwali-Pakistan. 41-48.

Neto A.G., da Silva Filho A.A., Costa J.M.L.C., Vinholis A.H.C., Souza G.H.B., CunhaW.R., Silva M.L.A.E., Albuquerque S., Bastos J.K., 2004. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of the crude hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* (Amaranthaceae) roots. *Phytomedicine* 11 (7-8): 662-665.

OMS • (2002) Stratégie de l'OMS pour la médecine Traditionnelle pour 2002-2005

Ouafi S., 1987. Etude chimio- taxonomie des flavonoïdes des cultivars du Palmier dattier *Phoenix dactylifera* L. de la station de l'INRA de Adrar. Thèse de magistère, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, 125p.

Ouafi S., 2007. Contribution à l'étude biochimique du Palmier dattier, analyse des polyphénols des folioles de palme de cultivars du *Phoenix dactylifera* L. Dans un but

chimiotaxonomique. Thèse d'état en science de la nature, physiologie végétale, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, 140p.

Paris M. & Hurabielle M., 1980. Abrégé de matière médicale (pharmacognosie), Masson, Paris. p101-107.

Paris R. R. & Moyse H., 1976. Matière médicale, Tome 1, Masson et Cie, Paris. 447 p.

Plummer D.T., 1989. Introduction aux techniques de biochimie. Ed, Mc, Grow-Hill, Paris, 331p.

Psotova J. Lasousky J. Vicar J. (2003). Metal-chelating proprieties. Electrochemical behaviour, scavenging and cytoprotective activities of six naturel phenolics. Biomed . papers, 147,147-153.

Quezel P. & Santa S., 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome I. C N R S. Paris. 558p.

Qureshi R., Bhatti R and Memon R.,2010.Ethnomedicinal uses of herbs from northen part of Nara desert,Pakistan. Pak.J.Bot.,42(2):839-851,2010

Randerath K., 1971. Chromatographie sur couches minces. Ed, Gauthier Villa's.

Rayan KJ, Ray GC (editors)2004. Sherris Medical Microbiology 4th ed. Mc Graw Mill.

Remezy C., Manach C., Demigne C., Texier, O., Regerat F,1996. Nutritional interest of Flavonoids .Med . Nutr., 32,17-27.

Ribereau - Gayon P., 1968. Les composes phénoliques des végétaux, Dunod, Paris, 254p.

Roberts E.A.H, Cartwright R.A et Wood D.J., 1956: In Hamlat-LaziB N., 2006.

Rostagno M.A, Palma M et Barroso C.G., 2003: In Hamlat-Lazib N., 2006.

Sahki Abdallah et Sahki Rabea.,2004. Le Hoggar promenade botanique.

SAPORTA G. 1990 – Probabilités. Analyses des données et statistiques 1990. Edition Technip 493 p

Sarni - Manchado P. & Cheynier V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Tec et Doc, Paris. 1-9. *In* Bouchaita M. Tidjini Y. Contribution à la caractérisation et l'identification des composés phénoliques du Pacanier (*Carya illinoensis*) et leurs effets antimicrobiens. Mém. Ing. Univ. Sci. Agro- vétérinaire et bio. Blida, 170p.

Schwedt G., 1993. Atlas de poche des méthodes d'analyse, Ed, médecine sciences Flammarion, Paris, 234p.

Seigler D. S., 1977. Primary roles for secondary compounds. *Biochem Syst. Ecol.*, 5, p195-199.

Sharif A, Ejaz A , Abdul M, Mukhtar U, Munawar A, Aleeza F, Saeed A ,Jamil A , Muhammad A and Zaid M.,2011. Antimicrobial Constituents from *Aerva javanica* , J.Chem.Soc.Pak., Vol. 33, No.3,2011 .5p.

Skoog W et Holler., 2002. Chimie analytique, première édition, Ed, De Boeck Université.

Srinivas Reddy.k, Reedy.v.m, 2009. Antihyperglycaemic activity of ethanol extract of *Aerva javanica* leaves in alloxan- induced diabetic mice. India

Staneley ,2006 in Michelline M R,2009. Etude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de quelques Lamiaceae du Burkina Faso : cas de *Lucas Martinicensis* (Jacquin) R.Brown, mem .D.E.A univ de Ouagadougou.

Sumit L., Surendra K., Swarnkar., Sachin Zanwar., Vinit Movalia.,M. Manjunath Setty and Shirwaikar A., 2008.Amelioration of Cisplatin induced nephrotoxicity by aqueous extract of *Aerva javanica*.

Swain T., 1974. Comprehensive biochemistry. Elsevier, Amsterdam, 29A. 125-302. *In:* Gaceb-Terrak R. Contribution à l'étude de la fusariose du palmier- dattier (*Phoenix dactylifera* L.) identification des flavonoides. Thèse de magistère, Univ. Sc. Technol. Houari Boumediene, Alger, 170p.

Vanden B.D.A. and Vlietinck A.J., 1991, Screening methods for antibacterial and antiviral agent form higher plants. Academie Press 6 : 47-58.

Vercauterne J., 1996. Polyphénols 96. INRA, Paris. p31-43.

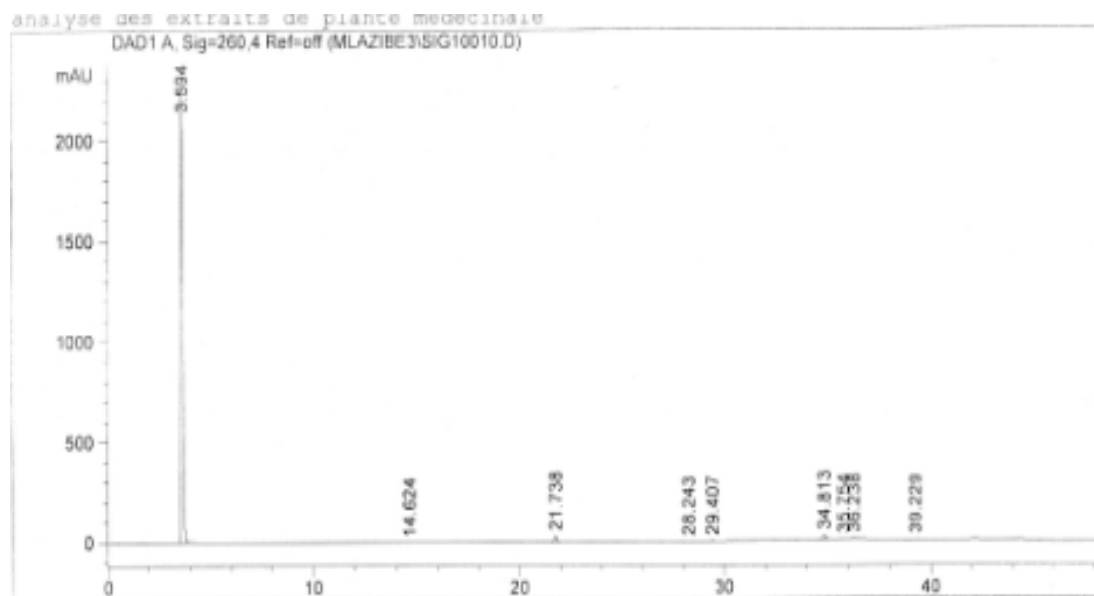
YLSTRA B., TOURAU A., BENITO. MORENO R. M., STOEGER E. VANTUREN A. J., MOL J. N., HEBERLE – BORSE. 1993 – Flavonols stimulate developpement germination and tube growth of tobacco pollen – plant physiology (**100**): 902 – 907 p.

Yost R.W, Ettre L.S et Conlom R.D., 1981. Pratique de la chromatographie liquide, technique et documentation.

Yrjonen T., 2004. Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural productions. Conférence Room 513 at Viikki infocentre; Faculty of pharmacy of the university of Helsinki. 64p.

Zafar M , Mushtaq A, Mir Ajab Khan and Asghar A 2009. Ethnobotanical Leaflets 10: 121-128.Pollen Pictorial of some Medicinal Plants from Pakistan

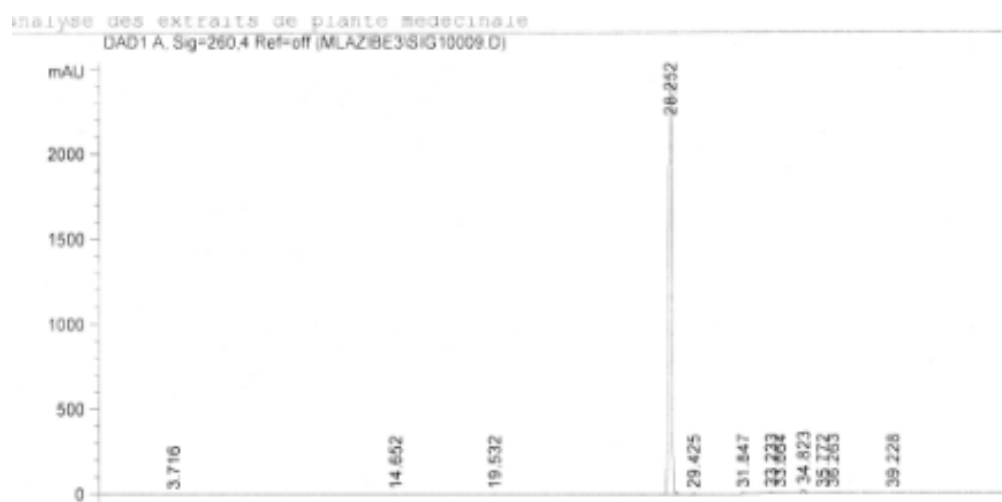
Annexe 1 : Profil HPLC des étalons.



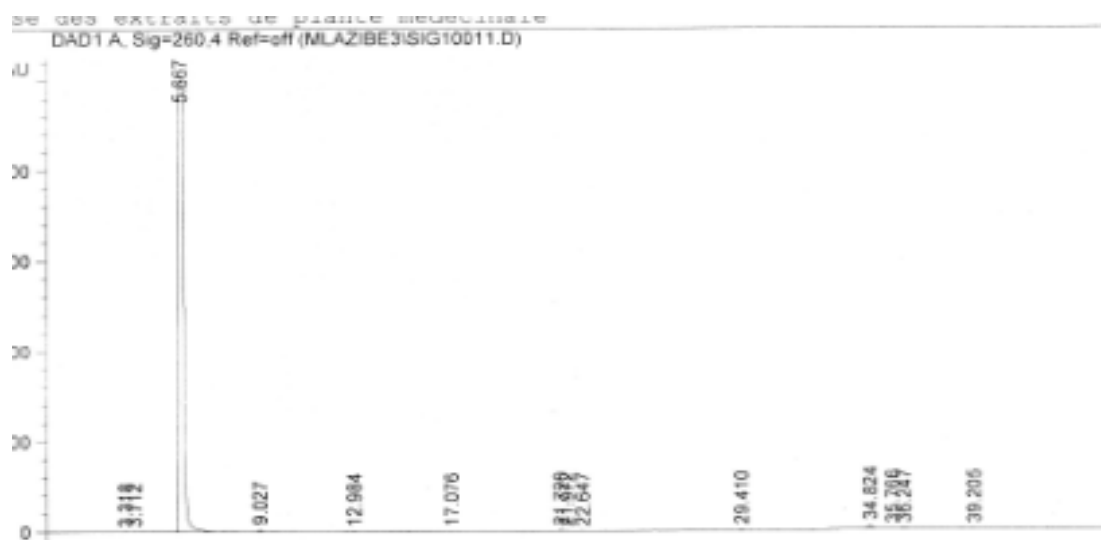
Acide ascorbique



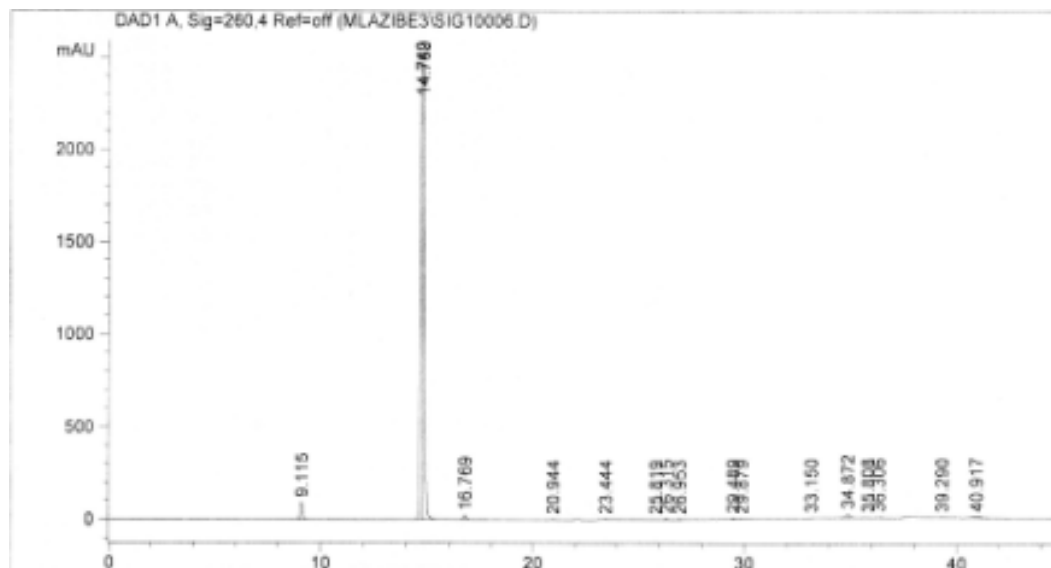
Acide caféique



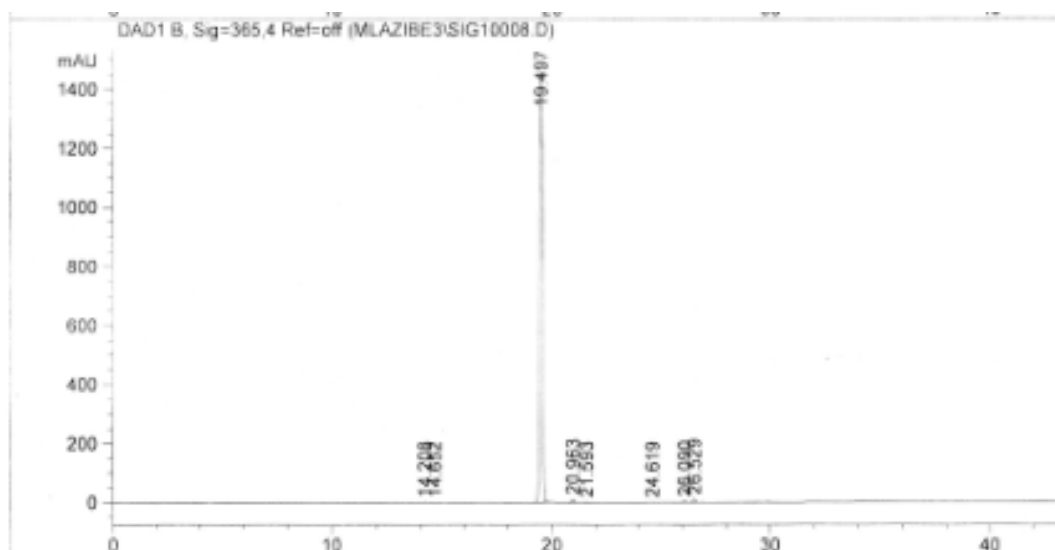
Acide cinnamique



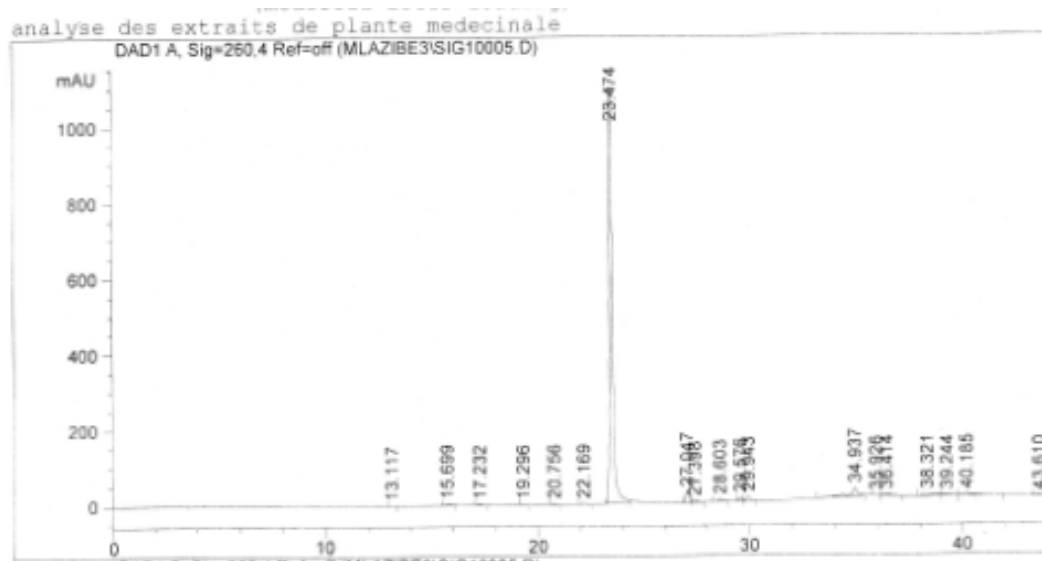
Acide gallique



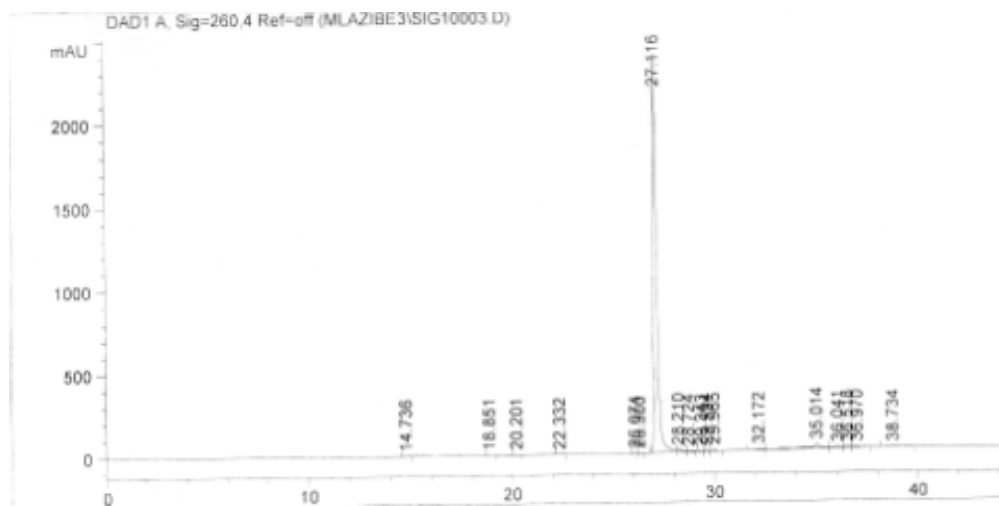
Acide vanillique



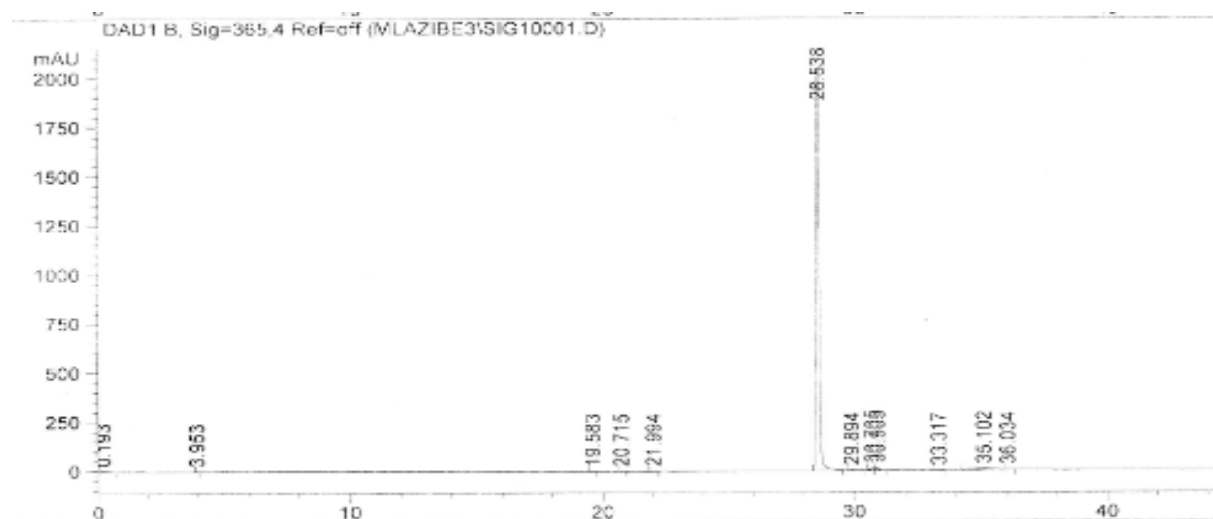
Acide sinapique



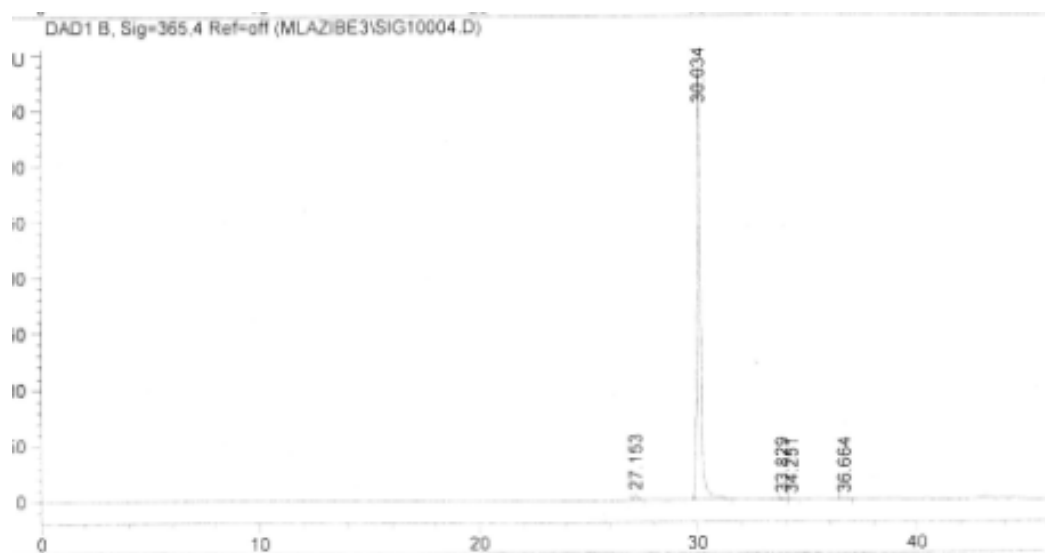
Myricetine



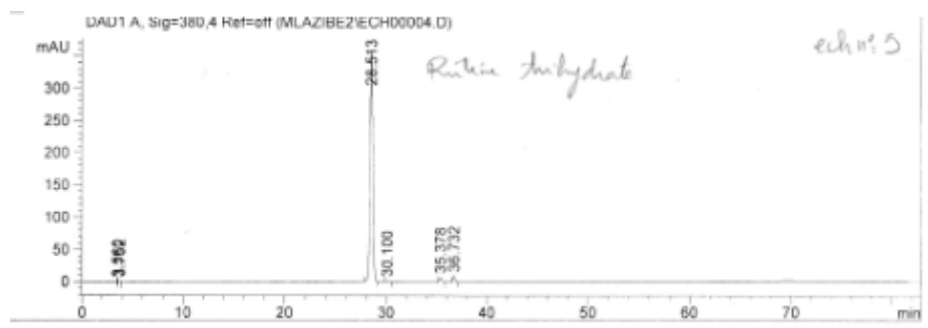
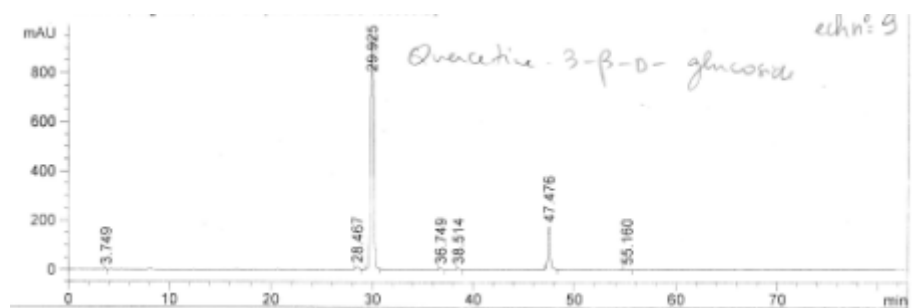
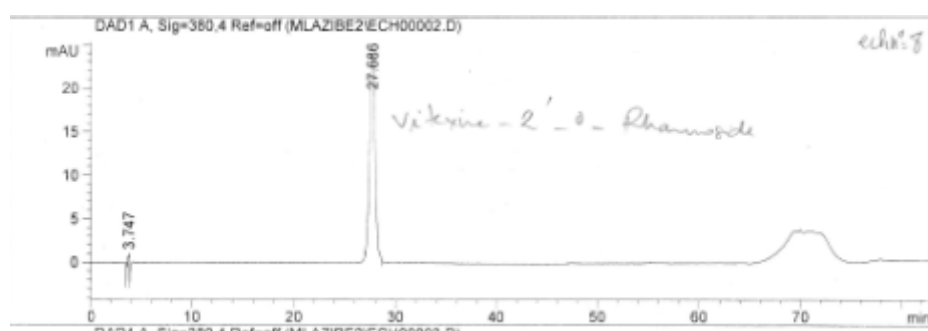
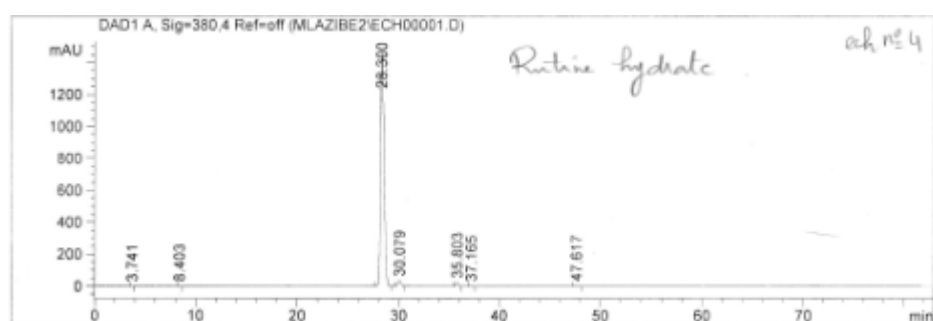
Quercetine



Lutéoline



Kaempferol



Abstract

This work is a contribution to the study of phenolic compounds, the plant species *Aerva javanica*, belonging to the Amaranthaceae family. Chosen for its therapeutic value and high antioxidant capacity, widely used in Tamanrasset in medicine and traditional medicine.

To use diverse, All parts of this plant are solicited: stems, leaves, roots, fruit.

The extraction of large families of polyphenols, with different solvents (polar and nonpolar), allowed us to: -Quantify visible by UV spectrophotometry following compounds (flavones, flavonols: $0.108 \text{ mg / g} \pm 0.04$, anthocyanins: $0.204 \text{ mg / g} \pm 0.069$ C-glycosides: $0.286 \text{ mg / g} \pm 0.129$, flavone aglycones free: $0.12 \text{ mg / g} \pm 0.13$ and glycosides: $1.63 \text{ mg / g} \pm 0.178$).

-Reveal and identify by thin layer chromatography (TLC), paper (CP), and high performance liquid chromatography (HPLC), the composition of each family to know 2 Flavone : luteolin (identified for the first time) and Apigenin 4 Flavonols: Myricetin, Quercetin, isorhamnéline (identified for the first time). and Kaemphérol 1 Anthocyanin : the Cyanidin. (identified for the first time)

5 C-glycosides: (identified for the first time) Vitexin, Iso-vitexin, vitexin 2" o-rhamnoside, Di C-glycoside Apigenin, Apigenin glycoside C Mono. And 3 O-glycosides: (identified for the first time) Di myricétine O glucoside, Myricetin 3 glucoside, Rutin (o di glyco-3-quercetin).

6 phenolic acids identified for the first time including 3 benzoic acid series' : gallic acid, p hydroxybenzoic acid, vanillic acid and 3 cinnamic acid Series': cinnamic acid, caffeic acid, sinapic acid.

1 organic Acid : Ascorbic acid and 1 simple phenol : Catechol. (identified for the first time)

The research results of the chemical diversity in our species showed that individuals studied divided into two distinct chemotypes that denote a possible presence of clones in the species *Aerva javanica*.

Microbiological and pharmacological tests showed that:

The phenolic compounds of *Aerva javanica* possess antibacterial activity, a strong analgesic property on flavonoid glycosides.

Key words : *Aerva javanica*, phenolic compounds, chemical diversity, antibacterial activity, analgesic activity, Tamanrasset.

ملخص

هذا العمل هو مساهمة في دراسة المركبات الفينولية، المتواجدة في النبتة *Aerva javanica* التي تنتمي الى عائلة Amaranthaceae .

الذي تم اختيارها لما لها من منافع علاجية عالية والقدرة المضادة للأكسدة، وتستخدم على نطاق واسع في تمارست في الطب التقليدي. يستخدم مختلف وجميع الأعضاء من هذا النبات: الجذوع والاوراق والجذور، زهور والثمار. تم استخراج المركبات الفينولية مع مذيبات مختلفة (القطبية وغير القطبية) من الاوراق والجذور، زهور *Aerva javanica*، وسمح لنا ذلك بالتقدير الكمي للمستخلصات الفينولية لكل عينة بواسطة أشعة الطيف فوق البنفسجية المرئية : (فلافونول، الفلافون: $0.108 \text{ ملغ / غ} \pm 0.04$ ، الانثوسيانين: $0.204 \text{ ملغ / غ} \pm 0.069$ C-جليكوسيدات: $0.286 \text{ ملغ / غ} \pm 0.129$ ، فلافون حرة: $0.12 \text{ ملغ / غ} \pm 0.13$ و O-جليكوسيدات: $1.63 \text{ ملغ / غ} \pm 0.178$). وبمعرفة تركيب كل مستخلص فينولي والكشف عن مكوناته باستعمال تقنية الكروماتوغرافيا على صفائح رقيقة و على الورق ، و الكروماتوغرافيا السائلة الفائقة الاداء (HPLC): 2 الفلافون : لتيولين: و ابيجينين 4 الفلافونول: ميرستين ، كيرستين، إزورمنتين اكتشفت لأول مرة، كاتفيرول.

1 أنتوسيان: سياندين. 5 C-جليكوسيدات اكتشفت لأول مرة: فيتكسين، إزو فيتكسين ، 2 فيتكسين رامنوزيد، دي C غليكوزيدات ابيجينين، مونو C غليكوزيدات ابيجينين. و 3 O-جليكوسيدات اكتشفت لأول مرة: دي غلوكوزيد ميرستين ، 3 غلوكوزيد ميرستين ، روتين 6 الأحماض الفينولية اكتشفت لأول مرة 3 تنتمي الى سلسلة البنزويكية: حمض الغاليك، حمض الهيدروكسي البنزويك ، حمض فانيليتش و 3 تنتمي الى سلسلة سيناميك: حمض سيناميك ، ، حمض كافيك وحمض سينابيك. 1 حمض عضوي: حمض الأسكوربيك و 1 الفينول: كاتكول. وأظهرت نتائج البحث عن التنوع الحيوي الفينولي داخل النوع النباتي أن العينات المدروسة موزعة إلى نوعين كيميائيين مختلفين وهذا الذي ربما يسمح بالقول انه يوجد نسخ في هذا النوع *Aerva javanica* تمتلك نشاط مضاد للجراثيم و أثبتت كذلك الاختبارات الميكروبيولوجية والفرماكلولوجية أظهرت المركبات الفينولية لنبتة *Aerva javanica* خاصية مسكن ناتجة عن المركبات الفينولية .

مفتاح الكلمات: *Aerva javanica*، المركبات الفينولية ، التنوع الحيوي الفينولي، النشاط المضاد للبكتيري ، النشاط مسكن و تمارست