

# UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

## THESE DE DOCTORAT

En Biologie

Spécialité : Biotechnologie végétale

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES  
MOLECULES ACTIVES DE *Cassia acutifolia* et de *Cassia obovata*.  
EFFET DU STRESS SALIN ET THERMIQUE SUR LA  
CALLOGENESE ET LA BIOSYNTHESE DES MOLECULES ACTIVES  
CHEZ *Cassia obovata*.

Par

**ROUIBI Abdelhak**

Devant le jury composé de :

Mr A. BERBER	Maître de conférences A, Université de Blida	Président
Mr L. KHELIFI	Professeur, INA El Harrach, Alger	Examineur
Mme M. BENDAHMANE	Professeur, Université de Sidi Bel Abbes	Examineur
Mr N. BOUCHNAFA	Maître de conférences A, Université de Blida	Examineur
Mme F. SAIDI	Professeur, Université de Blida	Promotrice

Blida, 10/11/2011

## RESUME

Dans le but d'exploiter et de valoriser les espèces végétales d'intérêt économique ou pharmaceutiques, nous avons mené une étude phytochimique sur deux plantes médicinales (*Cassia acutifolia* L. et *Cassia obovata* L.), traditionnellement utilisées en Algérie et dans le monde pour leurs vertus thérapeutiques.

L'utilisation des techniques de caractérisation telles que l'HPLC, la chromatographie ionique et la CG/SM, nous a permis d'identifier le profil phytochimique de ces plantes. L'analyse par HPLC montre que *C. acutifolia* et *C. obovata* renferment cinq types de molécules actives qui sont les sennosides B, A, C, la Rhéine-8-glucose et le sennoside D. La molécule principale la plus abondante est le sennoside B, qui représente 74.04 % chez *C. acutifolia* et de 74.4% chez *C. obovata*. Le rendement en huiles essentielles est faible et l'identification par CG/SM montre que le carvacrol est le constituant principal, sa teneur atteint 43%, chez *C. obovata*, alors que chez *C. acutifolia* elle est de 30,35%. Par ailleurs, l'analyse quantitative, a montré la richesse des deux espèces en flavonoïdes et en minéraux.

L'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de *C. acutifolia* et de *C. obovata* se révèle moyenne sur la totalité des microorganismes testés.

Les essais de la culture *in vitro* de *C. obovata*, montrent que cette plante manifeste des facultés callogènes. Le milieu approprié est celui de Marashige et Skoog auquel est additionnée une combinaison hormonale (1mg/l 2,4D + 1mg/l kinétine). Ce milieu procure un bon rendement en biomasse et stimule par ailleurs la biosynthèse des sennosides dans les cals, notamment les sennosides B. L'effet de plusieurs concentrations en NaCl (0%, 0.5%, 1%, et 1,5%) sur la biomasse des cals de *C. obovata* révèle que les meilleurs rendements en poids frais et sec s'obtiennent dans le milieu sans sel (témoin). Néanmoins le NaCl à 0,5% stimule sensiblement la biosynthèse de sennoside B dans les cals. Tous les organes des vitroplants soumis au stress thermique (4°C) montrent une diminution de la biosynthèse en sennoside B. Il est à souligner que cette même température réprime la biosynthèse de sennoside B dans les cals.

**Mots clés :** *Cassia acutifolia* L., *Cassia obovata* L., cals, molécules actives, profil phytochimique, stress salin, stress thermique.

## SUMMARY

In order to exploit and develop the plant species of economic or pharmaceutical interest, we undertook a phytochemical study on two medicinal plants (*Cassia obovata* L. and *Cassia obovata* L.), traditionally used in Algeria and in the world for their therapeutic virtues.

The use of the techniques of characterization such as the HPLC, the ionic chromatography and the GC/MS, enabled us to identify the phytochemical profile of these plants. The analysis by HPLC shows that *C. acutifolia* and *C. obovata* contain five types of active molecules which are the sennosides B, A, C, Rhein-8-glucose and sennoside D. The most abundant principal molecule is the sennoside B, which represents 74.04% at *C. acutifolia* and 74.4% at *C. obovata*. The essential oils output is weak and the identification by GC/MS shows that the carvacrol is the main constituent, with a content reaching 43%, at *C. obovata*, whereas at *C. acutifolia* it is of 30,35%. In addition, the quantitative analysis, showed the richness of the two species in flavonoids and minerals.

The antimicrobial activity of essential oils and the ethanolic extracts of *C. acutifolia* and *C. obovata* appears average on the totality of the micro-organisms tested. *In vitro* culture tests of *C. obovata* show that this plant expresses callogenous faculties. The suitable medium is that of MARASHIGE and SKOOG to which is added a hormonal combination (1mg/l 2,4D + 1mg/l kinétine). This medium gets a good output in biomass and in addition stimulates the biosynthesis of the sennosides in the cal, in particular the sennosides B. The effect of several NaCl concentrations (0%, 0.5%, 1%, and 1.5%) on the cal biomass of *C. obovata* reveals that the best outputs in fresh and dry weight are obtained in the medium without salt (pilot). Nevertheless NaCl with 0.5% stimulates appreciably the biosynthesis of sennoside B in the cal. All the vitroplants bodies subjected to the thermal stress (4°C) show a reduction in biosynthesis in sennoside B. It is to be stressed that this same temperature represses the biosynthesis of sennoside B in the cal.

**Key words:** *Cassia acutifolia* L., *Cassia obovata* L., cal, active molecules, profile phytochimic, saline stress, thermal stress. .

## المخلص

يندرج بحثنا في إطار إستغلال و تثمين الموارد النباتية ذات المنفعة الإقتصادية و الطبية. لقد تم التركيز على نبتتين شائعتي الإستعمال في مجال الطب الشعبي و هما *Cassia obovata et Cassia acutifolia*. إن إستخدام تقنيات الكروماتوغرافيا السائلة و المتطورة، الكروماتوغرافيا الأيونية و الكروماتوغرافيا الغازية المقرونة بطيف الكتلة مكنتنا من التعرف على مختلف المكونات الكيميائية لكل من النبتتين. إن الكروماتوغرافيا السائلة المتطورة سمحت لنا بالتعرف على خمس مكونات فعالة و هي على التوالي : سينوزيد B ، A ، C ، Rhéine-8 glucoside و D. و يعتبر السينوزيد B من أهم هذه المكونات حيث بلغت نسبته عند *Cassia acutifolia* 74.04 % في حين وصلت نسبته في *Cassia obovata* 74.4 %.

يعتبر مردود كل من *Cassia acutifolia* و *Cassia obovata* من الزيوت الأساسية ضعيف و عند تشخيص محتوى هذه الزيوت عن طريق الكروماتوغرافيا الغازية المقرونة بطيف الكتلة، ثبت أن هذه الأخيرة تحتوي على نسبة عالية من مركب carvacrol حيث بلغت نسبته على التوالي في كل من *Cassia* و *Cassia obovata* 43% و 30.35%. في حين أثبتت تحاليل الكمية وجود كميات معتبرة من الفلافينات و المعادن.

إن تجارب الإستنبات المخبري التي أجريت على نبتة *Cassia obovata* بينت أن لهذه الأخيرة قدرة كبيرة على تكوين الكالوس و ذلك في وسط الإستنبات MS مدعما بمنضومات النمو التالية ( 1 ملغ/لتر من مركب D 2,4 و 1 ملغ/لتر من الكينيتين). و حسب النتائج المتحصل عليها يعتبر هذا الوسط مثالي لنمو الكالوس كما يزيد على قدرة خلايا هذا الأخير على إنتاج المركبات الفعالة.

لقد أثبتت نتائج التجارب المتعلقة بدراسة تأثير كلوريد الصوديوم بجرعات مختلفة ( 0 %، 0.5 %، 1 % و 1.5 %) أن أعلى معدلات في الكتلة الحيوية لكالوس *Cassia obovata* تم التحصل عليها في أوساط الإستنبات الخالية تماما من كلوريد الصوديوم، في حين أن لكلوريد الصوديوم بتركيز 0.5 % أثر إيجابي على مردود تكون المواد الفعالة خصوصا السينوزيد B.

لقد سجلنا تراجع في معدلات المواد الفعالة لدى أعضاء النباتات المستنبتة مخبريا و التي تم إخضاعها إلى مؤثرات حرارية (4°C). نفس النتائج سجلت على الكالوس الذي خضع لنفس المؤثر.

الكلمات المفتاح : *Cassia obovata* ، *Cassia acutifolia* ، كالوس، الجزيئات الفعالة، المكونات الكيميائية،

المؤثرات الملحية، المؤثرات الحرارية.

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements les plus vifs s'adressent à mon directeur de thèse Mme SAIDI F. (Professeur à l'Université de Blida), qui m'a honorée en acceptant de diriger ce travail, je lui exprime mes sentiments de reconnaissances les plus sincères pour sa précieuse aide, ses encouragements et ses conseils.

Je tiens à remercier Mr BERBER A. (Maitre de conférences à l'Université de Blida) d'avoir accepté la présidence du jury de mon travail, qu'il trouve ici toutes mes expressions respectueuses.

J'exprime ma profonde gratitude et mes expressions de reconnaissance à Mme BENDAHMANE M. (Professeur à l'Université de Sidi-Bel-Abbès), d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma très grande considération et mon profond respect à Mr KHELIFI L. (Professeur à l'INA d'El-Harrach) et Mme BOUCHNAFA N. (Maitre de conférences à l'Université de Blida) qui ont accepté de juger ce travail en l'enrichissant par leurs conseils et réflexions.

Mes sentiments de reconnaissance vont également à l'encontre de toute personne qui a participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail en particulier, Mr Boutoumi H, Mr Brahim Errahmani, Mr Khali M et Mr Boukhatem N.

## TABLE DES MATIERES

RESUME

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	11
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1.1 Histoire des plantes médicinales	13
1.2 Place de la médecine traditionnelle dans le monde	17
1.3 Place des remèdes traditionnels en Algérie	18
1.4 définition de la phytothérapie et l'aromathérapie	18
1.5 récolte des plantes médicinales	19
1.6 séchage et conservation des plantes médicinales	20
1.7 préparation et modes d'utilisation	21
1.8 Eléments actifs de la plante	21
1.9 Etude botanique de séné	27
2. EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSE	42
2.1. Matériel	42
2.1.2. Matériel végétal	42
2.1.2.1 Récolte	42
2.2 Méthodes	42
2.2.1. Mise en évidence des sennosides par la chromatographie sur couche mince	42
2.2.1.1. Mode opératoire	42
2.2.1.1.1. Préparation de la solution à analyser	42
2.2.1.1.2. Préparation des phases mobiles et stationnaires	43
2.2.1.1.3. Développement du chromatogramme	43
2.2.1.1.4. Révélation et calcul du R <sub>f</sub>	44
2.2.2. Séparation des sennosides par chromatographie sur colonne	44
2.2.3. Analyse qualitative des sennosides par HPLC	45
2.2.4. Dosage des sennosides par spectrophotométrie UV-vis	45
2.2.5. Extraction des flavonoïdes	45
2.2.5.1. Macération et évaporation	46
2.2.5.2. Elimination des pigments et des lipides	46
2.2.5.3. Elimination des génines libres	46
2.2.5.4. Elimination des monosides et récupération des flavonoïdes	48
2.2.6. Dosage des éléments minéraux	48
2.2.6.1. Mode opératoire	49
2.2.7. Extraction et identification des huiles essentielles (HE) du séné	49
2.2.7.1. Extraction des huiles essentielles (HE)	49
2.2.7.2. Rendement en huiles essentielles	50

2.1.7.3. Identification des huiles essentielles par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)	
2.2.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne des l'huiles essentielles et de l'extrait alcoolique de <i>Cassia acutifolia</i> et <i>Cassia obovata</i>	50
2.2.8.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles	51
2.2.8.2. Activité antimicrobienne de l'extrait alcoolique	51
2.2.8.3. Mode opératoire	52
2.2.8.3.1. Préparation des milieux de culture	52
2.2.8.3.2. Préparation de l'inoculum et ensemencement	52
2.2.8.3.3. Dépôt des disques	52
2.2.9. Effet de la composante hormonale et du stress salin et thermique sur la biosynthèse des molécules actives <i>in vitro</i> chez <i>Cassia obovata</i>	53
2.2.9.1. Germination des graines de séné	53
2.2.9.1.1. Scarification chimique	53
2.2.9.1.2. Désinfection	54
2.2.9.2. Milieu de culture	54
2.9.3. Mise en culture des graines	54
2.2.9.4. Essai de l'embryogenèse somatique	54
2.9.4.1. Matériel végétal	55
2.2.9.4.2. Milieu de culture	55
2.2.9.4.3. Repiquage des explants	55
2.2.9.5. Effet du stress salin sur la biosynthèse des sennosides	56
2.2.9.5.1. Milieu de culture	56
2.2.9.5.2. Repiquage des cals	56
2.2.9.6. Effet de stress thermique sur la biosynthèse des sennosides dans les vitroplants et les cals	57
2.2.9.7. Etude statistique	57
3. RESULTATS ET DISCUSSION	58
3.1 Analyses phytochimiques	58
3.1.1. Analyse des sennosides par chromatographie couche mince (CCM)	58
3.1.2. Séparation de sennosides par chromatographie sur colonne	61
3.1.3. Analyse par HPLC de la fraction séparée par colonne	62
3.1.4. Analyse par HPLC des extraits éthanoliques du séné	64
3.1.5. Dosage des sennosides par spectrophotométrie UV-vis	69
3.1.6. Rendement et identification des huiles essentielles	71
3.1.7. Etude de l'activité antimicrobienne	77
3.1.8. Analyse des flavonoïdes	80
3.1.8.1. Rendement en flavonoïdes	80
3.1.8.2. Analyse des flavonoïdes par spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV- vis)	80
3.1.9. Dosage des éléments minéraux	82
3.1.9.1. Rendement en éléments minéraux	82
3.1.9.2. Analyse des minéraux par S.A.A	83
3.1.9.3. Analyse élémentaire par chromatographie ionique	85
3.1.9.3.1. Présence des anions	85

3.1.9.3.2. Présence des cations	85
3.2. Résultats de l'effet de stress salin et thermique sur la biosynthèse des molécules actives <i>in-vitro</i> chez <i>C.obovata</i>	91
3.2.1. Effet de la combinaison hormonale sur l'induction de la callogenèse	91
3.2.2. Effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals	92
3.2.3. Effet de la combinaison hormonale sur la teneur en sennosides dans les cals	95
3.2.4. Effet du stress salin sur la biomasse des cals	99
3.2.5. Effet du stress salin sur la teneur en sennosides des cals	102
2.5.5.1. Cals issus des explants Foliaires	102
2.5.5.2. Cals issus des explants caulinaires	103
2.5.5.3. Cals issus des explants racinaires	103
3.2.6. Effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides dans les vitroplants	106
3.2.6.1. Teneur en sennosides B dans les organes des vitroplants non soumis au stress thermique	106
3.2.6.2 Teneur en sennosides B dans les vitroplants soumis au stress thermique	108
3.2.7. Effet du stress thermique sur la teneur en sennosides dans les cals	110
3.2.7.1. Cals soumis au stress thermique	110
3.2.6.2. Cals non soumis au stress thermique	111
CONCLUSION	113
APPENDICES	
A. Liste des abréviations	
B. Identification des minéraux	
C. Activité antimicrobienne des extraits éthanolique et aromatique	
D. Etude statistique	
REFERENCES	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Plante de <i>Cassia acutifolia</i>	30
Figure 1.2	Fleurs de <i>Cassia acutifolia</i>	30
Figure 1.3	Gousses de <i>Cassia acutifolia</i>	31
Figure 1.4	Plante de <i>Cassia obovata</i>	32
Figure 1.5	Feuilles de <i>Cassia obovata</i>	32
Figure 1.6	Fleurs de <i>Cassia obovata</i>	33
Figure 1.7	Gousses de <i>Cassia obovata</i>	33
Figure 1.8	Structure chimique de l'antracène	35
Figure 1.9	Interconversion des dérivés anthracéniques.	35
Figure 1.10	Structure chimique des dérivés hydroxyanthracéniques	36
Figure 1.11	Structure chimique des sennosides A et B	37
Figure 1.12	Structure chimique des sennosides C et D	38
Figure 1.13	Structure chimique de la Rhéine-8-glucose	38
Figure 2.1	Schéma des différentes étapes d'extraction des Flavonoïdes	47
Figure 3.1	Chromatogramme des sennosides de <i>C. obovata</i>	60
Figure 3.2	Chromatogramme des sennosides de <i>C. acutifolia</i>	60
Figure 3.3	Spectre d'absorption de sennoside B chez <i>C. obovata</i>	61
Figure 3.4	Spectre d'absorption de sennoside B chez <i>C. acutifolia</i>	62
Figure 3.5	Chromatogramme de sennoside B chez <i>C. acutifolia</i> à 270 nm	63
Figure 3.6	Chromatogramme de sennoside B chez <i>C. obovata</i> à 270 nm	64
Figure 3.7	Chromatogramme de l'extrait éthanolique du senokot	66
Figure 3.8	Chromatogramme de l'extrait éthanolique du <i>C. acutifolia</i>	67

Figure 3.9	Chromatogramme de l'extrait éthanolique du <i>C. obovata</i>	
Figure 3.10	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>C. acutifolia</i>	
Figure 3. 11	Chromatogramme de l'huile essentielle de <i>C. obovata</i>	74
Figure 3.12	Spectre d'absorption des flavonoïdes de <i>C. obovata</i>	81
Figure 3.13	Spectre d'absorption des flavonoïdes de <i>C. acutifolia</i>	82
Figure 3.14	Standard anions	88
Figure 3.15	Teneur en anions chez <i>C. obovata</i>	88
Figure 3.16	Teneur en anions chez <i>C.obovata</i>	89
Figure 3.17	Standard cations	89
Figure 3.18	Teneurs en cation chez <i>C.obovata</i>	90
figure 3. 19	Teneur en cation chez <i>C. acutifolia</i>	90
figure 3.20	Effet de la composante hormonale sur les variations de Poids frais des cals	94
figure 3.21	Effet de la composante hormonale sur les variations de Poids sec des cals	95
figure 3. 22	Effet de la combinaison hormonale sur la teneur en sennosides	97
figure 3. 23	Effet de la combinaison hormonale sur la teneur moyenne en sennosides de différentes cals	98
figure 3. 24	Effet de la combinaison hormonale et la nature de l'explant sur la teneur en sennoside B dans les différents cals	99
figure 3. 25	Effet des différentes concentrations en NaCl sur le poids frais des cals	101
figure 3. 26	Effet des différentes concentrations en NaCl sur le poids sec des cals	102
figure 3. 27	Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en sennoside B dans les cals	105
figure 3. 28 a	Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en sennoside B dans les cals issus des explants foliaires	105
figure 3. 28 b	Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en sennoside B dans les cals issus des explants racinaires	106
figure 3. 29	Teneur en sennosides dans les différents organes de vitroplants	107
figure 3. 30	Variation de la teneur en sennoside B durant les 3 mois de culture	108

figure 3. 31	Teneur en sennosides dans les organes de vitroplants soumis au stress thermique	109
figure 3. 32	Teneur en sennoside B dans les organes de vitroplants soumis et non soumis au stress thermique	110
Figure 3.33	Teneur en sennoside B dans les cals soumis et non soumis au stress thermique	112
Tableau 2.1	Souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne	51
Tableau 3.1	Représentation des Rf obtenus par CCM de <i>C.acutifolia</i> et <i>C.obovata</i>	59
Tableau 3.2	Dosage des sennosides par spectrométrie.	70
Tableau 3. 3	Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>C. obovata</i> identifiés par GC/MS.	75
Tableau 3.4	Composés majoritaires de l'huile essentielle de <i>C. acutifolia</i> identifiés par GC/MS.	76
Tableau 3.5	Activités antimicrobiennes des huiles essentielles de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> .	79
Tableau 3.6	Activités antimicrobiennes des extraits éthanolique de <i>C.acutifolia</i> et <i>C. obovata</i> .	79
Tableau 3.7	Longueurs d'ondes et absorbances correspondant aux flavonoïdes de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>	81
Tableau 3.8	Teneur en éléments minéraux de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>	83
Tableau 3.9	Teneur en éléments minéraux de <i>C. acutifolia</i> et <i>C. obovata</i>	84
Tableau 3.10	Pourcentage des explants callogenèse	92

## INTRODUCTION

La phytothérapie consiste en l'utilisation des plantes médicinales non seulement pour prévenir mais aussi pour guérir certains troubles physiologiques ou maladies. Il s'agit d'une thérapeutique millénaire. Ainsi, l'homme a toujours cherché à se servir des plantes qui possèdent des propriétés médicamenteuses mais qui ne présenteraient pas de contre indications. Les substances naturelles sont à l'origine de plus de 50 % des médicaments actuels [1].

Les plantes aromatiques et médicinales représentent une partie considérable de la biodiversité naturelle de beaucoup de pays. Cependant, elles ont été longtemps négligées et marginalisées par les chercheurs et les efforts pour leur conservation sont restés minimes [2].

La découverte des molécules d'intérêt thérapeutique majeur est due à l'immense travail de recherche. Ce dernier concerne notamment les enquêtes effectuées auprès des personnes qui détiennent, de génération en génération, par tradition orale, la connaissance des vertus thérapeutiques des végétaux dans leur environnement. C'est ainsi que de nouvelles plantes médicinales à travers le monde ont pu être inventoriées. Cet apport continuellement renouvelé de plantes médicinales est considérable. Néanmoins, beaucoup de plantes pouvant avoir des actions thérapeutiques notables restent à découvrir [3].

Actuellement, les biotechnologies végétales ont pour perspective non seulement l'enrichissement de la pharmacopée mais visent aussi la valorisation des espèces végétales à intérêt économique et pharmaceutique [4].

L'organisation mondiale de la santé estime que près de 80% de la population mondiale utilise principalement des remèdes à base de plantes, et que 40% des produits pharmaceutiques dérivent des plantes [5].

L'Algérie possède des potentialités floristiques extrêmement variées constituant de véritables ressources biologiques dont la connaissance scientifique

sur le plan fondamental et appliqué est indispensable [6]. Parmi ces plantes, figure le séné. Cette plante pousse spontanément dans les oueds du Sahara méridional (Tindouf, Hoggar, Tassili, Illizi et Tamanrasset) et dont les espèces les plus connues sont : *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata* utilisées par la population locale à des fins thérapeutiques [7].

Dans le cadre de la recherche sur les plantes médicinales, nous nous sommes intéressés à l'étude de plantes de séné xérophytes du sud algérien en l'occurrence *Cassia acutifolia* L. et *Cassia obovata* L.

Le but de notre étude est d'apporter des éléments de connaissances chimiques et biologiques relatifs à ces plantes à travers :

- L'extraction, l'identification et le dosage de certains composés chimiques actifs des deux espèces étudiées.
- L'étude biologique portant sur l'effet antimicrobien des molécules actives (huiles essentielles et extrait éthanolique).
- La détermination du milieu et les conditions de culture favorables pour l'aptitude à la callogenèse de l'espèce *Cassia obovata* ainsi que l'impact du stress salin et thermiques sur la biosynthèse des molécules actives *in vitro* dans les cals.

## CHAPITRE 1

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

#### 1.1 Histoire des plantes médicinales

Les traces de l'utilisation des plantes médicinales existent dans des textes chinois datant de plus de 5000 ans avant J.C. Les inscriptions cunéiformes, présentes sur des tablettes sumériennes de Mésopotamie, prouvent que le pavot était déjà recherché il y a plus de 2000 ans avant J.C. Le papyrus médical d'*Ebers* (environ 1500 ans avant J.C.) est le premier recueil consacré aux plantes médicinales, proposant un inventaire de 12 plantes accompagnées de leur mode d'utilisation (myrrhe, ricin, ail etc.). Les Egyptiens possédaient déjà des notions de pharmacopée et plus de 200 plantes différentes, ramenées de Syrie par le pharaon *Thoutmôsis* III. En Inde, les « *vedas* », livres sacrés contenant toute la sagesse divine, rédigés vers 1500 ans avant J.C., témoignent eux aussi de la connaissance des plantes. Le *Khella* et la *Centella* furent déjà décrits dans le traité médical dénommé « *Charaka Samhita* » vers 700 ans avant J.C [8] [9].

Plus tard, la Grèce antique s'est distinguée avec les premiers thérapeutes du monde occidental. Hippocrate (460-377 avant J.C) dispensa son enseignement précieux sur l'île de Cos. Il considérait la maladie comme un phénomène normal et préférait laisser agir la nature. Il fut le premier à mentionner des observations cliniques avec plus de 230 plantes médicinales. A cette époque un début de classement selon la toxicité des plantes fût élaboré par des savants célèbres (Sérapion, Pline) mais surtout Théophraste (372-287 avant J.C.), qui fût certainement le botaniste le plus marquant de toute l'antiquité.

Plus tard, *Dioscoride*, herboriste grec (100 ans avant J.C.), écrivit un recueil de cinq livres consacré à plus de 500 espèces de plantes médicinales, regroupant les Labiées et les Astéracées. Cet ouvrage connu sous le nom de « *Materia Medica* », fût publié pour la première fois en 1478. Il constitua la référence principale en Europe jusqu'au XVIIIe siècle, en rassemblant environ 600

plantes. *Galien* (130-201 avant J.C.), d'origine grecque, élaborait sa théorie des « quatre humeurs » et s'intéressa surtout à l'anatomie. Il écrivit seulement trois livres et se limita aux plantes qu'il appréciait personnellement. Il est considéré comme le père de la pharmacie [8] [9].

Au deuxième siècle, le commerce entre l'Europe, le Moyen-Orient, l'Inde et l'Asie commence à se développer et les routes commerciales livrent déjà les premières épices [9]. Toutes les grandes civilisations ont eu leurs traditions phytothérapeutiques. Au Moyen-âge, de nombreuses écoles de médecine furent fondées, comme la célèbre école de Salerne en Italie, qui utilisait déjà la sauge (*la plante qui sauve*), tandis que les guérisseurs usaient du pavot et même du cannabis comme analgésique.

L'épanouissement de la culture arabe (VIIe – XVe siècles) fournissait d'excellents médecins et pharmaciens, qui furent à l'origine de découvertes importantes (préparation des essences par distillation) et qui ont compté de célèbres praticiens (Avicenne 980-1037).

Le développement des explorations est incarné par les grands navigateurs, dont Christophe Colomb, qui rapporta de nombreuses plantes des Antilles, comme le bois de gaïac. En 1533, les Espagnols découvrirent la coca du Pérou. C'est aussi l'époque où le cardinal *Jésuite Juan de LUGO* ramena la célèbre « poudre de Jésuites », composée de l'écorce de quinquinas, de la Cordillère des Andes, qui, un peu plus tard, fût le fébrifuge apprécié de certains rois de France [8] [9].

La route des épices vers l'Orient était aussi ouverte : la sauge et les plantes des monastères étaient échangées contre le gingembre, la cardamome, la noix muscade, le curcuma, le safran des Indes, le séné et d'autres plantes médicinales. Paracelse (1493-1541), alchimiste et professeur de médecine à Bâle, considéré comme le père de la chimie, il rédigea une œuvre en dix volumes, au sein de laquelle les plantes avaient une place toute particulière.

Dès le XVIIe siècle, d'éminents botanistes ont élaboré les fondements d'une classification qui, modifiée au cours des années, fait actuellement autorité. *N. Culpeper* (1616-1654) développa les « herbiers » imprimés, ce qui permit aux propriétés thérapeutiques des plantes d'être mieux connues. Parallèlement, la consommation de thériaques, composées de dizaines de drogues héroïques (mandragone) était à son comble. Une histoire de la flore universelle, « *Historia plantarum* », traitant de plus de 18000 espèces, fut entreprise par *J. RAY* (1628-

1705). Les œuvres de C. LINNÉ (1707-1778), naturalistes suédois, sont immenses. Ce Père de la systématique comprit l'importance des espèces et leurs noms et publia de nombreux ouvrages : « *Genera Plantarum* » (8000 plantes), « *Species Plantarum* » (5900 plantes), « *Systema Naturae* » ainsi que d'autres ouvrages. Tous les cinq membres de la famille de *Jussieu*, médecins et botanistes (1686-1853), furent passionnés de systématique et constituèrent une référence, sans oublier le naturaliste Buffon (1707-1788) et la célèbre « *Histoire Naturelle* ».

En 1692, paraissait la première « *Pharmacopée Royale Galénique et Chimique* » rédigée par M. Charas, véritable recueil de préparations médicamenteuses. En 1778, le premier diplôme d'herboriste était décerné par la Faculté de Médecine de Paris. Le premier codex français parut en 1818 et les éditions se sont succédées jusqu'à la parution de la dernière édition de la pharmacopée européenne.

Au XIXe siècle, la découverte des molécules originales, qui font la valeur thérapeutique des drogues héroïques, a été impressionnante. Pour ne prendre que quelques exemples très ponctuels, *Meissner* proposa en 1819 le nom d'«alcaloïde», ayant observé le premier que ces substances azotées, présentes dans certaines plantes, possédaient des propriétés basiques. Ces molécules hétérocycliques, dérivant d'acides aminés, sont biosynthétisées à la fois par les plantes et par certains animaux. Elles présentent une forte affinité pour les récepteurs humains, d'où des effets pharmacologiques et thérapeutiques marqués, ce qui implique aussi leur toxicité à dose plus élevée [8].

Des progrès immenses ont été réalisés à cette époque par des pharmaciens et des chimistes qui ont étudié nombre de plantes exotiques de notre environnement. Les secrets des remèdes d'autrefois commençaient à être découverts. C'est ainsi que pour ne prendre que l'exemple du pavot, la morphine fut isolée par *Serturmer* en 1817, la codéine par *P. Robiquet* en 1832 (il isola aussi l'asparagine de l'asperge), et la papavérine par *Merck* en 1848. Bien entendu, les structures chimiques complètes de ces composés furent élucidées. C'est aussi l'époque de l'isolement de l'inuline à partir de l'aunée (1804), de l'acide salicylique de l'écorce de saule (1838) et le commencement d'une longue série. *P.J. Pelletier* (1788-1842) et *J. Caventou* (1795-1877) isolèrent en 1820 et pour la première fois, des substances naturelles pures qui devaient faire l'orgueil de notre pharmacie, comme la quinine, la strychnine et la colchicine. C'est aussi l'époque

de la découverte de toute une série d'alcaloïdes (atropine, éserine, cocaïne etc.)

Des études effectuées sur les curares des Indiens de l'Amazonie et de Colombie, ramenés par l'expéditions, permirent vers 1850 au physiologiste *C. Bernard* (1813-1878) de mettre en exergue les bases d'une nouvelle discipline, la pharmacologie expérimentale [8]

Rendons aussi hommage à *W. Withering* (1741-1799), médecin anglais qui découvrit le premier les effets bénéfiques de la digitale dans l'hydropisie. Mais aussi à *Nativelle*, pharmacien français, qui isola en 1868 les hétérosides cardiotoniques à partir de la digitale pourpre, médicaments qui ont sauvé des générations d'insuffisants cardiaques.

Récemment, de nombreuses drogues utilisées sous forme d'extraits commencèrent à être de plus en plus utilisées, comme l'aubépine, le ginkgo. D'autres plantes continuent à apparaître sans cesse sur le devant de la scène, dans des axes thérapeutiques novateurs (millepertuis, épilobe, échinacée). Ainsi partant des feuilles ou des fleurs séchées de la phytothérapie empirique, passant par l'étape de la phytothérapie extractive, on arrive progressivement à la phytothérapie moderne où les principes actifs des plantes sont présentés à l'état pur sous forme de molécules chimiques.

Actuellement se manifeste un certain désir de retour vers la nature. Les mouvements écologiques se multiplient. Ce désir de retour à la nature se manifeste également par un regain d'intérêt pour les traitements par les plantes que la publicité exploite largement. Les vitrines des pharmacies se couvrent de petits paquets de feuilles sèches dont les vertus sont explicitées par de magnifiques gravures [8] [9].

Enfin, évoquons d'un mot les milliers de travaux de pharmaco-chimie sur les produits naturels qui se sont succédé surtout depuis 1950, et qui ont permis à des milliers de malades de retrouver l'espoir [9].

## I.2. Place de la médecine traditionnelle dans le monde

Depuis l'antiquité l'homme utilise les plantes comme une source principale de nourriture, par la suite s'est développé leur utilisation comme médicaments et remèdes pour soigner les différentes maladies. Jusqu'à maintenant, les plantes sont encore destinées à la santé humaine malgré les efforts des chimistes qui essaient de synthétiser de nouvelles molécules. Ainsi, plus de 25% des médicaments dans les pays développés dérivent directement ou indirectement des plantes [10].

Les plantes, avec leur nombre illimité, constituent un réservoir immense de nouveaux composés médicinaux potentiels, grâce à leurs molécules qui présentent l'avantage d'une grande diversité de structures chimiques et activités biologiques.

Ainsi, en Chine, 40% environ de l'ensemble des soins de santé relèvent de la médecine traditionnelle. Au Chili et en Colombie, respectivement, 71% et 40% de la population, ont recours à la médecine traditionnelle. En Inde, 65% de la population rurale utilisent les plantes médicinales pour des soins primaires de santé. Dans les pays développés, les médecines traditionnelles, complémentaires et parallèles connaissent un succès croissant. Ainsi, le pourcentage de la population ayant eu recours à ces médecines au moins une fois est de 48% en Australie, 31% en Belgique, 70% au Canada, 49% en France et 42% aux Etats-Unis d'Amérique [11].

La médecine traditionnelle a également été appliquée au traitement de maladies très graves comme le paludisme ou le SIDA. Des études menées en Afrique et en Amérique du Nord ont montré que 75% des personnes vivant avec le VIH/SIDA ont recours à la médecine traditionnelle, exclusivement ou en complément avec d'autres traitements.

Au Ghana, au Mali, au Nigeria et en Zambie, les plantes médicinales sont le traitement de première intention pour plus de 60 % des enfants atteints de forte fièvre [12]. La plante est la meilleure usine de la substance thérapeutique. Plusieurs plantes sont utilisées en phytothérapie. Leur champ d'action est vaste et

leur puissance varie. La plupart ont des effets spécifiques sur certaines parties de l'organisme et sont reconnues pour pouvoir traiter diverses maladies [1].

### 1.3. Place des remèdes traditionnels en Algérie

Le territoire algérien couvre d'importantes ressources végétales réparties sur les côtes, les plaines, les montagnes, le Sahara et autour des points d'eau. Ces ressources naturelles sont importantes pour l'économie Algérienne et pour le maintien de l'équilibre écologique de la région. Parmi ces ressources, il existe au moins 500 espèces de plantes médicinales utilisables par les phytothérapeutes dont 100 espèces se vendent sur les marchés ou chez les herboristes [13].

Selon Colette. (2004) [14], le thym, contient une essence composée de deux phénols, de plusieurs alcools, de carbures ainsi que beaucoup de tanins. Utilisé comme aromate, le thym est un antiseptique de l'intestin et des bronches. En infusion, il combat la coqueluche et la toux. L'ortie contient une saponine, une huile essentielle, des tanins, des substances mucilagineuses et un alcaloïde appelé lamine. Elle est très utilisée aujourd'hui dans les soins capillaires. La menthe contient une essence douée de propriétés antiseptiques. Son principe actif, le menthol, est contenu dans toutes les parties de la plante. Son contact procure une sensation de fraîcheur. Il peut agir comme stimulateur nerveux ou comme sédatif et antispasmodique.

La sauge est connue depuis des siècles comme une plante médicinale. Le principe actif est localisé dans les feuilles qu'il faut cueillir à la fin du printemps avant que les fleurs ne s'épanouissent totalement. Les feuilles ont une odeur agréable qui suscite leur utilisation culinaire, son usage stimule l'appétit. La sauge possède aussi un effet hypoglycémiant [14].

### 1.4. Définitions de la phytothérapie et l'aromathérapie

La phytothérapie et l'aromathérapie sont des médecines allopathiques : les molécules agissent en détruisant les causes du mal ou en supprimant l'expression de la maladie.

La phytothérapie désigne l'utilisation des plantes médicinales à des fins thérapeutiques. La phytothérapie, propose des remèdes naturels, bien acceptée par l'organisme. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en occident,

spécialement dans le traitement des maladies chroniques, comme l'asthme ou l'arthrite. De plus, les effets secondaires induits par les médicaments inquiètent les utilisateurs, qui se tournent vers des soins moins agressifs pour l'organisme. On estime que 10 à 20% des hospitalisations sont dues aux effets secondaires des médicaments chimiques [15].

Branche de la phytothérapie, l'aromathérapie a acquis ses lettres de noblesse et est devenue une thérapeutique à part entière. L'aromathérapie se définit comme: « le traitement, à titre préventif ou curatif, des maladies physiques et psychosomatiques par les "arômes végétaux" : les huiles essentielles et les essences extraites des plantes odoriférantes qui possèdent des vertus médicinales sont administrées par les différentes voies compatibles avec leur nature huileuse » [15]. L'aromathérapie est donc moins «douce» qu'il n'y paraît. Certains pourraient lui reprocher d'agir à la manière de l'allopathie en se focalisant sur le symptôme pour le combattre. Mais ce procès est faux à plus d'un titre.

Les huiles essentielles diffèrent fondamentalement des antibiotiques qui sont par définition des substances mortes, hostiles à la vie et perturbatrices des métabolismes naturels vitaux. Au contraire, les huiles essentielles sont des «eubiotiques» dépourvus d'effets secondaires, qui améliorent et favorisent une profonde revitalisation de l'organisme [1].

### 1.5. Récolte des plantes médicinales

La quantité en principes actifs dans la plante dépend de son biotope, de son stade de développement et de son âge. Toutefois, il est à signaler que la quantité et la composition en principes actifs varient au cours de la croissance ainsi qu'au cours de la journée [16]. Les plantes médicinales seront donc cueillies lorsque la teneur en matières actives est la plus forte. La récolte se fait par temps sec, après le levé du soleil et la disparition de la rosée. Les parties aériennes de la plante se récoltent au moment de la floraison [16]. Quand aux parties souterraines, elles se récoltent en automne en l'occurrence après la mobilisation des réserves [17].

## 1. 6. Séchage et conservation des plantes médicinales

La récolte et le séchage des plantes médicinales demandent autant de soins car les drogues doivent préserver leurs qualités médicinales. Le séchage se fait à l'abri de la lumière. Les rayons solaires causent une déperdition des matières actives, un jaunissement et un brunissement rapides des végétaux, ainsi qu'une altération de leur valeur médicinale [16].

Le séchage est suivi d'une conservation. Toutes les plantes doivent être conservées à sec et à l'obscurité, dans des récipients fermés. Elles peuvent être éventuellement conservées dans des boîtes en carton ou des sachets en papier. Lorsqu'il s'agit de quantités importantes, on utilise des sacs en toile. Les emballages dans des sachets en plastiques sont à éviter [18].

Certaines drogues sont particulièrement sensibles à l'humidité de l'air (drogues hygroscopiques). Elles sont conservées exclusivement dans des bouteilles de verre brun [19]. Pour une bonne conservation des drogues, on vérifie souvent l'état des plantes. Toute trace d'humidité, de moisissure, et d'insectes qui altèrent leur valeur médicinale est à proscrire [15].

## 1.7. Préparation et modes d'utilisation

L'action des plantes médicinales ne dépend pas seulement de leurs propriétés et de leurs qualités, mais également de la manière dont elles sont appliquées. Il existe en effet de nombreux modes quant à leur utilisation: fraîches ou séchées, pour un usage externe ou interne. On peut utiliser une plante seule ou un mélange de plusieurs drogues. Parfois, la médecine utilise une combinaison de préparations traditionnelles naturelles en additionnant des composés synthétiques [16].

### 1.7.1. L'infusion

C'est le mode de préparation le plus connu. Il s'obtient en versant de l'eau bouillante sur des feuilles ou des fleurs placées dans un récipient. On laisse saisir

quelques secondes à l'ébullition. On couvre le récipient. Le temps d'infusion est de durée variable, de 5 à 15 minutes en moyenne [20].

### 1.7.2. Macération

Certains constituants sont tellement fragiles que même l'infusion risque de les altérer. Le mode le plus adéquat de leur préparation est la macération. C'est un processus d'extraction à température ambiante. Le solvant utilisé peut être l'eau, l'alcool et parfois le vin. Le temps de macération dépend des propriétés intrinsèques de la drogue. La macération à l'eau ne doit pas se prolonger trop longtemps pour éviter tout risque de fermentation [21].

### 1.7.3. Les sirops

Il s'agit, de solutions concentrées en sucre dans l'eau ou dans des extraits de drogues pouvant contenir d'autres substances. Ils sont utilisés par voie orale. On peut mentionner le sirop composé à base de thym ou le sirop à base de framboise ou de plantain. Ces préparations galéniques sont surtout appréciées en pédiatrie où on les utilise souvent pour leurs vertus antitussives [22].

### 1.7.4. La poudre

Les plantes séchées à l'ombre sont finement coupées puis broyées dans un mortier en porcelaine. Ces plantes seules ou en mélange sont vendues en sachets (infusettes) pour faire des tisanes. Certains malades prennent la poudre directement sur la langue, ou la mélangent à leurs aliments [22].

## 1.8. Eléments actifs des plantes

En raison de leur valeur au plan économique ou médical, les chercheurs en chimie organique et ceux qui s'intéressent aux substances naturelles, ont étudié les métabolites secondaires depuis des siècles. Cependant, jusqu'à une époque récente, ces métabolites ont été considérés comme produits de déchets des métabolismes chez les plantes. Durant ces dernières décennies, il a été montré que de nombreux métabolites secondaires jouaient un rôle écologique important

[23]. Des fonctions aussi importantes que la préservation contre les infections microbiennes, où que l'attraction exercée sur les pollinisateurs et les agents qui permettent la dispersion des fruits, sont devenues des thèmes qui sont au centre de la recherche de ces métabolites secondaires [23].

### 1.8.1. Phénols

Les phénols forment une grande famille de composés chimiques très divers depuis les simples acides phénoliques jusqu'aux grands polymères complexes qui sont, les tanins et la lignine [24].

Il existe une très grande variété de phénols, de composés simples comme l'acide salicylique (molécule donnant par synthèse l'aspirine), à des substances plus complexes comme les composés phénoliques auxquels sont rattachés les glucosides [25].

On suppose que les plantes, en les produisant, cherchent à se prémunir contre les infections et les insectes phytophages. Les acides phénoliques, comme l'acide rosmarinique, sont fortement antioxydants et anti-inflammatoires et peuvent avoir des propriétés antivirales [1].

### 1.8.2. Huiles essentielles

Les huiles essentielles extraites des plantes par distillation comptent parmi les plus importants principes actifs des plantes. Elles sont largement utilisées en parfumerie [25]. Les huiles essentielles des plantes sont des composés oxygénés, parfois d'origine terpénoïde et possédant un noyau aromatique.

Les huiles essentielles sont à différencier des huiles fixes ou des huiles obtenues par l'hydrolyse des glucosides, comme la chamazulène de la camomille allemande (*Chamomilla recutita*), elles sont formées lors de la distillation mais elles sont absentes dans la plante à l'origine. Les résines, substances huileuses collantes qui suintent des plantes, notamment de l'écorce de pin sylvestre (*Pinus sylvestris*), sont souvent liées aux huiles essentielles (oléorésines) et aux gommés comme les polysaccharides [26] [27].

### 1.8.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes, présents dans la plupart des plantes, sont des pigments

polyphénoliques qui contribuent, entre autres, à la coloration des fleurs et des fruits en jaune ou en blanc. Certains flavonoïdes jouent un rôle important dans la formation de nodules chez les espèces à formation symbiotique avec le *Rhizobium* [25].

Des composés des groupes des isoflavonoïdes fonctionnent comme phytoalexines, ces dernières présentes principalement chez les Légumineuses, sont synthétisées pour lutter contre le stress (micro organismes infectieux, froid, rayons UV) [28] [29]. Les flavonoïdes ont un important champ d'action et possèdent de nombreuses vertus médicinales. Antioxydants, ils sont particulièrement actifs dans le maintien d'une bonne circulation du sang. Certains flavonoïdes ont aussi des propriétés anti-inflammatoires et antivirales, ainsi que des effets protecteurs sur le foie. Les isoflavones, présents chez le trèfle rouge (*Trifolium pratense*), ont des effets oestrogéniques. Ils sont efficaces dans le traitement des troubles liés à la ménopause [16] [27].

#### 1.8.4. Tanins

Ce sont des substances amorphes, extraites de plantes, utilisées principalement pour le tannage du cuir. Certains, appelés tanins condensés, sont à base de phénols, d'autres sont des mélanges d'esters, de glucose ou d'autres sucres. Ils sont utilisés comme matière de construction, de réserves ou de protection. Ils se trouvent dans le cytoplasme de la cellule végétale, ou concentrés dans des poches spéciales : les vacuoles à tanin. Ils colorent en brun rouge les organes qui les contiennent. On les utilise comme bactéricides et anti-inflammatoires [30].

#### 1.8.5. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles qui se trouvent principalement dans le suc vacuolaire. Les anthocyanes absorbent fortement dans la région de l'UV B du spectre. Ces composés sont présents dans les feuilles, on pense qu'une fonction potentielle des anthocyanes serait de constituer une protection des tissus foliaires sous jacents contre les dommages provoqués par les radiations ultraviolettes. Comme les pigments floraux, les anthocyanes attirent les insectes pollinisateurs.

La synthèse des anthocyanes est stimulée par la lumière, ainsi que par le stress nutritif (spécialement des carences en Azote et en Phosphore) et par les températures basses [31].

Les anthocyanes sont issus de l'hydrolyse des anthocyanidines (flavonoïdes proches des flavones), qui donnent aux fleurs et aux fruits leurs teintes bleues, rouge ou pourpre. Ces puissants antioxydants nettoient l'organisme des radicaux libres. Ils maintiennent une bonne circulation sanguine, notamment dans les régions du cœur, des mains, des pieds et des yeux [25].

#### 1.8.6. Coumarines

Les coumarines constituent un groupe de lactones largement répandues. Elles sont issues de la formation d'un cycle fermé à partir de l'acide hydroxycinnamique.

Les coumarines sont très répandues chez les dicotylédones, notamment dans les racines et dans les écorces. Elles sont à l'origine d'hétérosides. Les coumarines, de différents types, se trouvent dans de nombreuses espèces végétales et possèdent des propriétés très diverses. Les coumarines du mélilot (*Melilotus officinalis*) et du marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum*) contribuent à fluidifier le sang [32].

#### 1.8.7. Saponines

Ces métabolites secondaires des plantes sont très répandus. Ce sont des composés tensioactifs. Ils forment des solutions colloïdales et font apparaître de la mousse comme les savons. Ce sont des glycosides terpéniques. Les saponines existent sous deux formes, les stéroïdes et les triterpénoïdes. La structure chimique des stéroïdes est similaire à celle de nombreuses hormones humaines (oestrogène, cortisone). Les plantes qui en contiennent ont un effet sur l'activité hormonale [33].

#### 1.8.9. Anthraquinones

Ce sont les principaux constituants de plantes comme le séné (*Cassia*

*senna*) et la rhubarbe de Chine (*Rheum palmatum*). Elles ont un effet irritant et laxatif sur le gros intestin. Elles provoquent la contraction des parois intestinales et stimulent le péristaltisme intestinal. Elles facilitent ainsi le transit intestinal [34].

#### 1.8.10. Glucosides cardiaques

Les glucosides cardiotoniques ont la même structure que les saponosides stéroïdiques mais possèdent également des propriétés de détergents. Les glucosides cardiotoniques sont largement présents dans plus de 200 espèces appartenant à 55 genres et 12 familles [35].

Présents dans de nombreuses plantes médicinales, les digitales laineuses et pourpre (*Digitalis lanata* et *purpurea*), les glucosides cardiaques (la digitoxine, la digoxine et la convallatoxine) ont une action directe et puissante sur le cœur. Ils l'aident à maintenir le rythme cardiaque en cas d'affaiblissement. Ces glucosides sont également diurétiques. Ils contribuent à transférer les liquides des tissus et du système circulatoire vers les conduits urinaires [27].

#### 1.8.11. Glucosides cyanogéniques

Ce sont des dérivés de quatre acides aminés (phénylalanine, tyrosine, valine et l'isoleucine) et l'acide nicotinique. Plus de 60 composés cyanogènes d'origine végétale ont été décrits. Selon certaines observations, la présence des glycosides cyanogéniques dissuade les insectes et les herbivores à s'en nourrir. Ces substances sont à base de cyanure, un poison très violent. Prises à petites doses, elles procurent un effet sédatif et relaxant sur le cœur et les muscles. L'écorce du cerisier sauvage (*Prunus serotina*) et les feuilles du sureau noir (*Sambucus nigra*), qui en contiennent toutes deux, permettent de supprimer ou de calmer les toux sèches et irritantes [36].

#### 1.8.12. Polysaccharides

Ce sont des unités complexes de molécules de sucre liées présentes dans toutes les plantes. Du point de vue de la phytothérapie, les polysaccharides les plus importants sont les mucilages «visqueux». Le mucilage et la gomme absorbent de grandes quantités d'eau, produisant une masse gélatineuse. Celle-ci

peut être utilisée pour calmer et protéger les tissus enflammés, lorsque la peau est sèche et irritée ou lors de l'inflammation des parois de l'intestin [27].

#### 1.8.13. Glucosinolates

Ce sont des composés contenant du soufre et de l'azote. Présents uniquement chez les espèces de la famille des moutardes et des choux. Les glucosinolates provoquent un effet irritant sur la peau, entraînant son inflammation. Ces précurseurs des essences de moutardes constituent une classe d'agents de sapidité qui sont importants sur le plan économique. Ils confèrent le goût âcre aux condiments [24]. Appliqués comme cataplasme sur les articulations douloureuses, ils augmentent le flux sanguin dans la zone irritée, favorisant ainsi l'évacuation des toxines. Lorsqu'on les ingère, les glucosinolates se désagrègent et produisent un goût très prononcé [37].

#### 1.8.14. Substances amères

Les substances amères forment un groupe très diversifié de composants dont le point commun est l'amertume de leur goût. Cette amertume stimule les sécrétions des glandes salivaires et des organes digestifs. Ces sécrétions augmentent l'appétit et améliorent la digestion. Avec une meilleure digestion et l'absorption des éléments nutritifs adaptés, le corps est mieux nourri et entretenu [27] [38].

#### 1.8.15. Alcaloïdes

A la différence des composés terpéniques et des polyphénols, les alcaloïdes forment une grande famille de molécules chimiquement hétérogène. Leurs caractéristiques communes sont leur solubilité dans l'eau, la présence d'au moins un atome d'azote et leur forte activité biologique. Globalement, on a recensé quelques 20.000 alcaloïdes dans à peu près 20% des plantes à fleur, essentiellement des dicotylédones herbacées [39]. Les alcaloïdes provoquent, chez les animaux, diverses réponses physiologiques et psychologiques parce qu'ils interfèrent avec les neurotransmetteurs. A forte dose, la plupart des

alcaloïdes sont toxiques, par contre, à faible dose, ils peuvent avoir une valeur thérapeutique. De la préhistoire jusqu'à nos jours, les alcaloïdes ont été utilisés comme médicaments, relaxants musculaires, analgésiques, tranquillisants et psychotropes [24]. Des recherches ont récemment abouti à la mise en œuvre de systèmes de cultures cellulaires qui permettent de les produire en quantités plus importantes et à des coûts raisonnables. Certains sont des médicaments connus et présentent des vertus thérapeutiques avérées. C'est le cas d'un dérivé de la pervenche de Madagascar (*Vinca rosea* syn. *Catharanthus roseus*) utilisé pour traiter certains types de cancer [40].

#### 1.8.16. Vitamines et minéraux

De nombreuses plantes médicinales sont particulièrement riches en vitamines et en minéraux. Le citronnier notamment (*Citrus limon*) renferme des teneurs élevées en vitamine C. La carotte (*Daucus carotta*) est riche en  $\beta$ -carotène (provitamine A) [25].

Les plantes, notamment celles issues de l'agriculture biologique, tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure aisément assimilable. Les minéraux contenus dans une plante, participent activement à l'effet thérapeutique dans l'organisme [34].

### 1.9. Etude botanique du séné

#### 1.9.1. Généralités

Le séné est probablement la plante médicinale la mieux connue depuis l'antiquité. Il est considéré comme un puissant laxatif. Les médecins arabes furent les premiers à l'utiliser. Il entre dans la composition de nombreux médicaments. Les parties utilisées sont les feuilles et les fruits [41].

Le séné est actuellement indiqué pour obtenir des selles molles en cas de fissure anale ou après des interventions chirurgicales abdominales ou anales. Il est également utilisé pour purger et vider l'intestin. La plante du séné pousse sur le continent africain et asiatique [42].

#### 1.9.2. Systématique et description botanique du séné

On compte plus de 600 espèces dans le genre *Cassia*. Il existe sous deux formes : arbuste ou arborescente. On les classe dans la famille des *Caesalpinaceae*, *Mimosaceae* et les *Fabaceae*, regroupées dans la superfamille des légumineuses [43].

#### 1.9.2.1. Systématique

La classification botanique du séné est la suivante :

Règne	: végétal
Embranchement	: spermaphytes
Sous-embranchement	: Angiospermes
Classe	: Dicotylédones
Superfamille	: légumineuses
Famille	: Césalpiniacées
Genre	: <i>Cassia</i>
Espèce	: <i>Cassia acutifolia</i>
Nom commun	: Séné

Selon Pousset. (2004) [44], les espèces les plus connues dans le commerce sont :

- *Cassia angustifolia* Vahl (séné de timnevelly)
- *Cassia acutifolia* Delile (séné d'Alexandrie ou séné de Khartoum)
- *Cassia fistula*
- *Cassia obtusifolia*
- *Cassia tora*
- *Cassia obovata* (*Cassia italica* ou *Cassia* du Soudan ou du Sénégal)
- *Cassia podocarpa* Guill
- *Cassia alata*
- *Cassia occidentalis*
- *Cassia seiberiana*
- *Cassia articulata*

#### 1.9.2.2. Description botanique

Les tiges du séné sont ligneuses à la base. Elles se ramifient vers les extrémités. Les feuilles sont composées et paripennées. Elles portent des folioles

de couleur verte jaunâtre. Elles sont lancéolées, étroites et asymétriques à la base. Elles ont une longueur de 5 à 6 cm et 2 cm de largeur.

Les fleurs sont groupées en grappes dressées. Elles présentent un calice quinconce, des pétales jaunes veinés de brun en préfloraison, imbriquée et ascendante. Les étamines libres sont au nombre de 10 dont 3 stériles [44].

Les fruits sont des gousses membraneuses de couleur brun clair, plates de 3 à 5cm de longueur. Elles sont déhiscentes. Les gousses contiennent entre 6 à 8 graines [43].

#### 1.9.2.2.1. Description botanique de *Cassia acutifolia*

Noms vernaculaires

Arabe : Snan Elmaquie

Tamahaq : Tagergart

Français : Séné

C'est une plante ramifiée (fig.1.1). Les feuilles non munies de stipules basales. Elles sont composées de folioles lancéolées, étroites, trois à quatre fois plus longues que large (2 à 4 cm de longueur), d'où le nom du *Cassia lancéolata*. Leur coloration est vert jaunâtre à vert grisâtre [45].

Les fleurs sont abondantes en grappes, d'un jaune pâle (fig 1.2).

Les fruits, sous forme de gousses aplaties sont légèrement arqués sans crête médiane (fig 1.3) [46].



Figure 1.1 : Plante de *Cassia acutifolia* (aspect général)  
[46]



Figure 1. 2 : Fleurs de *Cassia acutifolia*  
[46]



Figure 1.3 : Gousses de *Cassia acutifolia* [46]

#### 1.9.2.2.2. Description botanique de *Cassia obovata*

Noms vernaculaires

Arabe : Snan Elmaquie

Tamahaq : Agergart

Français : Séné

C'est une plante très ramifiée (fig. 1.4). Les feuilles sont munies à leur base de deux stipules. Elles sont composées de folioles obovales. Elles sont deux fois plus longues que large et de couleur vert luisant [46]. (fig 1.5)

Les fleurs sont abondantes en grappes, leur couleur est jaune pâle (fig 1.6). Les fruits, sous forme de gousses aplaties et arquées sont munis d'une crête dentelée centrale. Elles sont de couleur verte à l'état jeune (fig 1.7) et brun noir à maturité.

*Cassia acutifolia* et *Cassia obovata* poussent spontanément dans les oueds du Sahara méridional, Tindouf, Hoggar, Tassili, Illizi et Tamanrasset) [46].

*Cassia acutifolia* et *Cassia obovata*, se rencontrent sur différents types de sols. Elles colonisent les oueds et les milieux rocheux comme les hamadas et les dunes des milieux ensablés [47].



Figure 1.4 : Plante de *Cassia obovata* (aspect général)

[46]



Figure 1.5 : Feuilles de *Cassia obovata*

[46]



Figure 1.6 : Fleurs de *Cassia obovata*  
[46]



Figure 1.7 : Gousses de *Cassia obovata*  
[46]

### 1.9.3. Récolte et conservation du séné

Le séné cultivé en Inde et au Soudan est récolté au mois d'août et septembre. Il subit un séchage à température qui se situe entre 25 et 40°C. Après le séchage, les gousses sont séparées des feuilles et sont conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité. Une partie de cette récolte est destinée à la consommation locale et l'autre est exportée. Le séné est expédié en Europe et dans le monde en balles de 180Kg nommées fardes [48]. Le séné est très utilisé dans le monde entier. La production mondiale en 1986 est estimée à plus de 5000 tonnes [42].

En Algérie, le séné consommé est local (population des régions sahariennes) comme il peut provenir de l'Égypte (*Cassia senna* ou *Cassia acutifolia*), de l'Inde ou du Pakistan (*Cassia angustifolia*) [27].

### 1.9.4. Composition chimique du séné

Les feuilles et les gousses du séné contiennent beaucoup de composés chimiques issus du métabolisme secondaire. Les composés majoritaires sont constitués essentiellement des dérivés anthracéniques [49]. Ces derniers existent sous deux catégories :

- la première, la plus active pharmacologiquement est constituée des dérivés anthracéniques combinés en hétérosides appelés sennosides.
- La deuxième, inactive pharmacologiquement est constituée de dérivés anthracéniques libres.

En outre, le séné renferme 10 à 12 % de matière minérale, des flavonoïdes, du polyol (le pennisitol), des polysaccharides, des dérivés naphthaléniques issus de la cyclisation d'un poly-  $\beta$ -cétoester, du mucilage, de l'huile essentielle et des polyphénols résines [48].

#### 1.9.4.1. Structure chimique des dérivés anthracéniques libres

Les différentes structures de ce groupe sont caractérisées par la présence de composés phénoliques et des dérivés de l'anthracène (fig 1.8) à différents degrés d'oxydation (anthrones, anthranols, anthraquinones) [27]. (fig1.9)

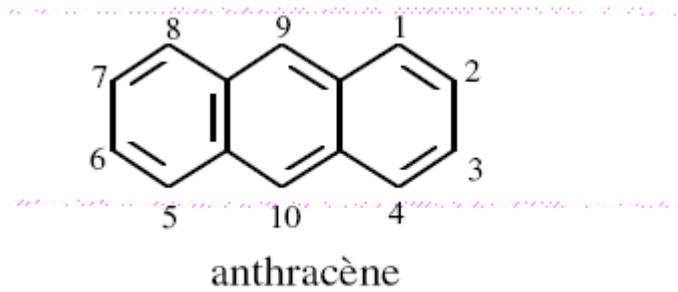


Figure 1.8 : Structure chimique de l'anthracène.

Chez les anthrones le carbone C-10 est un carbone méthylique. Selon le pH, ces anthrones peuvent être accompagnés de leurs formes oxydées, les anthraquinones. Au cours de la dessiccation des feuilles et des fruits, deux processus de transformation entrent en jeu : l'oxydation, qui conduit à des hétérosides anthraquinoniques et la dimérisation, qui engendre des hétérosides de dianthrones [27].

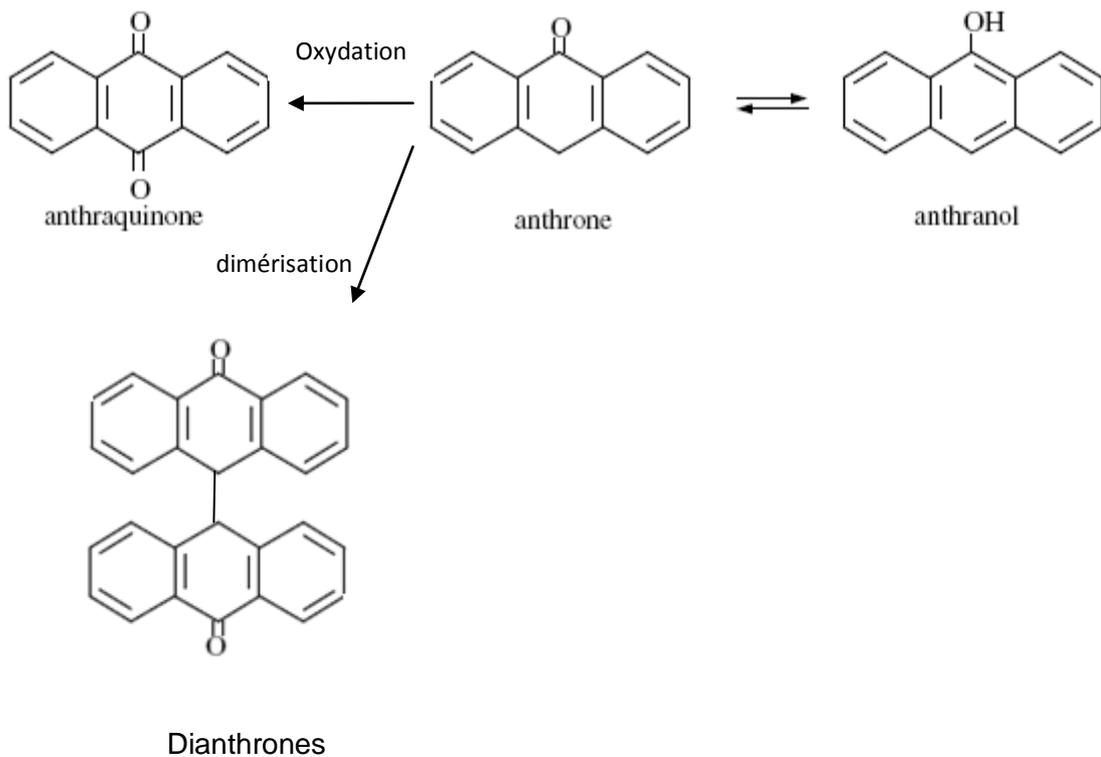


Figure 1.9 : Interconversion des dérivés anthracéniques.

Selon que les anthrones constitutives du dimère ainsi formé sont identiques ou différentes, on parle d'homodianthrones et d'hétérodianthrones. Cette dimérisation est une réaction enzymatique qui ne s'observe que chez le séné quand le séchage est effectué à la température modérée (40°C). Généralement, on désigne souvent anthrones et anthranols par le terme de (formes réduites) et les anthraquinones par celui de (formes oxydée).

Du fait de l'instabilité des anthrones, les formes libres qui peuvent occasionnellement exister dans les feuilles sèches et les fruits du séné sont toujours des anthraquinones. Les formes réduites, quand à elles, n'existent que combinées c'est-à-dire sous forme d'hétérosides : anthracénosides ou sennosides [50].

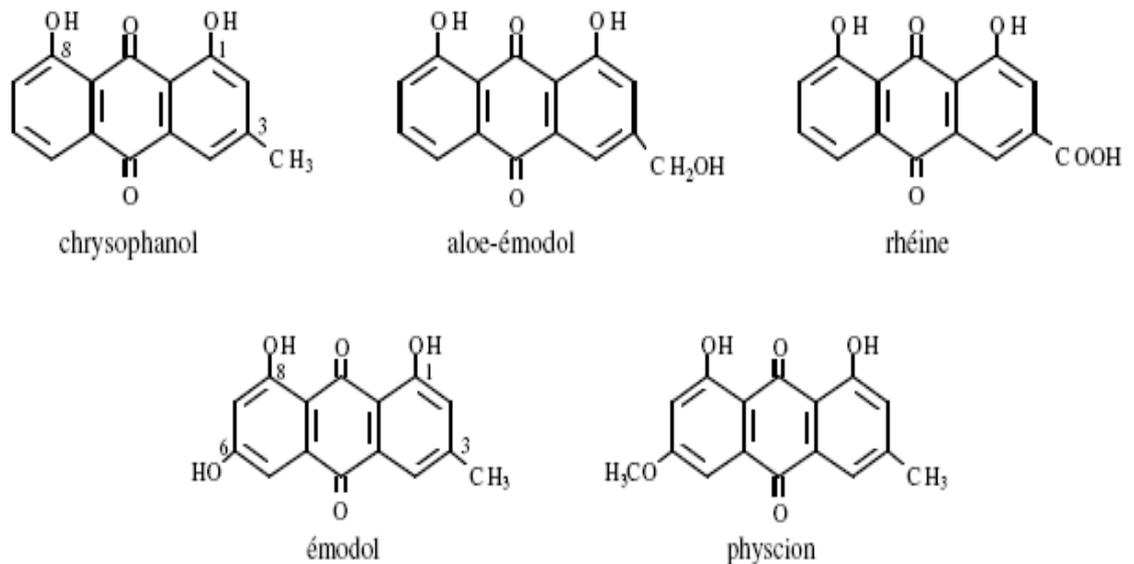


Figure 1.10 : Structure chimique des dérivés hydroxyanthracéniques [27]

#### 1.9.4.2. Structure chimique des dérivés anthracéniques combinés en hétérosides ou sennosides.

Les hétérosides sont composés de deux parties :

- Celle qui renferme un sucre, le glucose. Elle exerce un effet favorable sur la solubilité des glucosides ainsi que leur absorption et son transport vers un organe.
- L'effet thérapeutique est déterminé par la seconde partie, la plus active, nommée aglycone ou génine. La liaison du glucose avec la génine engage normalement

l'hydrolyse phénolique en C<sub>8</sub>. Plus de 80% des principes actifs du séné sont représentés par des sennosides A, B, C, D et la rhéine-8-glucose [51].

#### 1.9.4.2.1. Les sennosides A et B

Les sennosides A et B sont majoritaires. Ce sont des diglucosides d'une génine homodianthronique symétrique [52]. (fig 1.11)

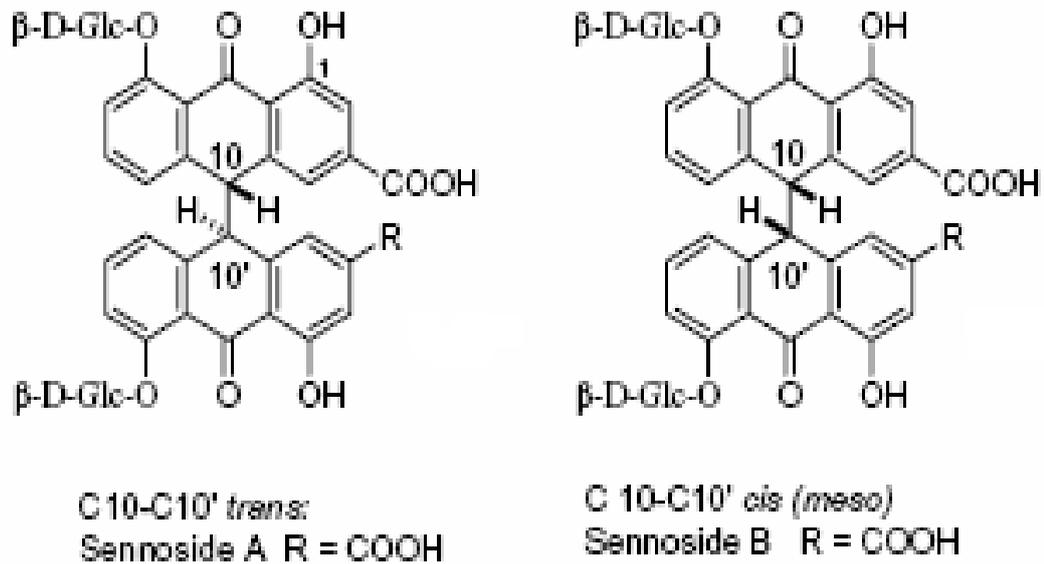


Figure 1.11 : Structure chimique des sennosides A et B [53]

#### 1.9.4.2.2. Les sennosides C et D

Les sennosides C et D sont des composés à structure chimique analogue mais présents en faible quantité. Ce sont des diglucosides d'une génine hétérodianthronique dissymétrique (rhéine-anthrone + aloé-émодол anthrone).

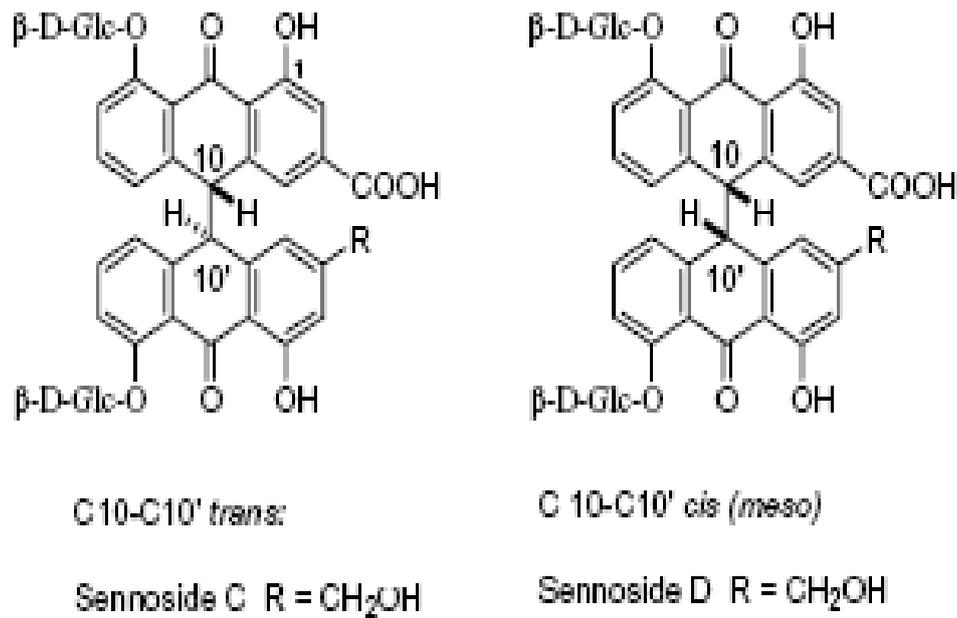


Figure 1.12 : Structure chimique des sennosides C et D [54]

#### 1.9.4.2.3. La Rhéine-8-glucose

C'est un glucoside de naphthalène. Selon sa structure, il porte le nom de 6-hydroxymuzinine glucoside chez *Cassia acutifolia* et de glucoside tinnevelline chez *Cassia angustifolia* [48]. (fig 1.13)

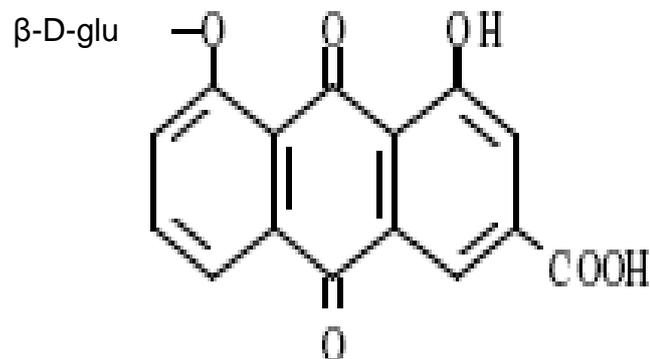


Figure 1.13 : Structure chimique de la Rhéine-8-glucose.

#### 1.9.5. Propriétés chimiques des sennosides

Selon Budavari. (1996), les sennosides présentent des poids moléculaires élevés :

- Sennoside A :  $C_{42} H_{38} O_{20}$  ; Mm= 862
- Sennoside B :  $C_{42} H_{38} O_{20}$  ; Mm= 862
- Sennoside C :  $C_{42} H_{40} O_{19}$  ; Mm= 848
- Sennoside D :  $C_{42} H_{40} O_{19}$  ; Mm= 848

Du point de vue réactionnel, les variations structurales observées pour ces molécules sont limitées. En dehors des deux hydrolyses phénoliques toujours présentes en C<sub>1</sub> et C<sub>8</sub>, seuls les carbones C<sub>3</sub> et C<sub>6</sub> peuvent être substitués par les groupements (méthyle, hydroxyméthyle, carbonyle) [48].

#### 1.9.6. Propriétés physiques des sennosides

Les hétérosides anthracéniques combinés sont souvent bien cristallisés de coloration nettement plus pâle que les génines correspondantes. Ils sont solubles dans l'eau chaude et dans les solutions hydroalcooliques mais sont insolubles dans les solvants organiques non polaires [45].

#### 1.9.7. Biosynthèse des sennosides

La biosynthèse des dérivés de l'anthracène a lieu dans les racines. Dans ces dernières se forme le chrysophanol qui est la première anthraquinone, ensuite l'aleo-émodol et l'émodol et finalement la rhéine [48].

La voie de la biosynthèse de molécule précurseur est la voie de Shikimate qui se déroule totalement dans le chloroplaste [33].

La formation des anthraquinols résulte de la cyclisation d'un poly-β-cétoester. Elle implique l'oxydation consécutive du groupe 3-méthyl de l'anthranol (chrysophanol) en présence d'une glucosylation légère. Les glucosides formés sont transloqués aux feuilles et aux fleurs [48].

#### 1.9.8. Localisation des sennosides dans la plante

Il y a des différences notables de composition entre les plantes fraîches et les plantes sèches. Dans le végétal frais les composés anthracéniques libres sont majoritaires. Dans le végétal séché, on y trouve les dérivés anthracéniques combinés [1].

Dans les racines jeunes, on trouve des dérivés anthroniques de type chrysophanol. Dans les racines âgées on trouve souvent les dérivés de type anthraquinone. Dans les graines, les composés actifs sont localisés dans le péricarpe et sont semblables à ceux formés dans les feuilles [27].

Les graines contiennent très peu de sennosides par comparaison aux feuilles mais il a été constaté que les cotylédons de plants de trois jours peuvent contenir des teneurs équivalentes à celles des feuilles. La teneur des sennosides dans les graines varie approximativement de 1.2 à 2.5% chez *Cassia angustifolia* et approximativement de 2.5 à 4.5% chez *Cassia acutifolia*. Dans les feuilles la teneur en sennosides varie de 2.5 à 8% pour les deux espèces [48].

#### 1.9.9. Propriétés organoleptiques du séné

La couleur des préparations du séné est jaune faible. L'odeur est caractéristique et le goût est légèrement amer. Le goût amer fait que le séné est toujours consommé en association avec d'autres plantes aromatiques [55].

#### 1.9.10. Propriétés pharmacologiques du séné

Le séné, par ses vertus thérapeutiques et plus spécialement par son action contre la constipation, possède deux principales propriétés pharmacothérapeutiques : laxative et purgative. Les propriétés laxatives et purgatives du séné semblent avoir été découvertes par les arabes au IX<sup>e</sup> siècle et connues en Europe par leur intermédiaire.

Selon Leng – Peschlow. [56] les dérivés actifs des sennosides exercent leur action selon deux mécanismes :

- Ils stimulent la motilité du gros intestin en augmentant les mouvements péristaltiques et donnent une accélération du transit dans le côlon.
- Ils Inhibent la résorption de l'eau, du sodium et du chlore et augmentent la sécrétion du potassium au niveau de la muqueuse intestinale.

Le séné est administré sous forme d'infusé (5 à 20g/l) ou de poudre (0.5-5 g/24 heures). Il rentre dans de nombreuses tisanes et préparations spécialisées [57].

### 1.9.11. Effets indésirables et contre-indications du séné

L'action laxative ou purgative du séné dépend de la quantité utilisée. Des quantités excessives peuvent entraîner des coliques intestinales, des vomissements, une diarrhée occasionnelle, des crampes abdominales ou des flatulences [17].

Ces effets sont rares en cas d'utilisation conforme à la dose recommandée. Cette utilisation doit être de court terme (pas plus d'une journée) [58].

Comme pour les autres laxatifs stimulants, la drogue du séné est contre-indiquée dans les cas de maladies intestinales inflammatoires telle que la colite ulcéreuse, l'occlusion intestinale, le déficit en potassium ou la constipation chronique.

Certains auteurs rapportent une observation d'allergie professionnelle au séné. Une patiente âgée de 28 ans a développé un asthme et une rhinite à la suite d'une exposition au séné dans un laboratoire de phytopharmacie [59].

## CHAPITRE 2

### EXPERIMENTATION ET METHODES D'ANALYSES

#### 2.1. Matériel

##### 2.1.2. Matériel végétal

###### 2.1.2.1 Récolte

Les deux plantes *Cassia acutifolia* et *Cassia abovata* ont été récoltées dans la région d'Oued-Helledjen (Wilaya de Tamanrasset Algérie). Les deux espèces ont été authentifiées par le personnel de la station INRF de Tamanrasset. Un séchage naturel des feuilles a été effectué directement après la récolte, afin de garder intactes les composés actifs de ces deux plantes. Ce séchage a été fait à l'ombre dans un endroit aéré. La durée de séchage est de 20 jours. L'étude phytochimique entreprise a pour objectifs :

- l'identification des molécules actives (sennosides et huiles essentielles) et la détermination de leur effet antimicrobien.
- la quantification des flavonoïdes et l'identification de la fraction minérale.

Nos expérimentations ont été effectuées au niveau :

Du laboratoire de contrôle de qualité de la police scientifique d'Alger.

Du laboratoire des gisements du CRD de Sonatrach de Boumerdes.

#### 2.2 Méthodes

##### 2.2.1. Mise en évidence des sennosides par chromatographie sur couche mince

###### 2.2.1.1. Mode opératoire

###### 2.2.1.1.1. Préparation de la solution à analyser

Afin de mettre en évidence la présence des sennosides par la CCM, 0,1 g de poudre de feuilles séchées du séné sont dissoutes dans 5 ml d'éthanol à 50%. Après agitation et chauffage jusqu'à ébullition, le mélange est refroidi et centrifuger pendant 5 mn à (5000 tr/mn). Le surnageant est utilisé pour réaliser les analyses. Le principe de la chromatographie sur couche mince repose sur la migration de

solutés (solutions d'analytes) à travers la couche mince (phase stationnaire) dans un solvant ou un mélange de solvants appropriés (phase mobile).

#### 2.2.1.1.2. Préparation des phases mobiles et stationnaires

Les phases mobiles sont préparées à partir du mélange suivant :

- Acide acétique glacial : 1 V
  - Acétate d'éthyle : 40 V
  - Propanol : 40 V
  - Eau distillée : 30 V
- 200 ml de ce mélange sont placés dans une cuve à chromatographie sur couche mince,
  - Le niveau du liquide dans la cuve est ajusté à 0,5 cm,
  - la cuve est fermée et laissée se saturer de vapeur pendant 2 heures,
  - Le dépôt de la solution à analyser s'effectue à l'aide d'une micropipette,
  - 10µl sont prélevés et déposés à un point, à 2 cm de l'extrémité inférieure de la plaque sur la ligne de dépôt [60].

La phase stationnaire est une plaque en verre de 20 x 20 cm recouverte d'une couche d'environ 0.3 mm de gel de silice qui représente l'agent adsorbant.

#### 2.2.1.1.3. Développement des chromatogrammes

Le développement du chromatogramme consiste à faire migrer le solvant sur la plaque par capillarité. La plaque est placée dans la cuve en position verticale, dans un récipient fermé. Lorsque le front du solvant s'est trouvé à environ 4 cm de l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve et le front d'élution est déterminé immédiatement à l'aide d'un crayon [60].

#### 2.2.1.1.4. Révélation et calcul du rapport frontal (Rf)

L'identification des constituants se réalise après séchage de la plaque à l'air, suivie d'une pulvérisation par une solution d'acide nitrique à 20% et d'un chauffage à 120°C pendant 10 mn. Une deuxième pulvérisation par une solution

d'hydroxyde de potassium (50 g/l dissoute dans l'éthanol à 50%) a été effectuée, suivie par un séchage jusqu'à l'apparition des taches [61].

Le calcul du Rf (rapport frontal) se fait par l'équation suivante :

$R_f = d_i / D$  avec :

- $d_i$  : la distance parcourue par le composé.
- $D$  : la distance parcourue par le solvant.

Les Rf sont comparés avec les Rf observé par KAREL [62], qui correspondent aux différents sennosides.

Les spots du chromatogramme obtenus avec la solution à examiner sont identifiés selon les spots du chromatogramme obtenus par la pharmacopée européenne.

### 2.2.2. Séparation des sennosides par chromatographie sur colonne

Une colonne capillaire miniaturisée munie d'un robinet est utilisée. Cette dernière a été remplie de gel de silice pour colonne jusqu'à une hauteur équivalente à quinze fois son diamètre ( $\Phi = H/15$ ).

Un papier filtre sous forme d'un cercle est déposé sur le gel de silice pour éviter la dispersion de ce dernier. L'acétate d'éthyle, solvant le moins polaire de la phase mobile, a été versé dans la colonne.

Après avoir laissé décanter la phase stationnaire, 1ml de l'échantillon à séparer a été déposé à l'aide d'une seringue. Nous avons élué la phase mobile placée au-dessus de la colonne dans une ampoule à décanter.

Après deux heures, les différentes fractions moléculaires ont été séparées et récupérées dans des béchers. Les fractions séparées ont été soumises à l'évaporation à l'air libre (élimination de la phase mobile) et analysées par spectrophotométrie en utilisant le méthanol comme solvant.

### 2.2.3. Analyse qualitative des sennosides par HPLC

L'application de l'HPLC est une nécessité afin de caractériser les molécules actives présentes chez les deux espèces de plantes. L'HPLC a été réalisé selon les conditions opératoires suivantes :

- Colonne : C18
  - Débit : 0,8 ml/mn
  - Longueur d'onde : 270nm
  - Phase mobile : tampon acétate de sodium (pH= 6) + acétonitrile (70V/30V)
- La phase mobile est formée de 8.2 g d'acétate de sodium dissout dans 800 ml d'eau bidistillée.
- Le pH est ajusté à 6 à l'aide de l'acide acétique. Une quantité de 700 ml de ce tampon ont été ajoutés à 300 ml d'acétonitrile pour HPLC.

La phase mobile est filtrée et dégazifiée à l'ultrason (Sun et Su, 2002). 55

Le témoin utilisé est un comprimé Sénokot<sup>®</sup> fabriqué par VIATRIS spa à partir de la poudre cryobroyée du séné. Ce comprimé renferme 152 mg de poudre de séné contenant 7.3 mg des hétérosides anthracéniques exprimés en sennosides B (4.8 % des sennosides) [60].

#### 2.2.4. Dosage des sennosides par spectrophotométrie UV-vis

Le dosage des sennosides a été effectué aux longueurs d'ondes (356nm, 536nm, 608nm, 668nm et 750nm). Ces dernières correspondent respectivement aux absorbances des sennosides B, A, D, la Rhéine-8-glucose et le sennoside C. [63].

#### 2.2.5. Extraction des flavonoïdes

Nous avons suivi la méthode inspirée par Guignard [64], dont les étapes sont les suivantes : (Fig 2.1).

##### 2.2.5.1. Macération et évaporation

30 g de poudre des feuilles séchées ont été versée dans un Erlen Mayer contenant 100 ml de méthanol. Le mélange est laissé à macérer pendant 72 heures. Un rota-vapeur a été utilisé pour évaporer le méthanol à 60°C sous vide. Le résidu obtenu est traité par 50 ml d'eau tiède jusqu'à l'obtention d'un extrait aqueux.

### 2.2.5.2. Elimination des pigments et des lipides

L'extrait aqueux est versé dans une ampoule à décanter contenant 30 ml de chloroforme (densité=1,476 à 1,481). Le mélange est laissé à décanter jusqu'à la formation de deux phases distinctes.

La phase organique (supérieure) est éliminée. L'opération est refaite à plusieurs reprises jusqu'à l'élimination totale de la fraction lipidique et chlorophyllienne. Enfin, la phase aqueuse est récupérée.

### 2.2.5.3. Elimination des génines libres

La phase aqueuse est mélangée avec 30 ml d'éther diéthylique. Après décantation, deux phases distinctes se forment. La phase aqueuse est récupérée et le solvant contenant les génines est éliminé. Cette opération est refaite plusieurs fois jusqu'à élimination totale des génines.

### 2.2.5.4. Elimination des monosides et récupération des flavonoïdes

Dans une ampoule contenant l'extrait aqueux obtenu, un volume de 30 ml d'acétate d'éthyle (densité= 0,898 à 0,901) ont été versés. Après décantation, le solvant est éliminé. Nous avons ajouté 30ml de butanol à l'extrait aqueux restant. La phase alcoolique qui contient les flavonoïdes a été récupérée et évaporée à 55°C. Le poids du résidu sec des flavonoïdes a été déterminé selon la formule suivante :

$$M_f = P_2 - P_1 \quad \text{où :}$$

$M_f$  : masse de l'extrait sec des flavonoïdes.

$P_2$  : poids du ballon avec l'extrait sec des flavonoïdes.

$P_1$  : poids du ballon vide

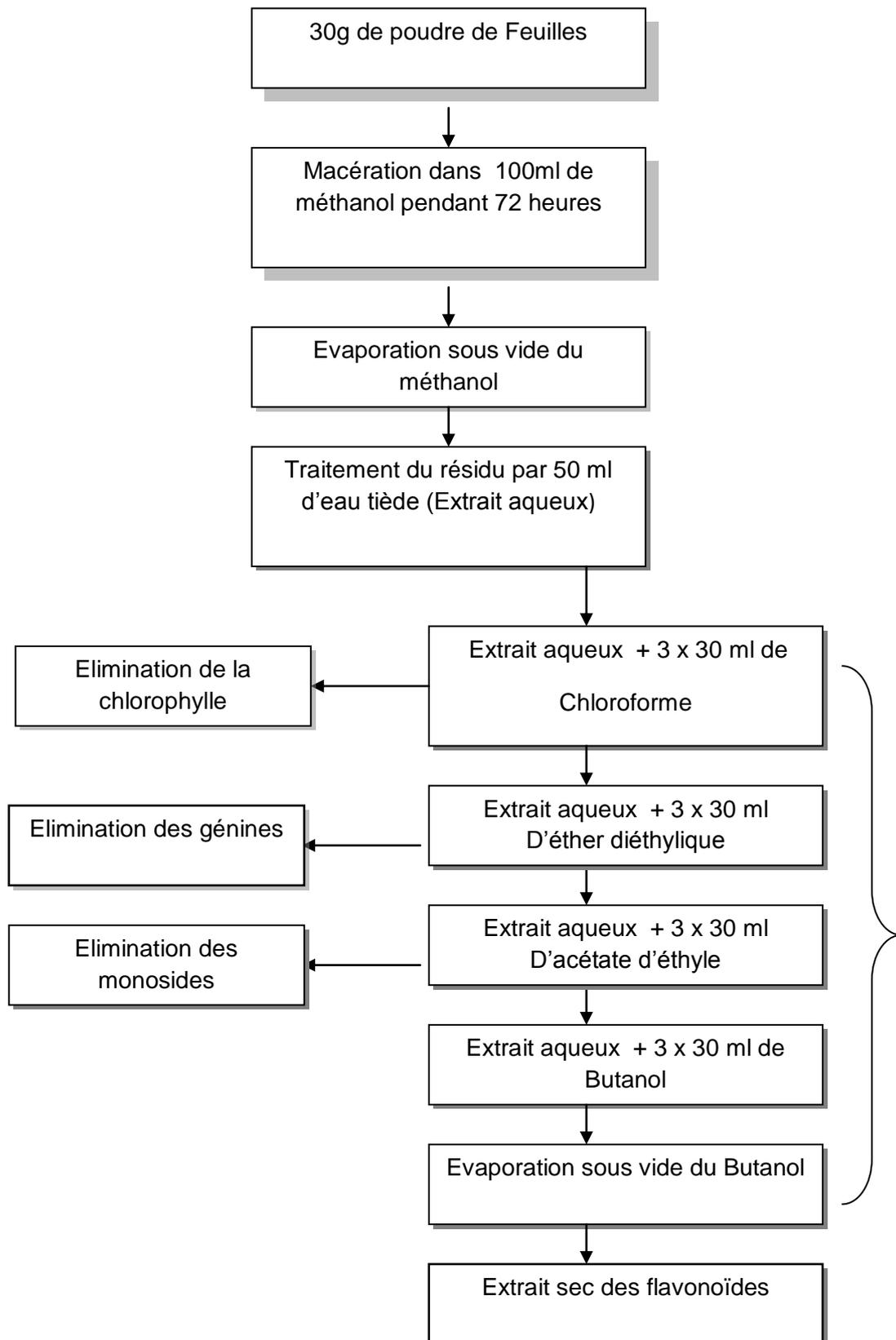


Figure 2.1 : Schéma des différentes étapes d'extraction des flavonoïdes

### 2.2.6. Dosage des éléments minéraux

Le dosage des éléments minéraux nécessite, la destruction préalable de la matière organique (la minéralisation). La minéralisation par voie humide est maintenant le procédé le plus utilisé. Elle consiste à détruire la matière végétale par un mélange d'oxydants acides afin d'obtenir une solution de sels. L'opération peut être menée à température de 100°C avec des pertes négligeables. Les mélanges d'oxydants acides les plus couramment utilisés sont :

- Le mélange sulfonitrique (30ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 100ml de HNO<sub>3</sub> à 36°B) ;
- Le mélange nito-perchlorique (40ml de ClO<sub>4</sub>H pur + 100ml de NO<sub>3</sub>H à 36°B), d'emploi plus rapide (10 à 20 mn) avec évaporation facile de l'excès d'ions ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> [65].

#### 2.2.6.1. Mode opératoire

Dans un creuset en platine dont le poids a été préalablement déterminé, 10 ml de mélange sulfonique contenant 10 g de poudre végétale ont été placés. Ce creuset est placé dans une étuve à 100°C pendant 24 heures. Après refroidissement, le pourcentage des minéraux a été déterminé. A ces minéraux, 4ml d'eau distillée sont ajoutées. Le mélange est chauffé jusqu'à évaporation. Après filtration, la solution est ajustée à 100 ml par l'eau distillée tiède. Les analyses des sels ont été réalisées par spectrométrie d'absorption atomique (SAA).

Une partie des minéraux a été analysée par la chromatographie ionique selon les conditions opératoires suivantes :

- Eluant : NaOH 30Mm pour les cations et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 11Mm pour les anions,
- Débit : 1,5 ml/mn pour les cations et 1ml/mn pour les anions,
- Température : 30°C pour les cations et 25 à 28°C pour les anions,
- Colonne : Ion Pac ASM-HC 4x 250mm pour les cations  
Ion Pac CS12A 4x 250mm pour les anions
- Détecteur : CD25
- Suppresseur : ASRS ultra II 4mn pour les cations et  
CSRS ultra II 4Mn pour les anions

## 2.2.7. Extraction et identification des huiles essentielles (HE) du séné

### 2.2.7.1. Extraction des huiles essentielles (HE)

L'extraction a été réalisée par la méthode d'entraînement à la vapeur. Cette dernière se base sur le passage de la vapeur d'eau à travers l'échantillon végétal, provoquant l'entraînement de la matière organique volatile, entre autres les huiles essentielles. Le dispositif utilisé pour l'extraction par entraînement à la vapeur comprend principalement :

- Un ballon de 5 l rempli au 2/3 d'eau
- Un ballon de 2 l contenant la matière végétale
- Un réfrigérant alimenté par un système de refroidissement
- Une ampoule à décanter pour récupérer l'hydrolat (eau + huile essentielle)

Les huiles essentielles récoltées se trouvent dispersées dans l'eau d'extraction. Afin d'éliminer les traces de l'eau, une deuxième extraction a été menée par l'utilisation d'un solvant « éther diéthylique », sélectionné pour son affinité vis-à-vis des huiles essentielles.

Les HE récupérées sont placées dans un rota-vapeur à une température de 40°C pour éliminer l'éther diéthylique.

### 2.2.7.2. Rendement en huiles essentielles

Le rendement de l'huile essentielle est défini comme étant le rapport entre la masse d'huile essentielle obtenue et la masse de la matière végétale utilisée.

Le rendement en huile essentielle est calculé par la formule ci-dessous :

$$R_{HE} = (Mh / Mmv). 100$$

- $R_{HE}$  : rendement en huile essentielle
- $Mh$  : masse d'huile essentielle en grammes
- $Mmv$  : masse de la matière végétale utilisée en grammes

### 2.1.7.3. Identification des huiles essentielles par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM)

Afin de déterminer la composition qualitative des constituants des HE, une analyse par CG-SM a été réalisée au niveau du laboratoire analytique du centre de recherche et de développement (CRD) de Boumerdès, selon les conditions opératoires suivantes :

- Une aliquote de 10µl est injectée dans une colonne capillaire HP-5MS (longueur : 30m, di : 0.25mm, épaisseur du film 0.25 µm) élué par l'hélium à 0.3 ml/ min avec un rapport Split de 10. La température d'injection est de 250 °C.
- La température de la colonne est programmée en isotherme à 60 °C pendant 8 min. elle sera augmentée progressivement jusqu'à 250°C.
- L'analyse est effectuée sous ionisation à 70 eV (température du filament : 150 °C, courant : 600 mA, potentiel PM : 600V).

L'identification est faite par comparaison des spectres de masse avec la banque de données fournie par le logiciel Chemstation (NIST 2002 et Wiley version 7.0).

### 2.2.8. Evaluation de l'activité antimicrobienne des l'huiles essentielles et de l'extrait alcoolique de *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata*

Le principe consiste à estimer l'inhibition de la croissance des microorganismes mis en contact avec les HE et de l'extrait alcoolique par la méthode des disques (aromatogramme).

Des disques absorbants stériles de 9 mm, imprégnés d'extrait éthanolique et de l'huile essentielle, sont déposés sur une gélose inoculée de souches. La diffusion de cette dernière dans la gélose permet d'inhiber la croissance des germes tout au tour du disque (zone d'inhibition). L'estimation de l'activité se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de chacune des souches [60]. Plusieurs souches de microorganismes ont été utilisées (Tableau 2.1).

Tableau 2.1 : Souches utilisées pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.

<b>Souches microbiennes</b>	<b>Références</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 6558
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Klebseila pneumonie</i>	ATCC 1803
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Pseudomonas sp</i>	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Serracia marcesens</i>	-
<i>Agrobactérium tumefaciens</i>	ATCC 23308
<i>Agrobactérium tumefaciens</i>	ATCC 4452
<i>Agrobactérium tumefaciens</i>	BCFP 2517
<i>Agrobactérium tumefaciens</i>	BCFP 4771
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

- : souches non référencées

#### 2.2.8.1. Activité antimicrobienne des huiles essentielles

Une quantité de 0,2ml d'HE, dont on veut estimer l'activité antimicrobienne, a été diluée dans 2ml de myristate d'isopropyl (solvant apolaire inerte). Le mélange a été conservé à 4°C dans des flacons en verre opaque, hermétiquement fermés.

#### 2.2.8.2. Activité antimicrobienne de l'extrait alcoolique

Afin de préparer une solution éthanolique à 0,5 et 1%, une quantité de 1 et 2g de poudre de plante ont macéré dans 20 ml d'éthanol à 96% pendant 72 heures. L'extrait filtré est dilué dans l'éthanol à 40%.

### 2.2.8.3. Mode opératoire

#### 2.2.8.3.1. Préparation des milieux de culture

Les milieux de culture (gélose nutritive et gélose Sabouraud) sont fondus dans un bain-marie à 95 °C et placés dans des boîtes de Pétri de 90mm sous des conditions aseptiques. La solidification des milieux de culture sont réalisée à la température ambiante.

#### 2.2.8.3.2. Préparation de l'inoculum et ensemencement

La préparation de l'inoculum se fait à partir d'une jeune culture de 18 heures pour les bactéries et 48 heures pour les levures. Des suspensions troubles sont réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien distinctes. Ces dernières ont été introduites dans 5ml d'eau physiologique stérile. L'homogénéisation de la suspension microbienne se fait par agitation au vortex. Les milieux de cultures sont ensemencés par les microorganismes utilisés.

#### 2.2.8.3.3. Dépôt des disques

Des disques stériles imbibés d'huile essentielle et de l'extrait éthanolique sont déposés à la surface du milieu de culture préalablement ensemencé dans des boîtes de Pétri. Après 30 minutes, les boîtes de Pétri sont incubées dans des étuves à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25 °C pendant 48 heures pour les levures. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de chacune des souches. Selon Leclerc. [66], une souche est dite :

- sensible lorsque la zone d'inhibition est supérieure ou égale à 15mm
- limite lorsque la zone d'inhibition est inférieure à 15mm
- résistante lorsque la zone d'inhibition est inexistante

### 2.2.9. Effet de la composante hormonale et du stress salin et thermique sur la biosynthèse des molécules actives *in vitro* chez *Cassia obovata*

La deuxième partie de notre travail porte dans un premier temps sur la micropropagation et la collogénèse de *C. obovata*, et dans un deuxième temps sur l'étude de l'impact de la composante hormonale et du stress salin et thermique sur la biosynthèse *in vitro* des molécules actives.

L'expérimentation de la culture *in vitro* a été réalisée au laboratoire de la culture *in vitro* de l'ENARP (BAB Ezzouar, Alger).

Le dosage des molécules actives a été réalisé au niveau des laboratoires de recherche des Biotechnologies végétales à l'Université de Blida. Ce travail a été réalisé selon les étapes suivantes :

#### 2.2.9.1. Germination des graines de séné

Avant d'entamer la culture de la plante, nous avons réalisé un test sur le pouvoir germinatif de la graine. Les graines sont extraites des fruits et rincées à l'eau du robinet afin de les débarrasser des traces de poussières.

##### 2.2.9.1.1. Scarification chimique

La scarification chimique consiste à faire tremper les graines dans une solution d'acide sulfurique à 95% pendant une heure afin de ramollir leurs enveloppes et rendre la germination facile. Les graines sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée pour éliminer les résidus de l'acide sulfurique [67].

##### 2.2.9.1.2. Désinfection

La désinfection, étape importante de la culture *in vitro*, a pour objectif la stérilisation de la graine et la diminution des risques de contaminations ultérieures. Sous une hotte à flux laminaire, le procédé de désinfection a été effectué.

Les graines ont été trempées dans une solution fongicide (le benomyle à 0,4% pendant 20min) et mises en agitation dans de l'éthanol 70% (v/v) pendant 5mn. Ensuite elles ont été placées dans une solution de bichlorure de mercure à

0,04% pendant 25 min. Les graines subissent une série de trois rinçages à l'eau distillée stérile pendant 5, 10 et 15 min successivement afin d'éliminer les traces de bichlorure de mercure qui peut empêcher la germination [68].

#### 2.2.9.2. Milieu de culture

Pour réaliser la culture *in vitro* des graines de *C. obovata*, le milieu de culture Murashige et Skoog (MS) a été utilisé. Le milieu contient tous les macroéléments, les oligoéléments et les vitamines indispensables à la croissance. Le pH est ajusté à 5,8 avec le NaOH (1N) ou le HCl (1N) [69].

#### 2.2.9.3. Mise en culture des graines

Les milieux ont été coulés dans des tubes à essais stériles sous hotte à flux laminaire dans des conditions d'asepsie maximale. Les graines désinfectées sontensemencées dans les tubes à raison d'une graine par tubes à essai.

Les tubes sont fermés par des bouchons en plastique et mis dans une chambre de culture à une température constante de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  et une photopériode de 16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité.

L'intensité d'éclairement est assurée par des néons d'une intensité de 20000 à 25000 Lux [70].

Ces mêmes milieux de culture ont été utilisés pour les essais de la germination et la croissance ultérieure des vitroplants. Durant les trois mois de croissance, la biosynthèse des molécules actives a été estimée chez les vitroplants soumis et non soumis au stress thermique.

#### 2.2.9.4. Essai de l'embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique dépend à la fois de l'état physiologique et génétique de l'explant ainsi que de la composition du milieu nutritif et de son équilibre hormonal. Notre travail consiste à :

- Déterminer l'influence de la composition hormonale sur l'induction de la callogenèse et la croissance des cals.

- Estimer l'effet du stress salin et thermique sur une éventuelle biosynthèse des molécules actives *in vitro* dans les cals.

#### 2.2.9.4.1. Matériel végétal

Sous la hotte à flux laminaire, nous avons découpé les vitroplants obtenus en fragments de racines, tiges et feuilles à l'aide de pinces et de scalpels stériles. Nous avons ensuite utilisé des fragments de sections de 1cm de longueur et de 5mm de diamètre de chacun des organes.

#### 2.2.9.4.2. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu MS auquel nous avons ajouté des hormones de croissance qui stimulent la callogenèse.

Quatre combinaisons hormonales ont été utilisées à partir de deux types d'hormones. Les unes sont de type auxinique (2,4D et l'ANA) alors que les autres sont de type cytokinine (BAP et kinétine).

- Combinaison 1 : 1mg/l 2,4D + 1mg/l kinétine
- Combinaison 2 : 1mg/l 2,4D+1mg/l BAP
- Combinaison 3 : 1mg/l ANA +1mg/l BAP
- Combinaison 4 : 1mg/l ANA +1mg/l kinétine

Le rapport auxines/ cytokinines doit être égal à l'unité.

Les milieux de culture additionnés de différentes combinaisons hormonales ont été coulés dans des bocaux à raison de 100ml par bocal et stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20min.

#### 2.2.9.4.3. Repiquage des explants

Les explants ont été repiqués dans des bocaux (10 explants par bocal) contenant chacun le milieu de culture correspondant à une combinaison hormonale.

Les bocaux sont fermés par un film plastique et placés à l'obscurité dans une chambre de culture à une température de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### 2.9.5. Effet du stress salin sur la biosynthèse des sennosides

Des cals de 500mg développés sur le milieu MS contenant la combinaison hormonale la plus favorable à la callogenèse ont été utilisés.

#### 2.2.9.5.1. Milieux de culture

Les milieux de culture MS contenant des concentrations croissantes de NaCl (0%, 0,5%, 1% et 1,5%) ont été coulés dans des bocaux à raison de 100ml par bocal, ensuite stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min.

#### 2.2.9.5.2. Repiquage des cals

Les différents types de cals ont été repiqués dans des bocaux (10 cals par bocal) sur le milieu de culture contenant la concentration en NaCl correspondante.

Ces cals ont été placés dans une chambre de culture à l'obscurité et à une température de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Durant les trois mois de culture, nous avons estimé la biomasse des cals (poids frais et poids sec) et leurs teneurs en sennosides.

### 2.2.9.6. Effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides dans les vitroplants et les cals

Les vitroplants et les cals qui subissent le stress thermique préservés dans leur milieu. Ces derniers ont été maintenus quotidiennement à une température de  $+ 4^\circ\text{C}$  pendant 4 heures. Ils sont ensuite remis dans la chambre de culture à  $25^\circ\text{C}$  pour les vitroplants et  $28^\circ\text{C}$  pour les cals. La synthèse de sennosides est estimée à intervalle régulier au 1<sup>er</sup>, 2<sup>ème</sup> et au 3<sup>ème</sup> mois de culture. Le dosage des sennosides A, B, C, D et rhéine-8-glucose dans les vitroplants et les cals sont réalisés selon les mêmes étapes que celles citées précédemment.

Pour calculer la concentration en sennoside A, B, C, D et rhéine- 8-glucose, nous avons pris comme référence le comprimé Senokot<sup>®</sup> qui contient 7.3 mg de sennoside B pour 152 mg de poudre de séné.

L'absorbance du témoin et celles des différents échantillons a été déterminée dans les longueurs d'ondes correspondant aux différents sennosides.

La teneur de ces derniers est estimée moyennant la connaissance des différentes longueurs d'ondes et les différentes absorbance en se basant sur la teneur en sennoside B dans le témoin (Senokot®)

#### 2.2.9.7. Etude statistique

Nous avons réalisé une étude statistique à l'aide des logiciels PASW Statistics 18.0 (anciennement SPSS) d'IBM Company, Chicago, Illinois, USA et de Statistica 8.0 de Statsoft Inc, Tulsa, USA.

Les données relatives aux échantillons catégoriels ou témoins et ceux soumis à divers types de traitements ont été analysées par ANOVA à un ou deux facteurs (one-way, main effects and factorial ANOVA). Lorsque des différences ont été observées, elles ont été considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

A chaque fois que cela a été le cas, des tests post hoc de comparaisons multiples tels que le test SNK (Student Newman Keuls) ou celui de Tukey ont permis de mettre en évidence le (ou les) groupes responsables de ces différences. Nous avons utilisé, quand il a fallu cibler des groupes précis, le test d'homogénéité (t-test) de comparaison de deux moyennes. Les données numériques sont présentées sous la forme « moyenne  $\pm$  l'erreur standard sur la moyenne ».

Rappel : Si  $\sigma$  est l'écart-type d'un échantillon de données, alors l'erreur standard sur la moyenne (SEM, standard error of mean) est égale à  $\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$

## CHAPITRE 3

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1 Analyses phytochimiques

##### 3.1.1. Analyse des sennosides par chromatographie couche mince (CCM)

Après révélation sur les chromatogrammes des extraits éthanoliques de *C. acutifolia* et *C. obovata*, les spots identifiés par CCM, correspondent (tableau 3.1 et aux figures 3.1 et 3.2), par ordre croissant de leur R<sub>f</sub>, respectivement au sennoside C, Rhéine-8-glucoside, sennoside D, sennoside A et sennoside B. En l'occurrence le principe actif de *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata* est composé de cinq molécules actives.

En outre, les résultats montrent aussi que les R<sub>f</sub> correspondant à chacune des molécules identifiées de *C. acutifolia* et *C. obovata* sont proches de celles obtenues par Karel [62].

Ces molécules sont des anthraquinones ou des hétérosides hydroxyanthracéniques laxatifs. Les différents principes actifs de ce groupe sont des composés phénoliques, hétérosides dérivés de l'anthracène à des degrés d'oxydation variable (anthrones, Anthranols, anthraquinones).

La distribution botanique des espèces à hétérosides anthracéniques est très restreinte. En effet, nous l'observons généralement chez les Liliaceae (Aloès), les Polygonaceae (rhubarbes), les Rhamnaceae (bourdaine, cascara, nerprun) et les Cesalpiniaceae (séné) [71].

Tableau 3.1 : Représentation des Rf obtenus par CCM chez *C.acutifolia* et *C.obovata*

Plante	Spots	Di (en cm)	Rf obtenu (en %)	Rf obtenu (en %)	nom de la molécule (anonyme, 2005)
<i>Cassia acutifolia</i>	1	2.5	16.66	17	Sénnoside B
	2	5.1	34	30	Sénnoside A
	3	6.2	41.33	44	Sénnoside D
	4	9.2	61.33	58	Réinine-8-glucose
	5	11	73.33	68	Sénnoside C
<i>Cassia obovata</i>	1	2.7	18	17	Sénnoside B
	2	5.4	36	30	Sénnoside A
	3	6.5	43.33	44	Sénnoside D
	4	9.4	62.66	58	Réinine-8-glucose
	5	11.2	74.66	68	Sénnoside C

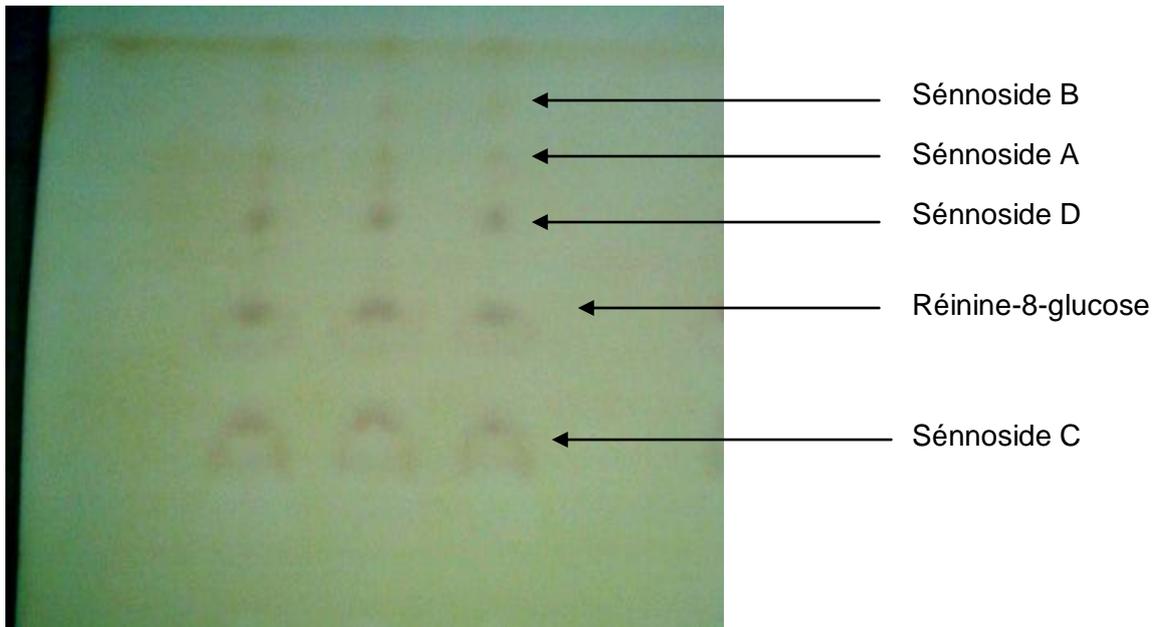


Fig 3.1 : Chromatogramme des sennosides de *Cassia obovata* obtenu par CCM

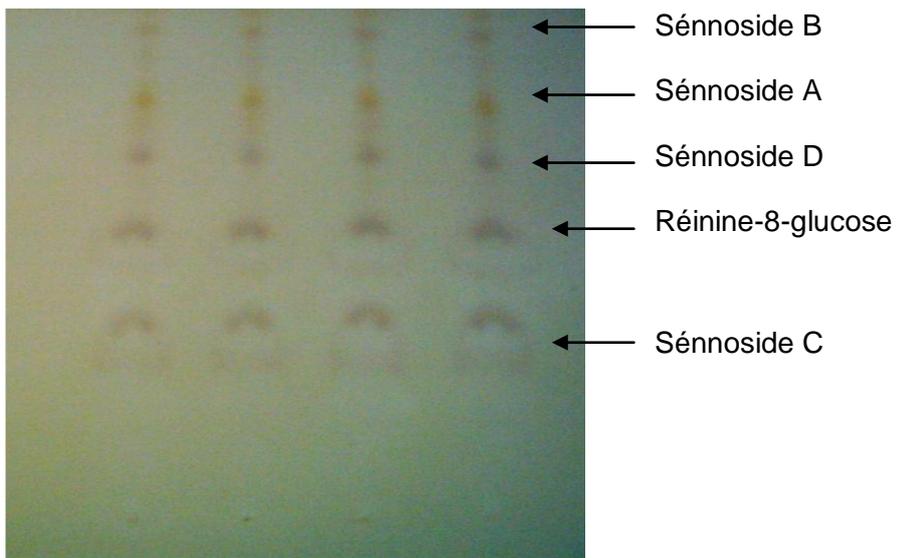


Fig 3.2 : Chromatogramme des sennosides de *Cassia acutifolia* obtenu par CCM

### 3.1.2. Séparation des sennosides par chromatographie sur colonne

Après séparation réalisée par chromatographie sur colonne et identification par UV-Vis, nous avons pu mettre en évidence l'apparition d'une seule fraction à une longueur d'onde de 356 nm. Elle correspond au sennoside B, qui représente le composé majoritaire (fig 3.3 et fig. 3.4). Néanmoins, la chromatographie sur colonne ne montre pas la présence des autres sennosides, (sennoside C, rhéine-8-glucoside, sennoside D et sennoside A). Ce résultat serait dû éventuellement à l'impossibilité de mettre en évidence la séparation des différents sennosides par la méthode de la chromatographie sur colonne.

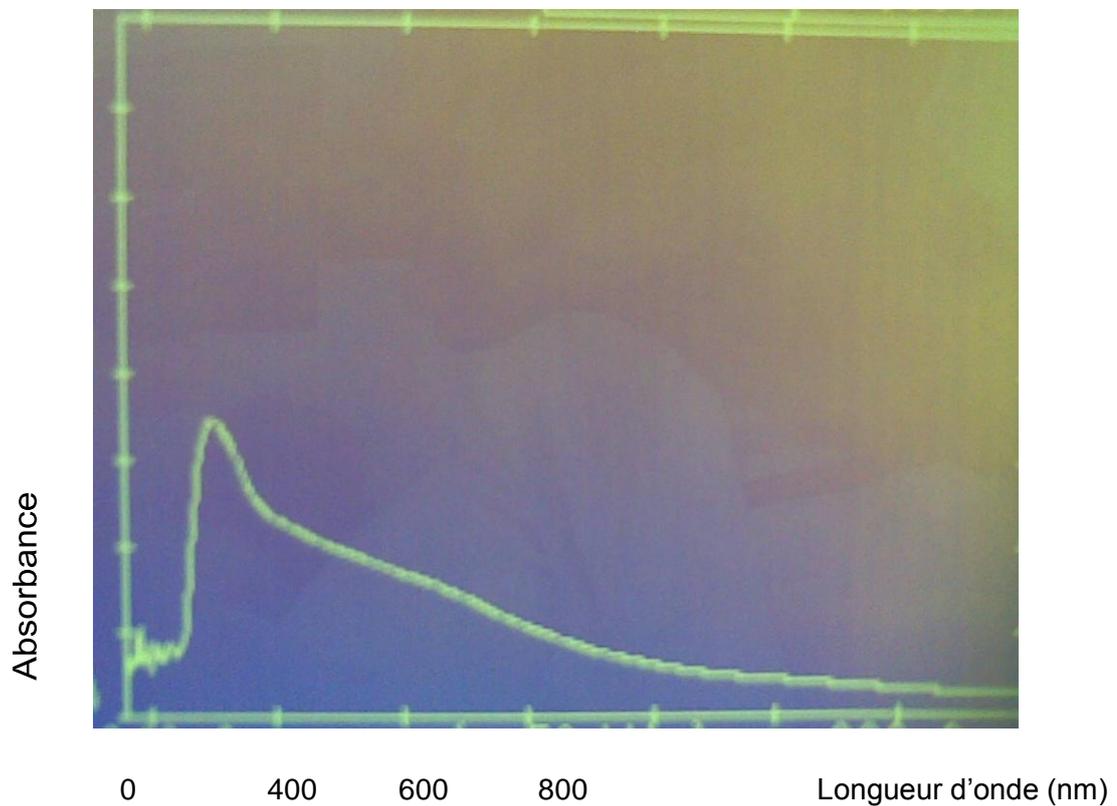


Figure. 3.3 : Spectre d'absorption du sennoside B chez *Cassia obovata* et obtenu par analyse avec spectrométrie UV-Vis

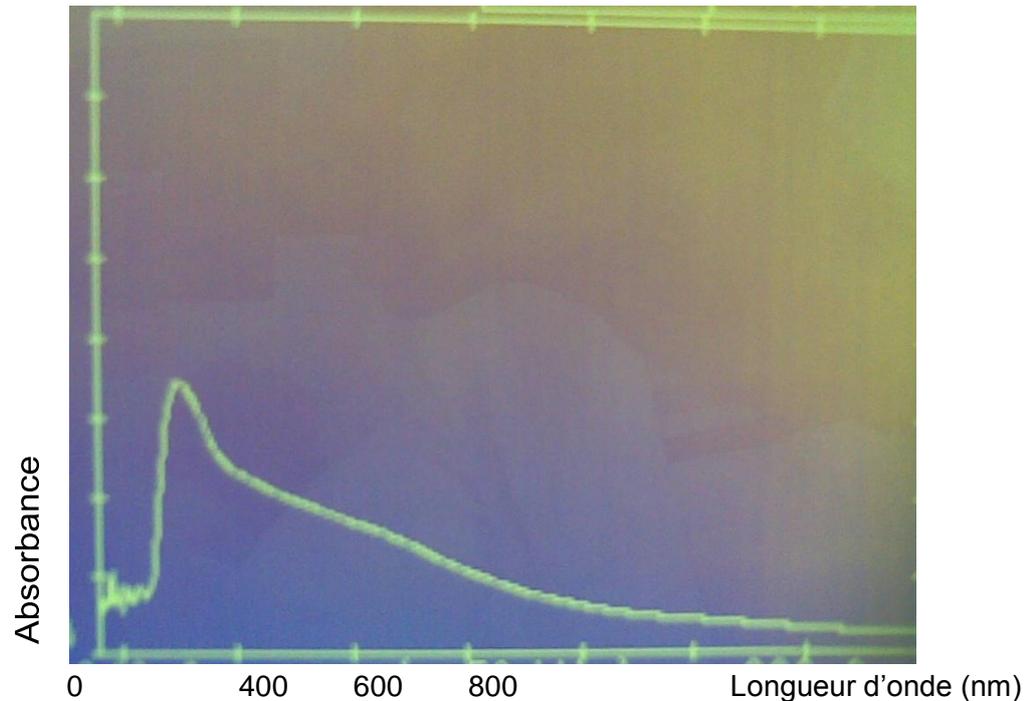


Figure. 3.4: Spectre d'absorption du sennoside B chez *Cassia acutifolia* et obtenu par analyse avec spectrométrie UV-Vis

### 3.1.3. Analyse par HPLC de la fraction séparée par colonne

Afin de confirmer les résultats obtenus précédemment (3.1.2.) quant au sennoside B, une analyse par HPLC a été effectuée.

Les profils chromatographiques de *C. acutifolia* et de *C. obovata* (fig 3.5 et 3.6) montrent un seul pic qui correspond au temps de rétention 1.636 mn. Ainsi, la fraction analysée est pure car, elle ne contient qu'un seul composé qui en l'occurrence est le sennoside B.

Chez *C. angustifolia* les composés majoritaires sont les sennosides A et B [72].

Les sennosides A et B sont des di-O-glucosides en C-8 et en C-8' d'une génine homodianthronique symétrique, la dirhéine anthrone. La matière sèche peut aussi renfermer des traces d'antraquinones libres et une faible quantité d'hétérosides d'antraquinones ainsi que des hétérosides d'antrones monomères. Néanmoins, les dérivés dianthroniques n'existent pas dans la matière végétale fraîche. Cette dernière contient majoritairement, les O-glucosides en C-8, de la rhéine-8-anthrone et de l'aloé-émodol anthrone. C'est au cours du séchage à 40°C, que les glucosides d'antrones sont dimérisés par un processus

enzymatique. Lorsque le séchage est effectué à une température élevée, la liaison hétérosidique est rompue et les anthrones sont immédiatement oxydés en anthraquinones [72].

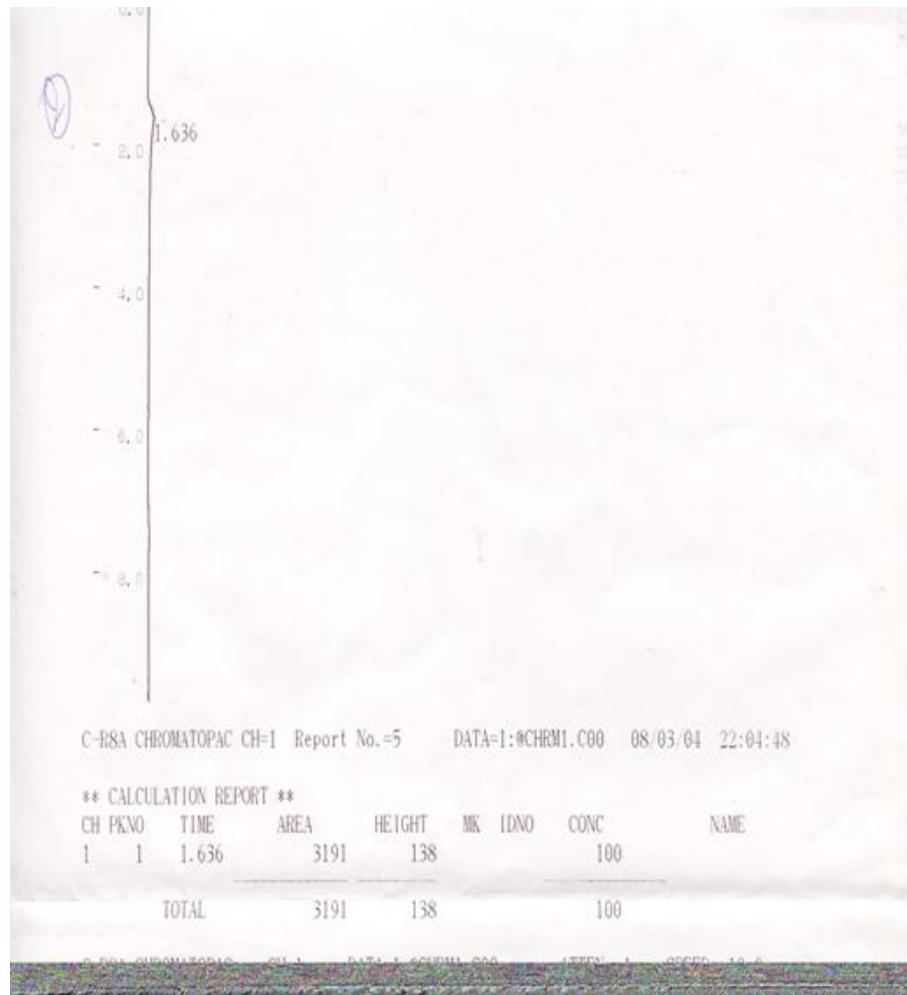


Figure 3.5 : Chromatogramme du sennoside B de *C. acutifolia* obtenu par HPLC.

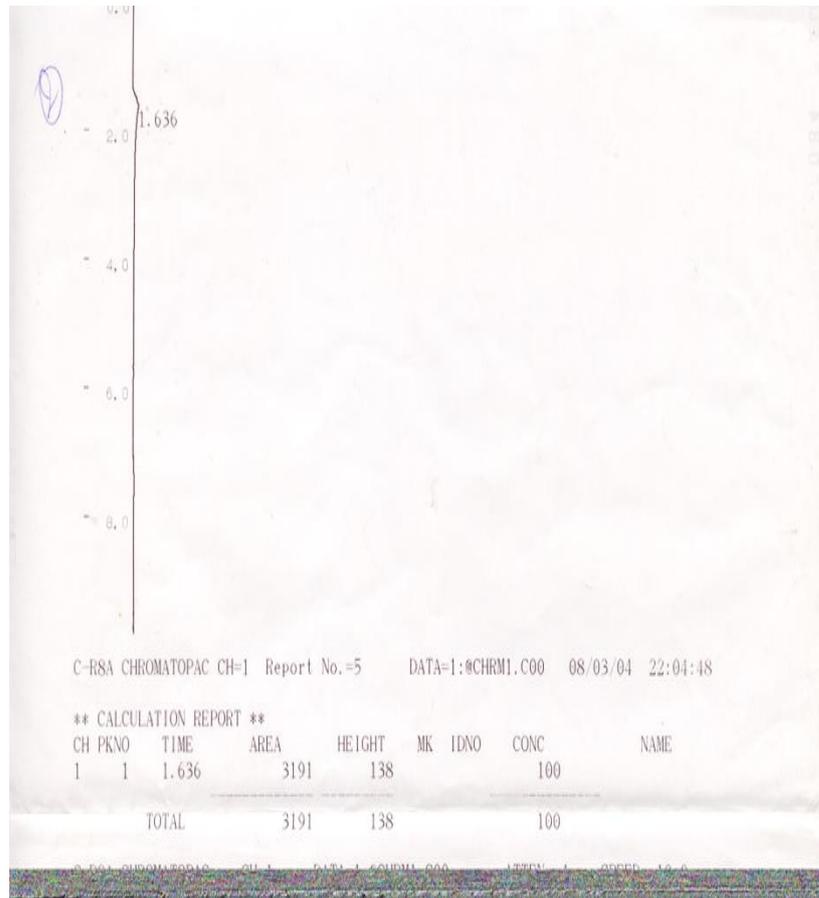


Figure 3.6 : Chromatogramme du sennoside B de *C. obovata* obtenu par HPLC.

#### 3.1.4. Analyse par HPLC des extraits éthanoliques du séné

La comparaison des différents profils chromatographiques entre les extraits éthanoliques de *C. acutifolia*, de *C. obovata* (fig 3.8 et fig 3.9) avec le témoin de référence (fig 3.7) montre que le chromatogramme de *C. obovata* est formé de 9 pics, tandis que celui de *C. acutifolia*, n'est formé que de 6 pics. Il en résulte que, *Cassia obovata* contient une plus grande diversité en molécules actives comparativement à *C. acutifolia*.

Néanmoins les deux chromatogrammes de *C. obovata* et *C. acutifolia* présentent une certaine similitude. Cette dernière est représentée par la présence de cinq pics dont les valeurs sont identiques ou proches et qui correspondent aux temps de rétention suivants :

Temps de rétention 1.57 *C. acutifolia*, Temps de rétention 1.57 *C. obovata*  
 Temps de rétention 2.77 *C. acutifolia*, Temps de rétention 2.77 *C. obovata*  
 Temps de rétention 7.76 *C. acutifolia*, Temps de rétention 7.90 *C. obovata*  
 Temps de rétention 9.89 *C. acutifolia*, Temps de rétention 10.01 *C. obovata*  
 Temps de rétention 12.39 *C. acutifolia*, Temps de rétention 12.13 *C. obovata*

Le chromatogramme de *C. obovata* (3.9) présente 7 composés comparables à ceux du chromatogramme du témoin de référence (fig 3.7) et dont les temps de rétention sont les suivants :

Temps de rétention 1.57 *C. obovata*, Temps de rétention 1.61 témoin de référence  
 Temps de rétention 2.77 *C. obovata*, Temps de rétention 2.74 témoin de référence  
 Temps de rétention 3.52 *C. obovata*, Temps de rétention 3.29 témoin de référence  
 Temps de rétention 3.78 *C. obovata*, Temps de rétention 3.76 témoin de référence  
 Temps de rétention 6.32 *C. obovata*, Temps de rétention 5.88 témoin de référence  
 Temps de rétention 7.90 *C. obovata*, Temps de rétention 7.49 témoin de référence  
 Temps de rétention 12.39 *C. obovata*, Temps de rétention 11.26 témoin de référence

Quant au chromatogramme de *C. acutifolia* (3.8), il présente 5 composés comparables à ceux du chromatogramme du témoin de référence (fig 3.6) et dont les temps de rétention sont les suivants :

Temps de rétention 1.57 *C. acutifolia*, Temps de rétention 1.61 témoin de référence  
 Temps de rétention 2.77 *C. acutifolia*, Temps de rétention 2.74 témoin de référence  
 Temps de rétention 5.21 *C. acutifolia*, Temps de rétention 5.88 témoin de référence  
 Temps de rétention 7.76 *C. acutifolia*, Temps de rétention 7.49 témoin de référence  
 Temps de rétention 12.13 *C. acutifolia*, Temps de rétention 11.66 témoin de référence

La comparaison des différents temps de rétention des extraits éthanoliques de *C. acutifolia* et *C. obovata* nous permettent de mettre en évidence la présence des sennosides suivants : sennoside C, rhéine-8-glucoside, sennoside D, sennoside A et sennoside B.

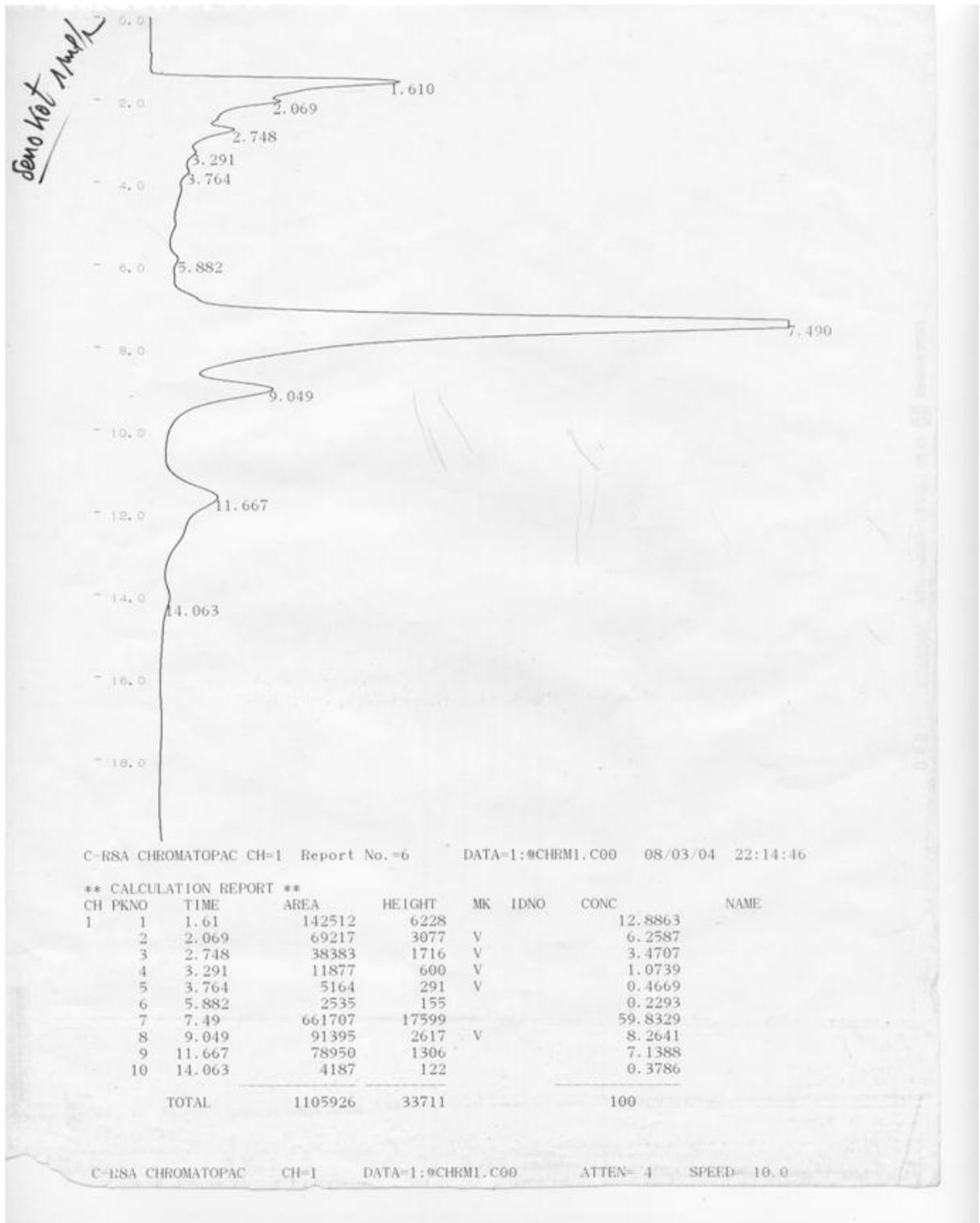


Figure 3.7 : Chromatogramme de senokot (témoin de référence) obtenu par HPLC

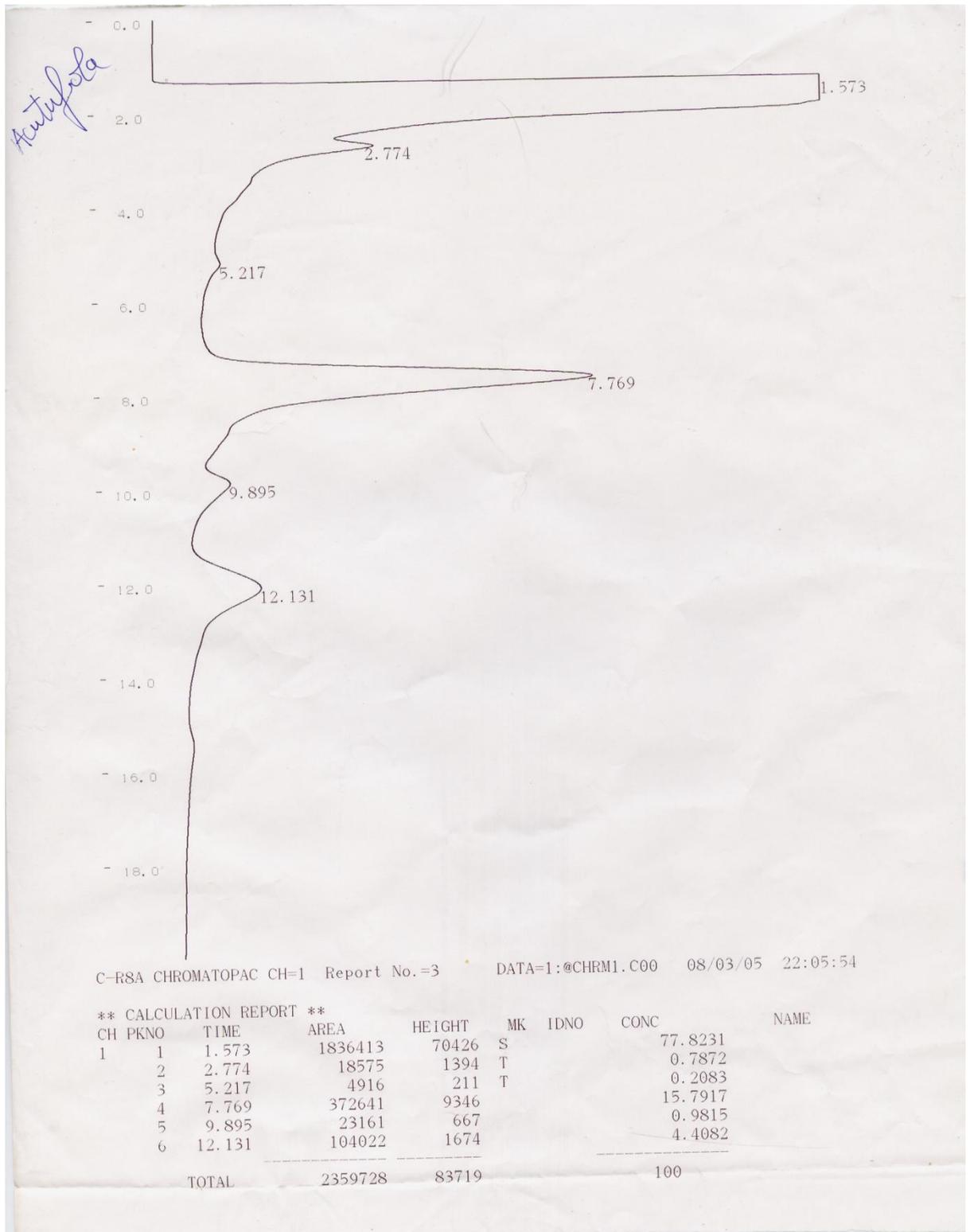


Figure 3.8 : Chromatogramme de *C. acutifolia* obtenu par HPLC

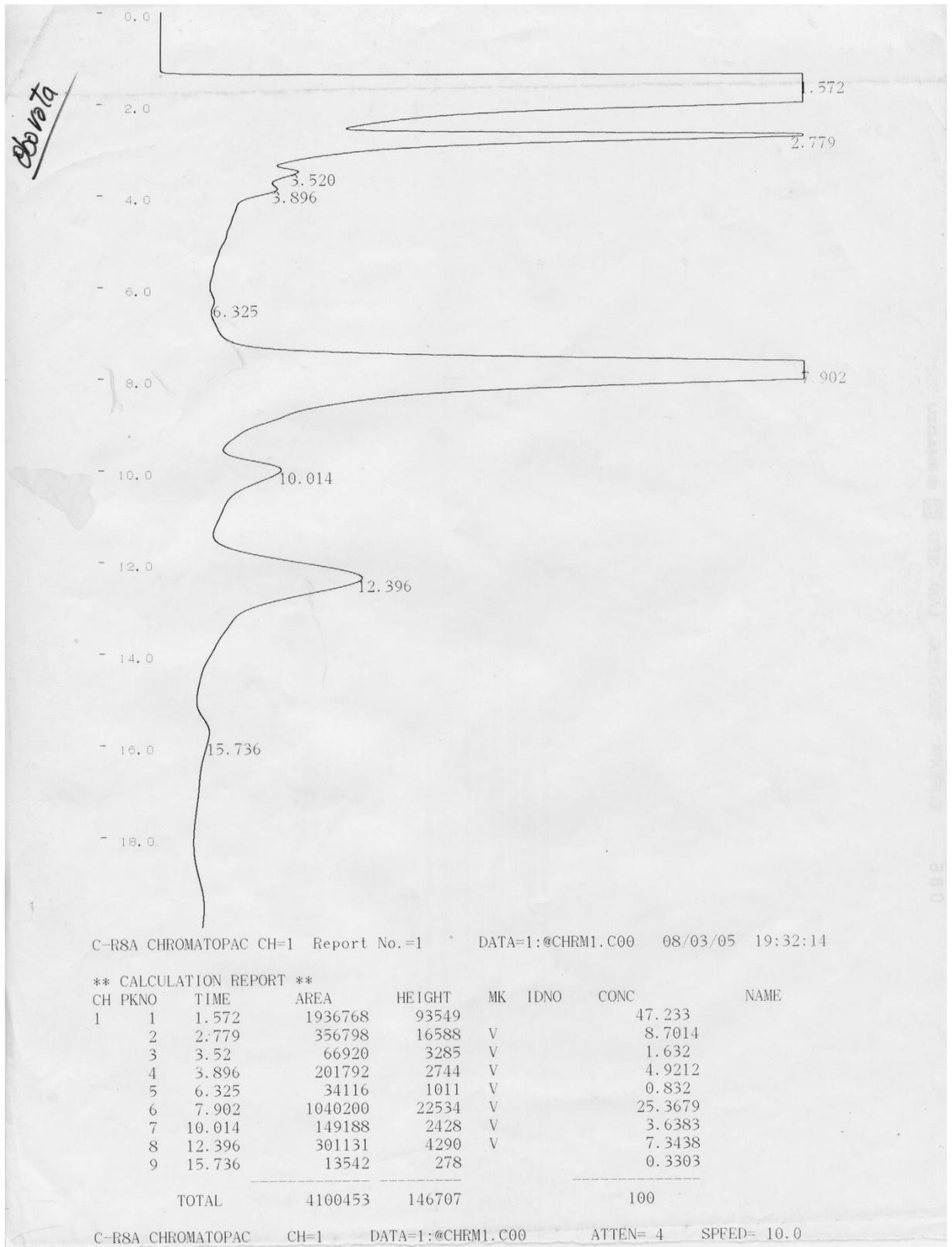


Figure 3.9 : Chromatogramme de *C. obovata* obtenu par HPLC

### 3.1.5. Dosage des sennosides par spectrophotométrie UV-vis

Chez *C. acutifolia* les teneurs en sennoside C, rhéine-8-glucoside, sennoside D sennoside A et sennoside B sont de 5,28 % (tableau 3.2).

Chez *C. obovata* les teneurs en sennoside C, rhéine-8-glucoside, sennoside D sennoside A et sennoside B sont de 4,74 % (tableau 3.2).

Les résultats que nous avons obtenus, quant aux teneurs en sennosides, se rapprochent de ceux obtenus par Evans [48] sur le séné. En effet, leurs travaux montrent des teneurs en sennosides qui varient entre 2.5 et 8%.

Les différences quantitatives en sennosides chez les plantes peuvent être expliquées par des caractères phylogénétiques propres à l'espèce. En effet, la teneur en phénols n'est pas stable, elle diffère d'une plante à une autre, même entre les espèces du même genre [73]. Selon Navaro et al. [74], la composition et la distribution de ses composés sont affectées par le stade de développement et de maturation, le génotype, les pratiques culturales ainsi que l'état de conservation de la plante.

Néanmoins, il est à souligner que nous avons pu quantifier la molécule principale, la plus abondante qui est le sennoside B, avec une proportion de 74.04 % chez *C. acutifolia* et 74.4% chez *C. obovata*

Nos résultats concordent avec ceux de Sun et Su [55] qui ont rapporté que l'extrait aqueux de *C. angustifolia* renferme plusieurs molécules actives, entre autres les dianthrone glycosides (sennosides A, B, C, D) et des anthraquinone glucosides. Néanmoins, ils ont observé que les teneurs en sennosides A et B sont très élevées en comparaison avec les autres constituants (sennoside C, rhéine-8-glucoside, sennoside D). Par ailleurs, la teneur maximale des feuilles en sennosides de *C. angustifolia* et *C. acutifolia* développés sur un milieu contrôlé a été signalée dans les parties vertes, notamment dans les feuilles [75]. Néanmoins, selon Sharma et al., [77], une diminution relative en sennosides apparaît dans les parties vertes de la plupart des espèces étudiées, elle serait liée à l'âge de la plante. Par ailleurs, les travaux de Lohar et al. [76] ont signalé que la teneur en sennosides diminue au début de la phase reproductrice chez *C. angustifolia*.

La teneur en sennosides dans les feuilles *C. fustila* varie selon les saisons et l'âge de la plante Cano et al., [78]. Ces mêmes auteurs ont observé un rendement maximal en sennosides dans les jeunes feuilles qui apparaissent

durant la période pluviale ainsi que dans les parties vertes avant la maturation des fruits.

Selon Arshi et *al.*, [79] un apport en NaCl entraîne une diminution des sennosides dans les feuilles et les parties vertes chez *C. angutifolia* et *C. acutifolia*.

Chez *C. angutifolia* et *C. acutifolia* Au contraire, le CaCl<sub>2</sub> exerce un effet stimulateur. L'effet stimulateur des ions CaCl<sub>2</sub> sur la teneur en sennosides revient au rôle qu'ils remplissent dans la diversification des voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse des métabolites secondaires.

Selon Bilia et *al.* [80], les plantes soumises au stress salin montrent une diminution des sennosides due à la diminution du flux de la matière organique, causé par l'apport du NaCl et son impact sur le métabolisme secondaire ainsi que sur les enzymes impliquées dans les voies biosynthétiques des sennosides.

Tableau 3.2 : Dosage des sennosides par spectrométrie UV-Vis

Plante	Types de sennosides	Longueurs d'onde (nm)	Absorbance	Concentration en µg/l	Pourcentage (%)
Témoin (senokot)	Sénnoside B	356	0.921	4.8	79.07
	Sénnoside A	536	0.095	0.49	8.07
	Sénnoside D	607	0.057	0.29	4.7
	Réinine-8-glucose	668	0.055	0.27	4.4
	Sénnoside C	750	0.043	0.22	3.6
				Totale : 6.07	
<i>C.acutifolia</i>	Sénnoside B	350	0.751	3.91	74.05
	Sénnoside A	536	0.089	0.46	8.7
	Sénnoside D	608	0.065	0.33	6.2
	Réinine-8-glucose	668	0.065	0.33	6.2
	Sénnoside C	750	0.052	0.25	4.7
				Totale : 5.28	
<i>C. obovata</i>	Sénnoside B	356	0.644	3.53	74.4
	Sénnoside A	536	0.084	0.44	9.2
	Sénnoside D	608	0.058	0.30	6.3
	Réinine-8-glucose	668	0.057	0.29	6.2
	Sénnoside C	750	0.036	0.18	3.7
				Totale : 4.74	

Concentration des sennosides en mg par 100mg de poudre de la plante  
pourcentage de chaque sennoside pour la quantité totale des sennosides

### 3.1.6. Rendement et identification des huiles essentielles

Le rendement en huiles essentielles de *C. acutifolia* et *C. obovata* est faible. Il est de 0,26% pour *C. obovata* et de 0,36% pour *C. acutifolia*. Ces différences quantitatives en huiles essentielles peuvent s'expliquer par les caractères génotypiques liés à l'espèce. En effet le rendement en huiles essentielles des végétaux varie selon la plante utilisée, le matériel et la méthode d'extraction, ainsi que l'origine de la plante.

L'analyse des huiles essentielle, par CG/MS, nous a permis d'identifier les profils chromatographiques de *C. acutifolia* et *C. obovata*. Les résultats (figures 3.10 et 3.11, tableaux 3.3 et 3.4) montrent que le profil chromatographique de *C. acutifolia* présente 13 pics dont 7 sont majoritaires, celui de *C. obovata* présente 10 pics, dont 5 sont majoritaires.

Chez *C. obovata* l'identification par spectrométrie de masse de ces profils, a montré la présence des molécules suivantes :

- Le Carvacrol et de son isomère le thymol à des teneurs respectives de 43% et 3%.
- Le BHT, à une teneur de 27%.
- Le Diisooctyl phthalate à une teneur de 16 %.
- Le p-Cresol, 2,2'-methylenebis (6-tert-butyl) à une teneur de 5%.

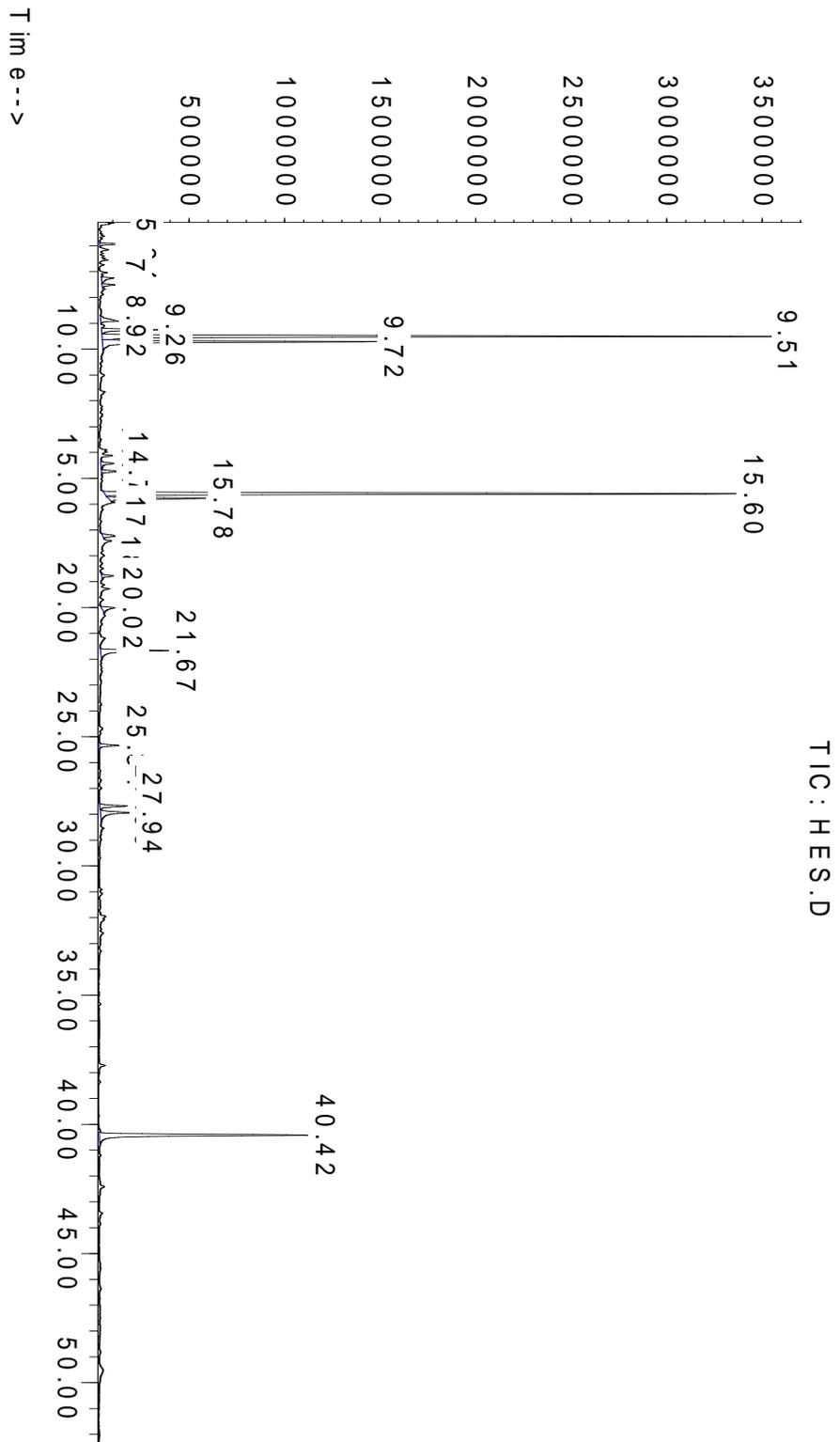
Les mêmes résultats sont observés chez *C. acutifolia*, quant au carvacrol et au thymol dont les teneurs respectives sont 30.35 % et 03 %.

Le BHT est présent à une teneur de 29.07 % et le Diisooctyl phthalate atteint 9.58%.

Nous soulignons que *C. obovata* et *C. acutifolia* montrent une composition en huiles essentielle similaire néanmoins, une légère différence apparaît dans la teneur en carvacrol. Cependant, nous remarquons la présence de trois composés chez *C. acutifolia* (le Dihydrocoumarin, 5, 7,8-trimethyl (3.5%), le Dihydroactinidiolide (5.11%) et le p-Vinylguaïacol (12.77%)). Ces composés n'ont pas été détectés chez *C. obovata*. Il est à souligner que l'huile essentielle de *C. obovata* présente le p-Cresol, 2,2'-methylenebis (6-tert-butyl) alors qu'il est absent chez *C. acutifolia*.

Nos résultats montrent que la composition chimique des huiles essentielles du séné de Tamanrasset (Algérie) est complètement différente en comparaison avec celles des huiles essentielles du séné du Gabon, qui sont caractérisées par la prédominance de linalool (23.0%), de borneol (8.6%) et de pentadecanal (9.3%) [81].

Abundance

Figure 3.10 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *C. acutifolia*.

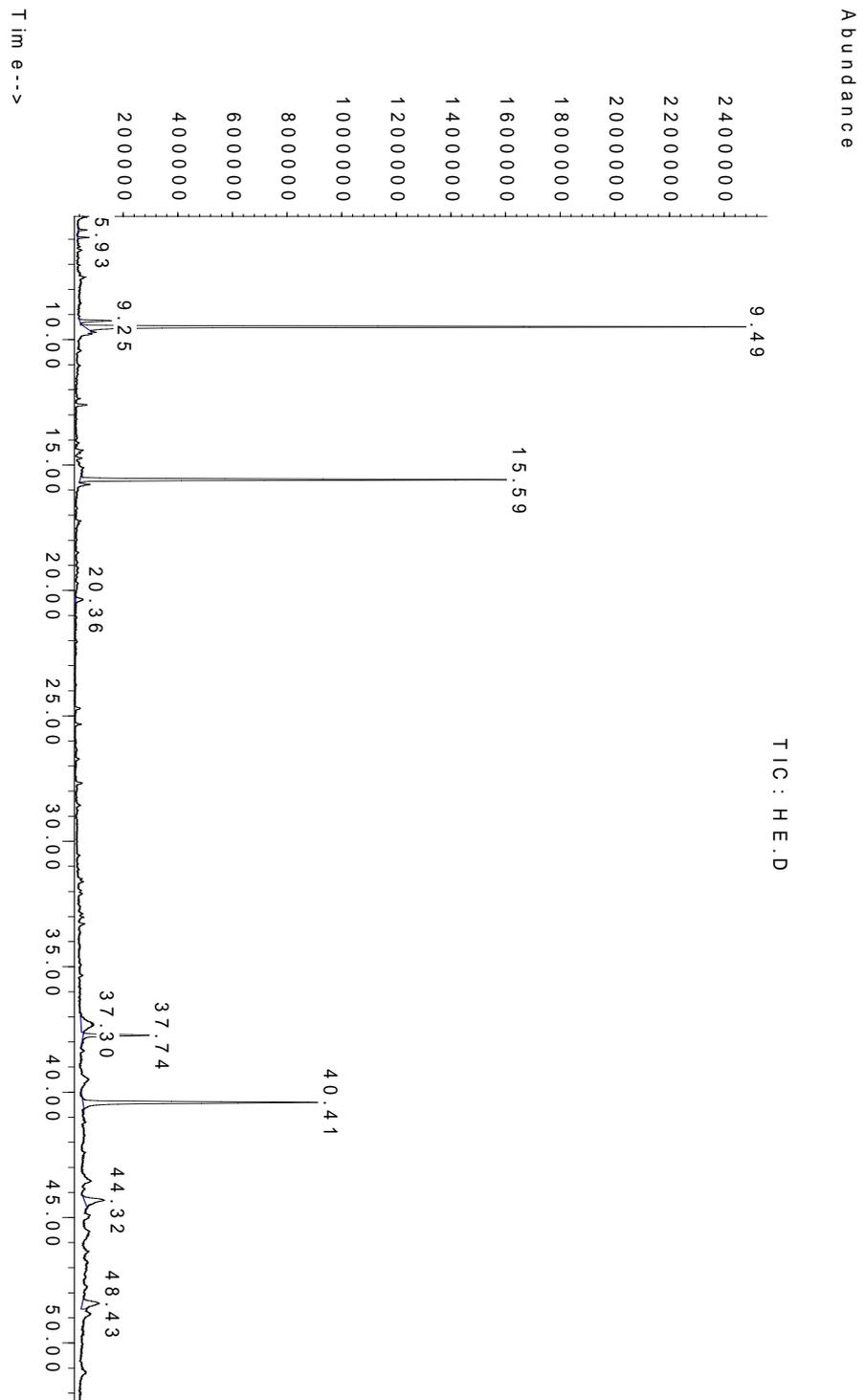


Figure 3.11 : Chromatogramme de l'huile essentielle de *C. obovata*.

Tableau 3.3 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *C. obovata* identifiés par GC/MS.

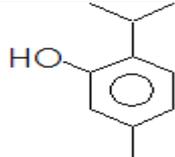
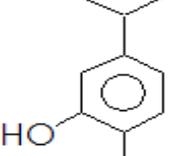
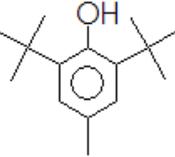
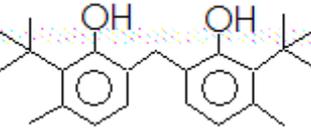
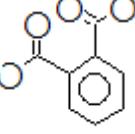
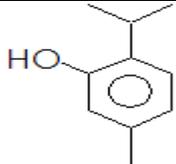
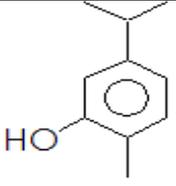
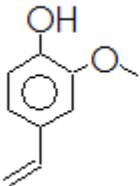
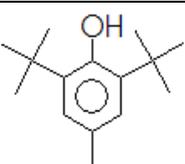
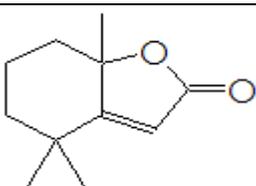
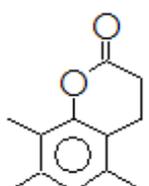
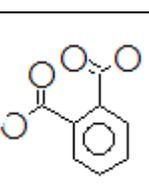
	Temps de rétention (min)	Composés	Pourcentage	Formule brute	Structure
1	9.25	(R) thymol	03%	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
2	9.49	Carvacrol	43%	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
3	15.59	Butyl Hydroxytoluene	27%	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	
4	37.74	p-Cresol, 2,2'-methylenebis[6-tert-butyl	05%	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	
5	40.41	Diisooctyl phthalate;	16%	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	

Tableau 3.4 : Composés majoritaires de l'huile essentielle de *C. acutifolia* identifiés par GC/MS.

	Temps de rétention (min)	Composés	%	Formule brute	Structure
1	9.26	(R) thymol	03%	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
2	9.51	Carvacrol	30.35%	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	
3	9.72	p-Vinylguaiacol	12.77%	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	
4	15.60	Butyl Hydroxytoluene	29.07%	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	
5	15.78	Dihydroactinidiolide,	5.11%	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	
6	21.67	Dihydrocoumarin, 5,7,8-trimethyl-	3.5%		
7	40.42	Diisooctyl phthalate;	9.58%	C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	

### 3.1.7. Etude de l'activité antimicrobienne

L'activité antibactérienne des huiles essentielles et des extraits éthanoliques (2g/ 20ml) sont illustrés dans les tableaux (3.5) et (3.6). Les extraits éthanoliques et les huiles essentielles montrent une activité antibactérienne. Ainsi 8 souches parmi 14 souches utilisées ont montrées une activité antimicrobienne. Néanmoins cette activité antimicrobienne est différente dans son intensité selon les souches étudiées.

Les souches *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* ont présenté des zones d'inhibition dont le diamètre se situe entre 15 et 20 mm. Elles sont donc considérées comme des souches sensibles à l'huile essentielle et à l'extrait éthanolique. Une nette sensibilité de *Pseudomonas sp* est observée sous l'effet de l'extrait éthanolique à 2g/ 20ml, le même résultat a été observé avec *E. coli*. L'huile essentielle du séné n'a aucun effet sur *Pseudomonas sp* et sur *E. coli*.

Par ailleurs les souches d'*Agrobacterium* sont considérées comme des souches limites avec des zones d'inhibition inférieures à 15 mm. *Proteus mirabilis*, *Serratia marcesens*, *Klebseilla pneumonie* sont considérées comme des souches non sensibles à l'application de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique car aucune zone d'inhibition n'a été observée.

*Candida albicans* est considéré n'est pas sensible aux applications de l'huile essentielle et de l'extrait éthanolique car aucune zone d'inhibition n'a été observée.

L'activité antibactérienne des huiles essentielles est due à leur richesse en carvacrol, qui représente le pouvoir antibactérien. En effet le carvacrol est un composé phénolique qui contient le long de sa chaîne moléculaire des groupements hydroxyyles actifs. Il désintègre les membranes des bactéries Gram-négatives en détruisant les lipopolysaccharides (LPS), conduisant à une perte de la perméabilité membranaire [82] [83].

Des études ont montré que le carvacrol interagit avec les constituants de la membrane cellulaire. Il se dissout dans la couche phospholipidique entre les chaînes des acides gras entraînant la distorsion de la membrane et par la suite une augmentation de sa fluidité et de sa perméabilité passive [84].

Certaines études ont montré que les phénols détruisent les constituants de la membrane cytoplasmique entraînant une perte des constituants intracellulaires [85] [86] [87].

Les phénols peuvent affecter aussi le métabolisme énergétique, l'activité ATPasique, la synthèse des acides nucléiques et la prise des éléments nutritifs. [88] [85] [89].

Peu de travaux sur l'activité antimicrobienne des huiles essentielles et des extraits éthanoliques de *C. acutifolia* et *C. obovata* ont été abordés. Toutefois nous pouvons citer ceux consacrés à d'autres espèces appartenant au genre *Cassia*.

Dans une étude sur l'activité antimicrobienne de l'extrait éthanolique des racines de *Cassia occidentalis*, Chukwujekwu et al., [90], ont rapporté que la CMI de *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* est respectivement de  $7,8 \times 10^{-3}$  mg/ml et  $3,9 \times 10^{-3}$  mg/ml. Par ailleurs le même extrait ne présente aucun effet sur les bactéries Gram négative (*Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*) même à de fortes concentrations ( $1 \times 10^{-1}$  mg/ml).

Les extraits alcooliques de *C. alata* à 4mg/ml inhibent la croissance d'*E. coli*, et de *S. aureus*. Ces mêmes extraits ne présentent aucune activité sur *Aspergillus niger* et *Trichophyton mentagrophytes*. L'activité antibactérienne la plus prononcée sur ces germes est celle de l'extrait dichlorométhanique des fleurs [91] [92].

Par ailleurs, la croissance d'*Aspergillus funigatus* n'a pas été affectée par l'extrait aqueux et éthanolique de *C. alata* comparativement à celle des souches témoins qui ont été traitées par un composé antifongique (Tioconazole) [93].

Les extraits éthanoliques et aqueux de *C. alata* ont montré une activité antibactérienne sur *S. aureus*. Par ailleurs les germes d'*E. coli* ont développés une résistance vis-à-vis de l'extrait éthanolique et de l'extrait aqueux de *C. alata* [94] [95]. Néanmoins selon (Crocket et al., [95], l'extrait aqueux de *C. alata* présente une activité antibactérienne sur *Escherichia coli* et *Candida albicans*. Cette activité est environ 1000 fois plus faible que celle du chloramphénicol ou l'amphotéricine B sur *E. coli* et *Candida albicans*.

Selon Ibrahim et Osman [96], les extraits éthanoliques de *C. alata* sont très actifs sur *Trichoderma sp*, moins actifs sur les moisissures et inactifs sur les bactéries et les levures testées.

L'extrait méthanolique à 2g/l des graines de *C. tora* montre un effet antifongique sur *B. cinerea*, *E. graminis*, *P. infestins*, et *R. solani*. Par ailleurs ce même extrait ne montre aucun effet sur *Py. Grisea* et *P. recondite* [97].

Tableau 3.5 : Activité antimicrobienne des huiles essentielles de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

Les souches	HE <i>C. acutifolia</i>	HE <i>C. obovata</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ø = 15	Ø = 16
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ø = 15	Ø = 16
<i>Bacillus subtilis</i>	Ø = 20	Ø = 18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	–
<i>Escherichia coli</i>	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ø = 16	Ø = 15
<i>Pseudomonas sp</i>	–	–
<i>Proteus mirabilis</i>	–	–
<i>Serratia marcescens</i>	–	–
Agrobactérium	Ø = 13	Ø = 12
Agrobactérium	Ø = 12	Ø = 10
Agrobactérium	Ø = 13	Ø = 11
Agrobactérium	Ø = 11	Ø = 13
<i>Candida albicans</i>	–	–

Tableau 3.6 : Activités antimicrobiennes des extraits éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

Les souches	Extrait éthanolique de <i>C. acutifolia</i>		Extrait éthanolique de <i>C. obovata</i>	
	1g/20ml	2g/20ml	1g/20ml	1g/20ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ø = 14	Ø = 20	Ø = 14	Ø = 17
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ø = 14	Ø = 15	Ø = 14	Ø = 15
<i>Bacillus subtilis</i>	Ø = 15	Ø = 17	Ø = 14	Ø = 18
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i>	–	Ø = 15	–	Ø = 13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ø = 14	Ø = 15	Ø = 15	Ø = 15
<i>Pseudomonas sp</i>	–	Ø = 15	–	Ø = 15
<i>Proteus mirabilis</i>	–	–	–	–
<i>Serratia marcescens</i>	–	–	–	–
Agrobactérium	Ø = 13	Ø = 12	Ø = 13	Ø = 13
Agrobactérium	Ø = 14	Ø = 12	Ø = 12	Ø = 12
Agrobactérium	Ø = 13	Ø = 13	Ø = 13	Ø = 13
Agrobactérium	Ø = 11	Ø = 11	Ø = 11	Ø = 11
<i>Candida albicans</i>	–	–	–	–

Ø : diamètre de la zone d'inhibition en mm

– : absence de la zone d'inhibition

### 3.1.8. Analyse des flavonoïdes

#### 3.1.8.1. Rendement en flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes atteint 4,45% chez *C. acutifolia*, alors que chez *C. obovata*, elle est de 7,33%. Dans une étude réalisée sur quarts plantes (*lavandula stoechas* L., *Cistus ladaniferus* L., *Crataegus oxyacantha* L. et *Smyrniolum olusatrum* L.) de la région de Tlemcen, Mohammadi [98] a obtenu des teneurs en flavonoïdes inférieures à 5%, alors que Djabou [99] a obtenu un rendement de 0,26% chez *Sambucus nigra*. Par ailleurs il est difficile de comparer nos résultats avec ceux observés dans la bibliographie. En effet le rendement n'est pas relatif. Il dépend des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée. Ainsi, la méthode d'extraction affecte également le contenu total en phénols et en flavonoïdes [100].

#### 3.1.8.2. Analyse des flavonoïdes par spectrophotométrie ultraviolet-visible (UV-Vis)

Selon les résultats (tableau 3.7) et (fig 3.12 et 3.13), nous constatons que les valeurs de la longueur d'onde qui correspondent aux flavonoïdes chez *C. acutifolia* et *C. obovata* sont pratiquement identiques. Ainsi nous pouvons dire éventuellement que *C. acutifolia* et *C. obovata* présentent les mêmes types de flavonoïdes.

Ces analyses ont révélé la richesse de *C. acutifolia* et *C. obovata* en flavonoïdes. Plusieurs travaux ont souligné les potentialités pharmacologiques des flavonoïdes [24].

Dans le cas des plantes utilisées en phytothérapie il est difficile de parler de plantes à flavonoïdes. Il est probable que ces phénols participent en synergie avec d'autres composés à l'activité thérapeutique des plantes médicinales. En effet les huiles essentielles, certains composés phénoliques, des sels minéraux, ou d'autres substances peuvent justifier une partie des propriétés thérapeutiques de ces plantes [101]. Plusieurs espèces appartenant au genre *Cassia* sont connues pour leur richesse en flavonoïdes notamment *C. fistula*. Ainsi *C. alata* les flavonoïdes sont représentées par des anthraquinones et des glucosides flaviniques [91].

Selon Luximon-Ramma et al., [102], le contenu des feuilles de *C. fistula* en composés phénoliques, notamment en protoanthocyanidines et en flavonoïdes est important.

Les flavonoïdes et certains autres composés produits dans les plantes possèdent un pouvoir antioxydant [100]. Ces composés inhibent la peroxydation des lipides et protègent l'organisme contre plusieurs maladies notamment l'athérosclérose, la maladie de Parkinson, le cancer et la maladie d'Alzheimer [103] [104] [105].

Le rôle physiologique des radicaux libres est incomplètement élucidé. Ils seraient éventuellement responsables des mutations génétiques de manière générale et de l'altération des acides nucléiques. La majorité des auteurs admet aujourd'hui, en l'absence de preuve absolue, l'hypothèse selon laquelle les radicaux ont une part de responsabilité dans la genèse des lésions athéromateuses, dans l'apparition de certains cancers ou dans les dégénérescences nerveuses. Ainsi, les flavonoïdes pourraient jouer un rôle préventif comme antioxydant, capables de piéger les radicaux libres [24].

Tableau 3.7 : Longueurs d'ondes et absorbances correspondant aux flavonoïdes de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

Plantes	Longueur d'onde (nm)	Absorbance
<i>C. acutifolia</i>	283	0.89
<i>C. obovata</i>	278	0.96

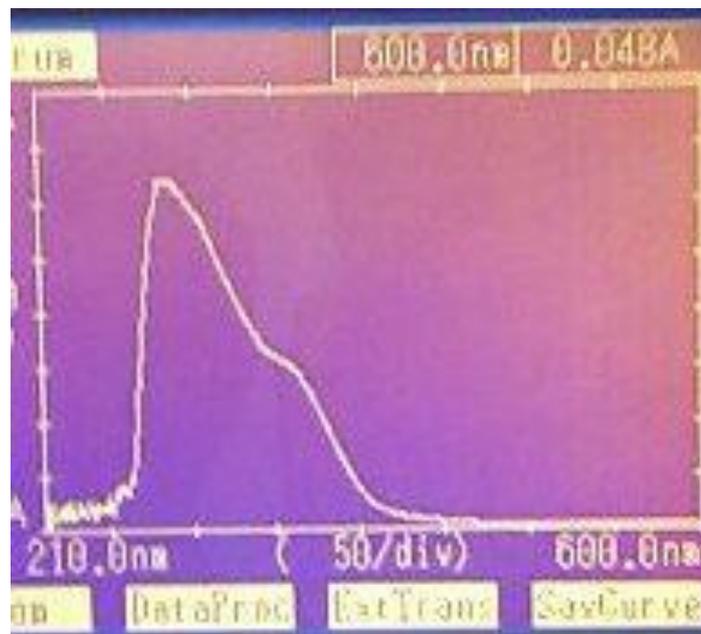


Figure 3.12 : Spectre des flavonoïdes de *C. obovata* obtenu par analyse avec spectrophotométrie UV-vis.

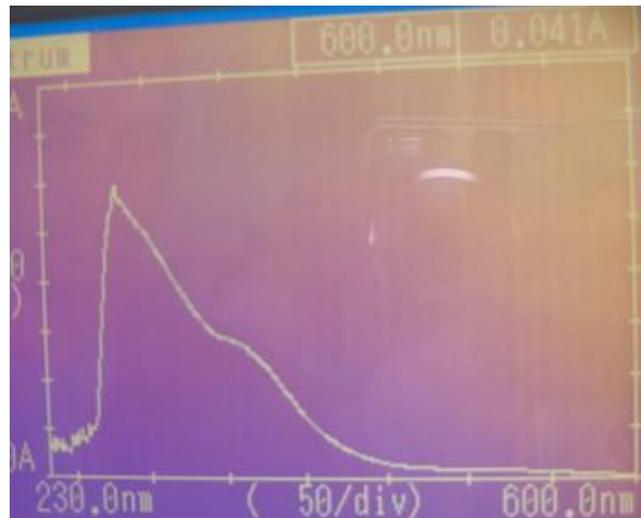


Figure 3.13 : Spectre des flavonoïdes de *C. acutifolia* obtenu par analyse avec spectrophotométrie UV-vis.

### 3.1.9. Dosage des éléments minéraux

#### 3.1.9.1. Rendement en éléments minéraux

La teneur en minéraux de *C. acutifolia* et *C. obovata* (Tableau 3.8) atteint respectivement 11.85% et 12.72% du poids sec. Ces valeurs sont proches de ceux de la Pharmacopée Européenne [60] qui prévoient des valeurs comprise entre 10 et 12%.

La quantité des ions minéraux absorbés est en relation avec les conditions physicochimiques du sol dans lequel vit la plante. La température, l'éclairage et l'aération du milieu peuvent influencer sensiblement les teneurs en minéraux. L'état physiologique interne de la plante (stade de développement, âge, état hormonal) joue également un très grand rôle dans l'absorption des minéraux [33].

De nombreuses plantes médicinales sont très riches en minéraux. Les plantes tirent les minéraux du sol et les transforment en une structure aisément assimilable par l'organisme.

Les minéraux participent activement à l'activité thérapeutique dans l'organisme, ainsi, il est conseillé de consommer les plantes crues tel que la salade ou le chou vert (toutes les crudités) ou, sous forme de compléments nutritionnels, comme le fucus. Les minéraux participent de manière différente à l'effet thérapeutique [25].

Tableau 3.8 : Teneur en éléments minéraux de *C. acutifolia* et *C. obovata*.

Plante	Minéraux (%) par rapport au MS
<i>C. acutifolia</i>	11.85
<i>C. obovata</i>	12.72

### 3.1.9.2. Analyse des éléments minéraux par S.A.A

Les résultats de l'analyse minérale réalisée par la spectrophotométrie d'absorption atomique, tableau 3.9 et (fig. 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 en annexe 1) montrent que *C. acutifolia* et *C. obovata* referment du plomb et du cadmium dans leurs tissus. Ces éléments sont des métaux lourds très toxiques pour la plante. Leur présence dans les tissus végétaux n'exclue pas une éventuelle contamination anthropologique de ces plantes par les métaux lourds.

La teneur en cadmium atteint 0,0047 mg/l et 0,0102 mg/l respectivement chez *C. acutifolia* et *C. obovata*. Alors celui du plomb elle atteint 0,0633 mg/l chez *C. acutifolia* et 0,0952 mg/l chez *C. obovata*.

Ces résultats soulignent que la contamination de *C. acutifolia* et *C. obovata* par le plomb et le cadmium. Le degré de contamination de *C. obovata* dépasse celle de *C. acutifolia*.

La contamination de certaines plantes médicinale durant leur croissance par des métaux lourds n'est pas à exclure. Ces éléments passent du sol vers la plante par translocation racinaire, mais l'absorption transfoliaire joue un rôle non négligeable dans la pollution des plantes [106].

Le passage du plomb des racines vers les tiges se fait par le biais d'une translocation à longue distance via le xylème et le plomb atteint les cellules de la feuille, et s'accumule dans les vacuoles [107].

Les teneurs des ces métaux dans les plantes est conditionnées par la nature géochimique du sol et la capacité des plantes à accumuler ces éléments [108].

Amit, [109], a mis en évidence une éventuelle contamination de *C. fustila* par des métaux lourds. L'accumulation du Plomb et du Cadmium a été maximale notamment dans les fruits.

L'accumulation et la distribution des métaux dans les tissus de la plante est d'une importance capitale pour l'évaluation du rôle des plantes en phytoremédiation [110] [111].

Ainsi, une telle propriété préconise une éventuelle utilisation *C. acutifolia* et *C. obovata* en phytoremédiation. Ainsi, l'utilisation de ces plantes permettrait la dépollution des sites contaminés. Néanmoins, ces résultats doivent être complétés par d'autres études qui détermineraient les causes de la contamination, et confirmeraient ainsi la bioaccumulation des métaux lourds observés dans *C. acutifolia* et *C. obovata*.

Concernant le cuivre, sa teneur chez *C. obovata* et *C. acutifolia* est respectivement de 0,6940 et 0,6646 mg/l (tableau 3.9). Ces valeurs sont inférieures aux besoins de la plante. Ces dernières varient entre 2 et 20 mg /kg de MS. Ce métal est considéré comme un oligoélément. La fonction principale du cuivre semble résider dans son rôle de cofacteur des différentes enzymes d'oxydation tel que la polyphénoloxydase et la superoxydedismutase (SOD) qui détoxiquent les radicaux superoxydes ( $O_2$ ) [24].

La teneur en fer (tableau 3.9) chez *C. abovata* est de 5,0992 mg/kg et chez *C. acutifolia*, elle est de 2,2590 mg/kg. La quantité en fer est importante chez *C. abovata* en comparaison à *C. acutifolia*. Cette différence peut être due éventuellement à des besoins spécifiques à *C. abovata* ou éventuellement une accumulation dans les tissus. Le fer exerce deux fonctions primordiales dans la plante. Il rentre dans la composition de groupements catalytiques de nombreuses enzymes. Ces dernières catalysent les réactions d'oxydo-réduction. En outre, il est nécessaire à la synthèse de la chlorophylle. Le fer est également un constituant de plusieurs oxydases, comme la catalase et les peroxydases. Le fer n'est pas un constituant de la molécule de chlorophylle mais son rôle exact dans la synthèse de la chlorophylle demeure encore quelque peu mystérieux [24].

Tableau 3.9 : Teneurs en métaux lourds chez *C. acutifolia* et *C. obovata*

Teneur mg/kg Plante	Cadmium Cd	Plomb Pb	Cuivre Cu	Fer Fe
<i>C. acutifolia</i>	0,0047	0,0633	0,6646	2,2590
<i>C. obovata</i>	0,0102	0,0952	0,6940	5,0995

### 3.1.9.3. Analyse élémentaire par chromatographie ionique

#### 3.1.9.3.1. Présence des anions

Les résultats (Fig 3.14, 3.15 et 3.16) montrent l'absence des anions suivants : le fluore, le nitrate, le nitrite, le bromure et le phosphate chez *C. acutifolia* et *C. obovata*.

L'absence des ces ions ne peut être expliquée d'une manière logique, car ces éléments doivent exister même à l'état de trace dans le végétal. Le rôle primordial que remplissent ces éléments dans la biosynthèse des nucléotides (cas du phosphate) et des protéines (cas de nitrate et de nitrite) est indiscutable [112].

L'absence des ions nitrates et phosphates peut être expliquée par l'antagonisme exercé par les chlorures sur ces ions.

Une corrélation négative entre la salinité et la concentration en phosphore et en calcium dans les tissus de la plante a été signalée, la salinité induit une diminution de la teneur de ces ions dans les tissus des plantes soumises au stress salin [113].

On note la présence uniquement et en excès des ions sulfates. La teneur en ions sulfates atteint 118,121 mg/l chez *C. obovata* et 510,753 mg/l chez *C. acutifolia*. Ces valeurs dépassent largement celle du chromatogramme témoin qui affiche une valeur de 48,027 mg/l.

*C. acutifolia* et *C. obovata* accumulent en excès les ions chlorures, dont les valeurs atteignent 574,7 mg/l chez *C. obovata* et 600,4 mg/l chez *C. acutifolia*. Ces valeurs dépassent celui du témoin dont la valeur est 46, 16 mg/l.

Le chlore est indispensable dans les réactions photosynthétiques productrices d'oxygène. Le chlore peut remplir deux fonctions principales, il joue le rôle d'un contre-ion qui maintien la neutralité électrique à travers les membranes des cellules de la plante en outre, il est l'un des principaux solutés osmotiquement actifs dans la vacuole. Le chlorure est facilement absorbé et la plupart des plantes l'accumulent à des concentrations largement supérieures à leurs besoins [114].

La présence en excès des ions sulfates et des ions chlorures dans les plantes que nous avons étudié peut être due à un excès du sol en ces éléments. Ainsi, *C. acutifolia* et *C. obovata* les accumulent en quantités importante. Une analyse du sol nous aurait permis de mieux interpréter nos résultats.

### 3.1.9.3.2. Présence des cations

Les résultats de l'analyse élémentaire par chromatographie ionique (fig 3.17, 3.18 et 3.19) montrent la présence, des éléments suivants : sodium, potassium, césium, magnésium chez *C. obovata* et *C. acutifolia*.

Nous avons enregistré l'absence du lithium, et du calcium aussi bien chez *C. obovata* que chez *C. acutifolia*.

La teneur en Na<sup>+</sup> de *C. acutifolia* est de 240,834 mg/l alors que celle de *C. obovata* est seulement de 21,915 mg/l. Cette dernière est inférieure à celle du témoin dont la valeur est de 38,293 mg/l.

La présence d'une concentration élevée en sodium dans les tissus végétaux de *C. acutifolia* signifie que non seulement elle présente une tolérance élevée vis-à-vis de cet ion mais qu'elle l'accumule en grande quantité. Nous pouvons ajouter aussi que la présence du sodium sous forme d'ions libres ou adsorbés en proportions assez élevées dans certains sols est en rapport avec la présence d'halophytes. Ainsi, *C. acutifolia* serait une plante halophyte, éventuellement, les conditions optimales de sa croissance ne sont fournies que par des sols salés [115]. En l'occurrence *C. acutifolia* vit autour des dépressions salées à chlorure de sodium ou à sulfate de calcium tel que les chotts d'Afrique du Nord, à proximité des gisements de sel gemme ou des sources salées.

Le sodium est un microélément essentiel chez les plantes qui possèdent une voie photosynthétique particulière nommée voie en C<sub>4</sub>. Le rôle du sodium dans le métabolisme n'est pas bien élucidé, mais il pourrait intervenir dans le transport du pyruvate, un intermédiaire crucial de la voie en C<sub>4</sub>, celle-ci se produit entre les cellules qui entourent la gaine périvasculaire et les cellules du mésophylle de la feuille [24].

Le potassium K<sup>+</sup> est très élevé chez *C. acutifolia* (393,039mg/l), Cette teneur dépasse largement celle de *C. obovata* (71,944 mg/l). Néanmoins, la valeur en K<sup>+</sup> de *C. obovata* est inférieure à celle du témoin (99,71). Les besoins en potassium sont très importants pour les plantes [116], alors que, le potassium est très souvent en quantité insuffisante dans les sols sableux, d'autant plus qu'il y est facilement lessivé dans le profil. Ainsi, nous suggérons que *C. acutifolia* en comparaison avec *C. obovata* pourrait éventuellement avoir une meilleure maîtrise sur les mouvements d'ouverture ou de fermeture des cellules de gardes des stomates.

Selon Patel et Pandey [113], il existe Une corrélation positive entre le contenu de *C. montana* en sodium et en potassium et la salinité du sol.

La salinité du sol induit une augmentation de la teneur en sodium et en potassium dans la plante. Une corrélation positive entre le rapport K/Na dans la plante et l'élévation de la salinité a été mise en évidence. Ces mêmes auteurs ont souligné une accumulation des ions  $Mg^{++}$  dans les tissus des ces plantes soumises à la salinité [113].

La teneur en césium dans les tissus végétaux ne doit pas dépasser 50 mg/l. Les résultats observés montrent que les teneurs en césium sont élevées chez *C. acutifolia* (167,12 mg/l) et *C. obovata* (158,95 mg/l)

Les mêmes observations sont à signaler quant au  $Mg^{2+}$ , sa teneur dans les tissus végétaux ne doit pas dépasser 49,880 mg/l, alors que *C. acutifolia* en contient 252,427mg/l et *C. obovata* 398,370 mg/l. Ainsi, les teneurs importantes en  $Mg^{2+}$  (321mg/kg) ont été rapportées par Basgel et al., [117] chez *C. angustifolia*.

Chez *C. acutifolia* la teneur en ions ammonium atteint 65,01 mg/l. cette valeur dépasse celle du témoin qui est de 2,57mg/l. La présence des ions ammonium en quantité importante chez *C. acutifolia* peut s'expliquer éventuellement par l'importance du rôle que joue cet élément dans les biosynthèses cellulaires.

Les résultats fournies par la chromatographie ionique montrent que *C. acutifolia* accumule dans les feuilles des éléments minéraux, notamment des sulfates, des chlorures, des ions  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $NH_4^+$  à des teneurs qui dépasse largement celle de *C. obovata*. Cette accumulation prononcée peut être due à une sélectivité vis-à-vis ces éléments.

Des concentrations salines trop fortes dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale. En particulier, vis-à-vis des transporteurs ioniques cellulaires, le sodium entre en compétition avec le potassium et le calcium, et le chlorure avec le nitrate, le phosphate et le sulfate [118].

Une plante développée sur un sol riche en sel doit faire face à la pénétration des sels dans ses tissus. Ce dernier est rejeté ou accumulé par les différents organes, tissus, cellules et compartiments cellulaires.

A l'échelle de la plante entière, les ions chlorures et sodium entrent par les racines, sont véhiculés par la sève xylémique jusqu'aux tiges et aux feuilles. La ils sont soit stockés (plante de type *include*), soit au contraire très peu retenus et revéhiculés par la sève phloémique jusqu'aux racines (Plantes de type *exclude*). Les mécanismes de répartition du sel dans les tissus végétaux sont cependant très peu connus [119].

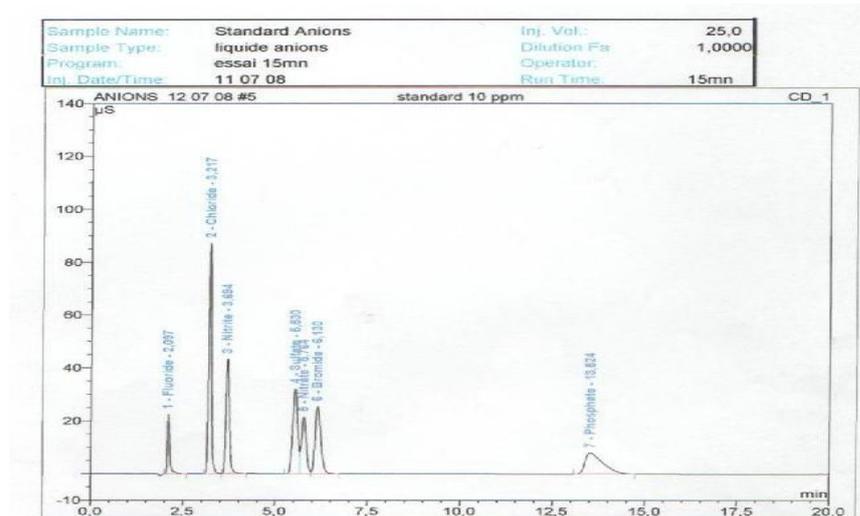
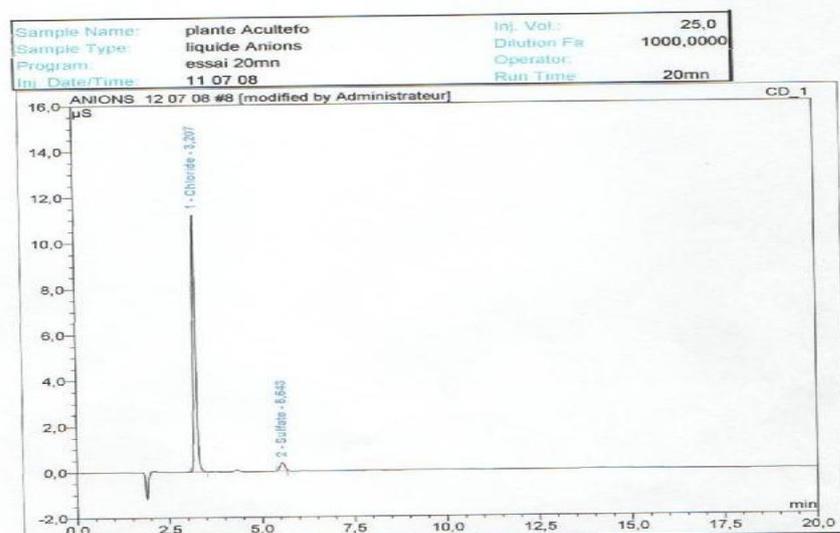


Figure 3.14 : standard anions

Figure 3.15 : Teneur en anions chez *Cassia obovata*

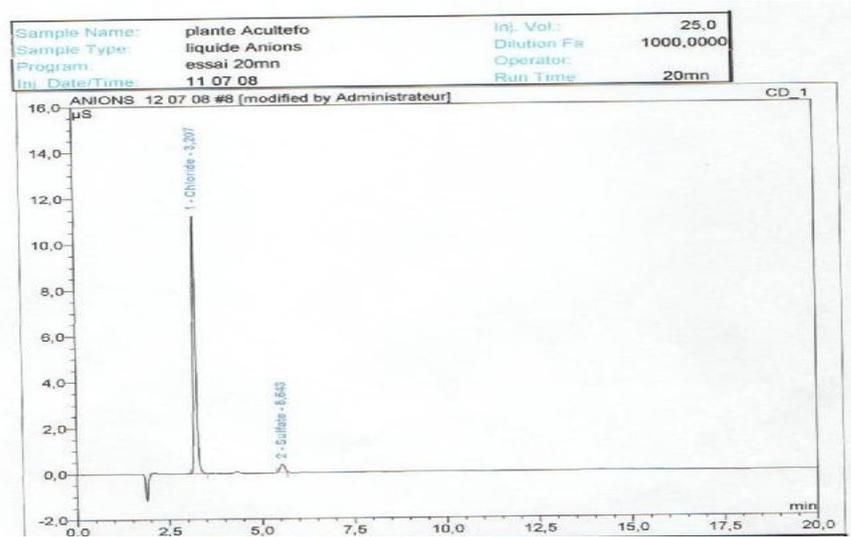


Figure 3.16 : Teneur des anions chez *Cassia acutifolia*

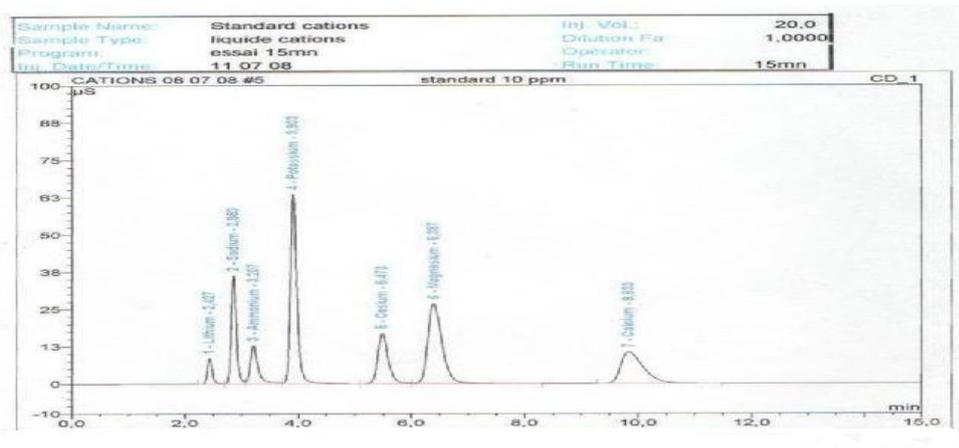


Figure 3.17 : Standard des cations (chromatographie ionique)

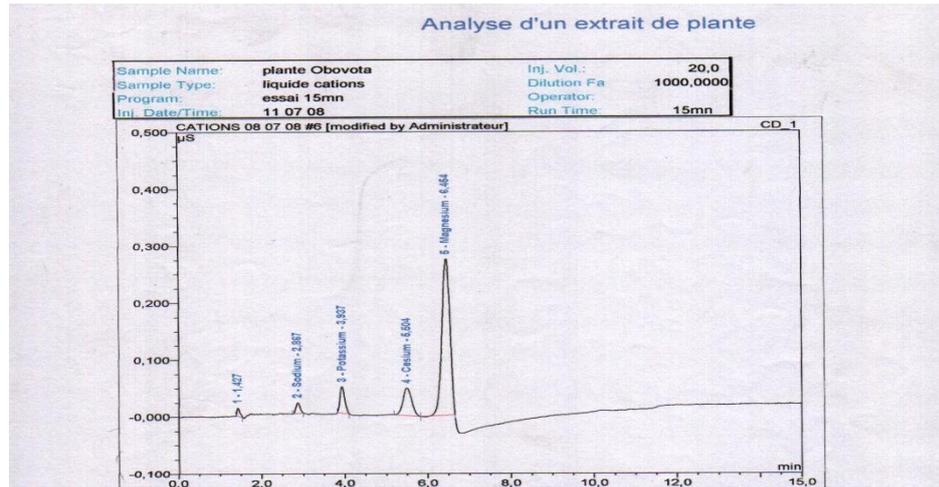


Figure 3.18 : Teneur en cations chez *Cassia obovata*

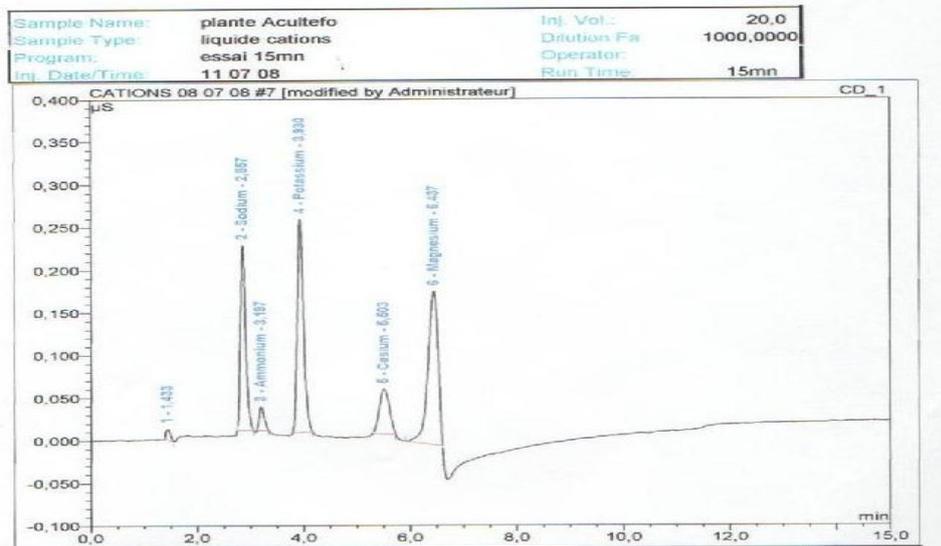


Figure 3.19 : Teneur en cation chez *Cassia acutifolia*

### 3.2. Résultats de l'effet de stress salin et thermique sur la biosynthèse des molécules actives *in-vitro* chez *Cassia obovata*

#### 3.2.1. Effet de la combinaison hormonale sur l'induction de la callogenèse

D'après les résultats du tableau 3.10 le pourcentage de la callogenèse des cals issus des explants foliaires atteint 90% dans le milieu I, 50% dans le milieu II et III et aucune callogenèse n'a été observée dans le milieu IV.

Chez les explants caulinaires, le taux de callogenèse atteint 50%, 70% et 80% respectivement dans les milieux I, II, III et aucune callogenèse n'a été constatée dans le milieu IV. Cependant, ce taux atteint chez les explants racinaires 100% dans le milieu I, II et 90% dans le milieu III. Le milieu IV ne favorise aucune callogenèse.

Le pourcentage de la callogenèse le plus élevé est observé sur les explants racinaires, dans le milieu I et II contenant respectivement la combinaison hormonale (1mg/l 2,4D + 1mg/l kinétine) et (1mg/l 2,4D + 1mg/l BAP).

Le milieu VI contenant la combinaison hormonale (1mg/l ANA+ 1mg/l kinétine) ne favorise aucune callogenèse. Nous remarquons que le pourcentage de la callogenèse varie en fonction de la nature de l'explant et de ses besoins hormonaux.

La plupart des recherches actuelles soulignent que les hormones contrôlent le développement et la morphogénèse par le biais de la régulation de l'expression génétique [120] [121]. Les hormones sont connues pour induire de nombreuses enzymes qui ne sont pas directement impliquées dans la division et l'élongation cellulaire [122].

Tableau 3.10 : Pourcentage des explants callogénèse

Milieu \ Explants	I (1mg/l 2,4D + 1mg/lkinétine)	II (1mg/l 2,4 D + 1mg/lBAP)	III (1mg/l ANA+ 1mg/lBAP)	IV (1mg/l ANA + 1mg/l kinétine)
Foliaire	90	50	50	0
Caulinaire	50	70	80	0
Racinaire	100	100	90	0

### 3.2.2. Effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals

La figure 3.20 montre que les cals issus des explants caulinaires développés sur le milieu I enregistrent le poids frais le plus élevé (3,24 g). Le poids le plus faible (1,26 g) est constaté chez les cals issus des explants racinaires développés sur le milieu III.

Il est à signaler que la masse fraîche des cals subit une diminution en allant du milieu I contenant la combinaison hormonale (1mg/l 2,4D + 1mg/l kinétine) au milieu III qui renferme la combinaison hormonale (1mg/l ANA+ 1mg/l kinétine). Dès lors, il apparaît clairement que c'est le milieu I qui favorise l'hydratation et assure une bonne biomasse fraîche des cals.

Les résultats de la figure 3.21 montrent que les cals issus des explants caulinaires développés sur le milieu II ont enregistré le poids sec le plus élevé (0,245 g). Le poids le plus faible (0,108 g) est enregistré chez les cals issus des explants racinaires développés sur le milieu III.

Les tableaux 3.10, 3.11 et 3.12 en annexe 2 et 3, montrent que la combinaison hormonale n'a pas un effet significatif sur la biomasse des cals issus des explants foliaires. La biomasse moyenne obtenue chez les cals issus des explants foliaires est comparable autant pour le poids frais ( $p = 0,097$ ), que pour le poids sec ( $p = 0,523$ ). La même constatation a été signalée pour les cals issus des explants caulinaires. Les moyennes obtenues sont comparables autant pour le

poids frais ( $p = 0,293$ ) que pour le poids sec, où ces valeurs sont pratiquement égales ( $p = 0,984$ ). Pour les cals issus des explants racinaires, une différence hautement significative est observée entre les poids frais moyens de ces cals ( $p = 0,0017$ ). Cette différence est encore plus accentuée ( $p = 0,0000$ ) pour les poids secs moyens.

Le test de Student-Newman-Keuls (test SNK ci-après) nous montre que le poids frais le plus élevé a été constaté chez les cals des explants racinaires développés sur la combinaison hormonale I (3,02 g) en contre partie les combinaisons II et III enregistrent respectivement 1,26 g et 2,12 g. Nous remarquons de même que le poids sec moyen pour la combinaison hormonale III (0,108 g) est significativement plus faible comparativement aux autres combinaisons hormonales qui donnent des poids comparables (0,23 et 0,24 g). La combinaison hormonale I favorise la callogenèse et procure une bonne croissance notamment celle issus des explants racinaires.

La formation des cals est due à la croissance cellulaire caractérisée par une mitose suivie par une auxèse. Les cytokinines stimulent la division et les auxines favorisent l'élongation cellulaire [123].

L'induction de la callogenèse et la croissance des cals sont favorisées par un équilibre trophique qui assure aux cellules les éléments minéraux indispensables à leur croissance et un équilibre hormonal qui contrôle leur différenciation. Il est clair que la présence d'auxine, joue un rôle important. D'autres hormones, surtout les cytokinines et l'acide abscissique, pourraient bien être impliquée, mais la nature de leur interaction est complexe et n'a pas été clairement déterminée [124].

Plusieurs travaux qui visent à étudier *in vitro* l'effet de la composition hormonale sur la croissance et le métabolisme des cals de certaines espèces végétales ont été réalisés. Ainsi l'incorporation de la L-phénylalanine dans le milieu de culture des cals de *C. fustila* stimule à la fois, la croissance et la production des polyphénols. La croissance maximale des cals et la teneur la plus élevée en polyphénols (acide gallique, anthocyanidines) sont obtenues par l'addition de  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  de L-phénylalanine dans le milieu de culture [125].

Une corrélation négative entre la croissance des cals de *Catharanthus roseus* et la production de métabolites secondaires a été signalée par plusieurs auteurs Pareilleux et Vinas et El-Bahr et *al.*, [126] [127]. Il en est de même pour *Datura stramonium L.* [128].

Lindsey et Yeoman, [129] ont suggéré qu'un taux élevé de croissance, permet la diversification des précurseurs en métabolites primaires impliqués dans la synthèse des métabolites secondaires.

Croissance en %

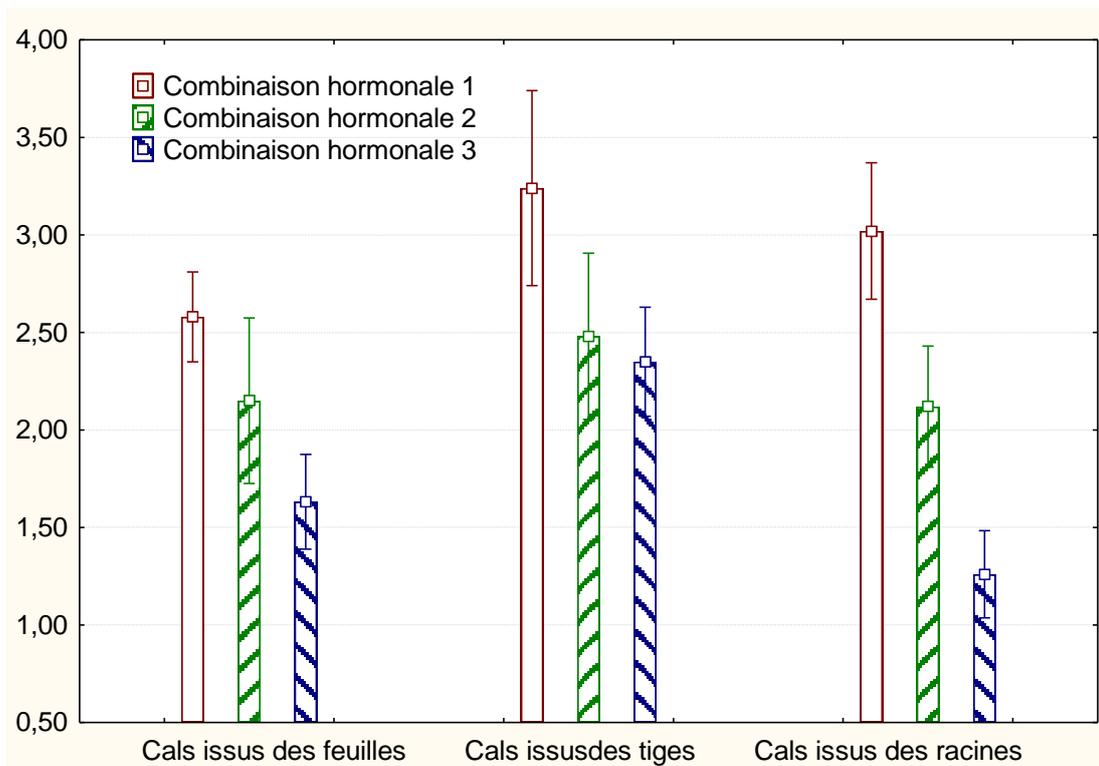


Figure 3.20 : Effet de la composante hormonale sur les variations de Poids frais

( $\bar{x} \pm SEM$  en g) des cals

## Croissance en %

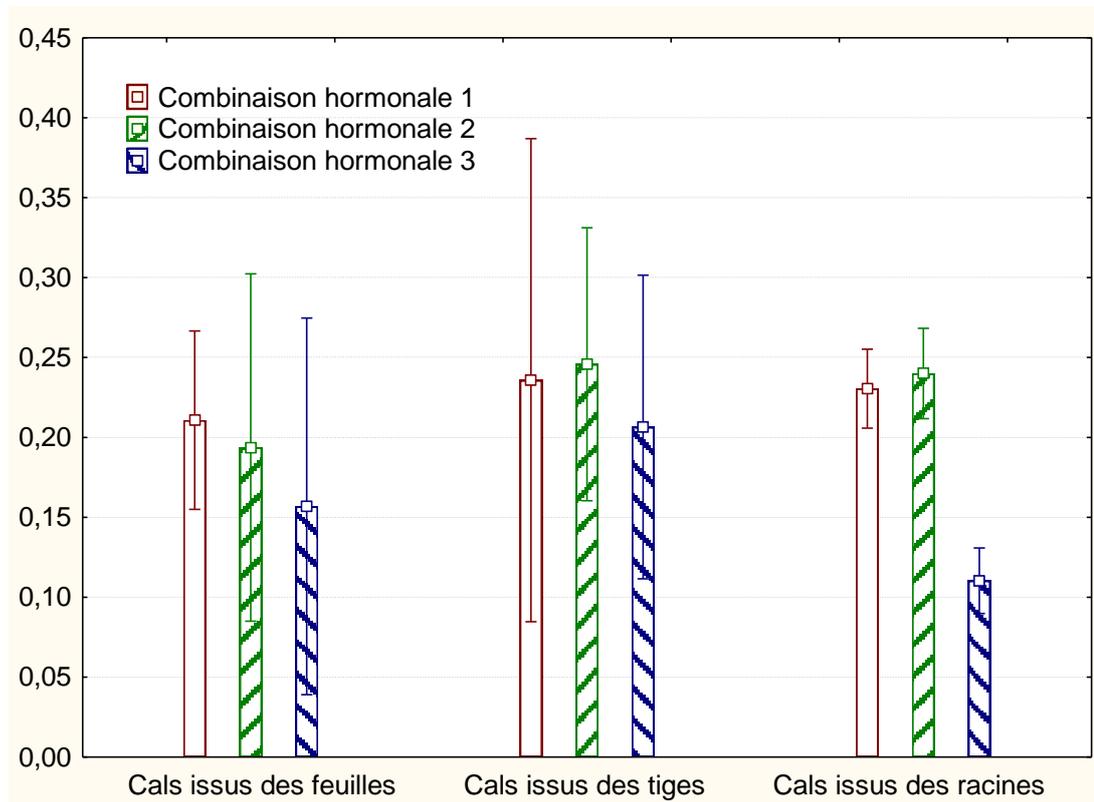


Figure 3.21 : Effet de la composante hormonale sur les variations de Poids sec ( $\bar{x} \pm SEM$  en g) des cals

### 3.2.3. Effet de la combinaison hormonale sur la teneur en sennosides dans les cals

Les figures 3.22, 3.23 et 3.24 montrent que la teneur en sennoside B est élevée dans tous les cals qui se développent dans le milieu I, particulièrement dans les cals issus des explants foliaires. Ces derniers ont enregistré la teneur la plus élevée (2,30  $\mu\text{g}$ ), suivie par les cals issus des explants racinaires (1,48  $\mu\text{g}$ ). La teneur des autres sennosides dans les cals reste constante quelque soit la nature des explants et les milieux sur lesquelles ils se développent.

Les valeurs moyennes globales obtenues sont consignées et détaillées pour chaque sennoside et les calculs sont consignés dans le tableau 3.13 en annexe 5 et annexe 6 et 7. L'étude statistique montre que la teneur en sennosides A ( $p = 0,6367$  selon le type d'hormone et  $p = 0,5742$  selon le type de

cal), C ( $p = 0,6718$  selon le type d'hormone et  $p = 0,6229$  selon le type de cal), D ( $p = 0,7833$  selon le type d'hormone et  $p = 0,9730$  selon le type de cal) et la rhéine-8-glucoside ( $p = 0,9519$  selon le type d'hormone et  $p = 0,9416$  selon le type de cal), ne montrent pas de différences significatives.

Nous remarquons que seule la teneur en sennoside B montre des différences significatives selon le type de l'hormone retenue ( $p = 0,017$ ) et hautement significatives ( $p = 0,0053$ ) selon le type de cal (annexe 8).

La composante hormonale I favorise davantage une bonne croissance et garantit une biosynthèse accrue en sennosides B ( $1,55 \mu\text{g}$  contre  $0,88$  et  $0,89 \mu\text{g}$ ). La biosynthèse des sennosides B est significativement meilleure dans les cals issus des explants foliaires ( $1,68 \mu\text{g}$ ), d'autre part des teneurs de ( $0,63 \mu\text{g}$ ) et ( $1,00 \mu\text{g}$ ) ont été observées respectivement dans les cals issus des explants caulinaires et racinaires.

Nous constatons aussi que la teneur en sennosides B dans les cals issus des explants racinaires et foliaires diminue dans le temps entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> mois de culture. Cette diminution est due à l'effet rétro-inhibiteur exercé par les sennosides largués dans le milieu de culture sur leur propre biosynthèse [70].

Nos résultats corroborent avec ceux Shrivastava et *al.*, [68], qui ont souligné que la concentration en sennosides dans les cultures cellulaires varie selon le type de cellules et la composition chimique du milieu d'une part et selon la nature des hormones exogènes d'autre part. Le milieu qui favorise la meilleure organogenèse et le meilleur développement cellulaire procure automatiquement une meilleure biosynthèse en sennosides.

Selon Shrivastava et *al.*, [68], le stade de développement des cellules est un facteur de régulation important des différentes voies biosynthétiques des métabolites secondaires. Une corrélation négative entre la croissance de *Cinchona ledgeriana in vitro* et la biosynthèse des métabolites secondaires a été mise en évidence par certains auteurs (Godoy-Hernandez et Loyola-Vargas, 1991). [130], Les tissus en division active accumulent peu de substances secondaires [131].

Dans une étude sur les cals de *C. senna*, Rai [132], a rapporté que la production des anthraquinones a été stimulée par l'addition de l'acétate de magnésium, l'acide schikimique, le 2,4D et la kinétine dans milieu de culture. Une

synthèse importante des anthraquinones a été constatée dans la culture cellulaire de *Galium verum* développés sur un polymère adsorbant [133].

Le traitement des cals de *Rheum palmatum* avec le 2-CEPA (éthéphon) augmente la production des dérivés anthraquinoniques, le chrysophanol et l'emodin dans ces derniers [134]. Selon les travaux de Van-der-leer [135], la L-tryptophane inhibe sévèrement la croissance et la production des anthraquinones.

L'effet du saccharose, du 2,4-D, la kinétine et l'acide gibbérellique sur la croissance et la biosynthèse des métabolites secondaires dans les cals de *C. fistula* a été étudié par Subbaiah et al., [136] Le saccharose à des concentrations élevées stimule la croissance et la synthèse des polyphénols. Le 2,4-D et la kinétine à des doses supra optimales l'inhibe. L'initiation de la biosynthèse des polyphénols est influencée par le 2,4-D et la kinétine ; leur accumulation est étroitement dépendante des concentrations en sucres dans le milieu de culture [136].

Selon Subbaiah et al., [136], l'initiation de la callogenèse et la synthèse des polyphénols sont dépendantes de la concentration en auxine dans le milieu, leur accumulation dépend aussi de la phase de croissance des cals.

L'amélioration du milieu de culture par l'addition des précurseurs appropriés stimule la synthèse de certains métabolites secondaires *in vitro* [137].

Les mêmes constatations ont été soulignées *in vivo* par Mahesh et al., [138].

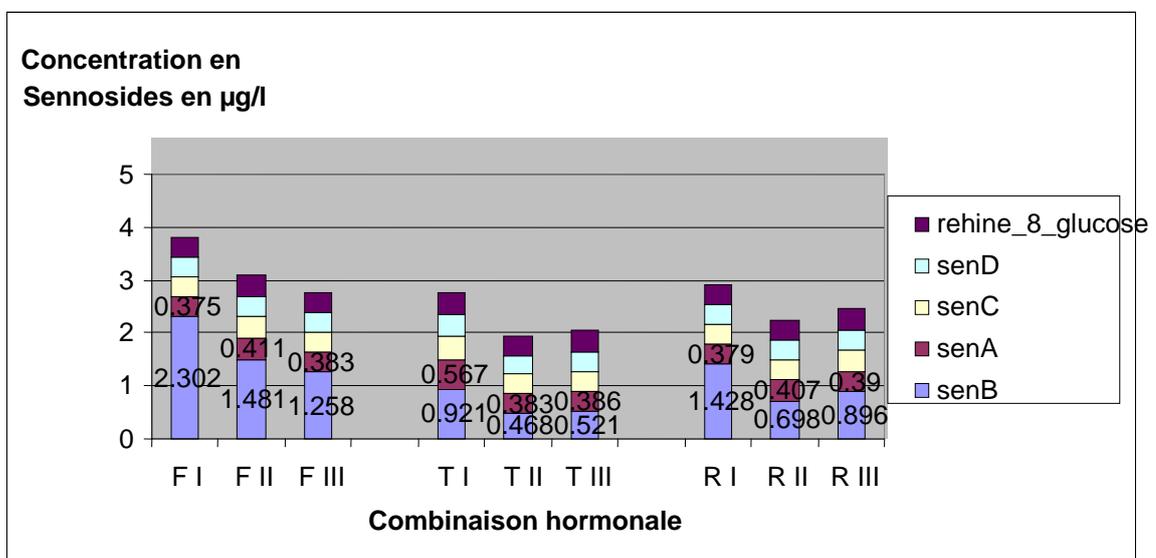


Fig 3.22: Effet de la combinaison hormonale sur la teneur en sennosides

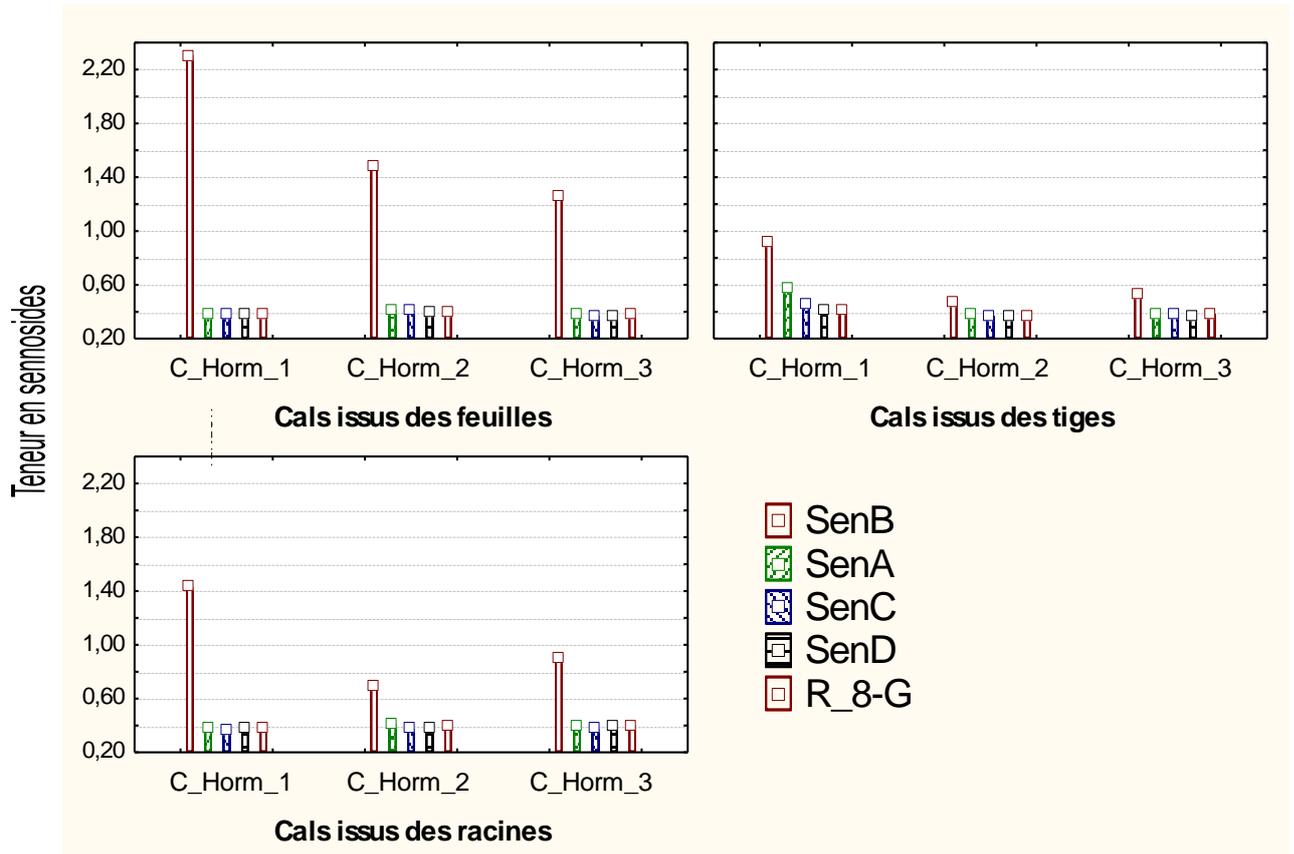


Fig 3.23 : Effet de la combinaison hormonale sur la teneur moyenne en senosides B des différents cals

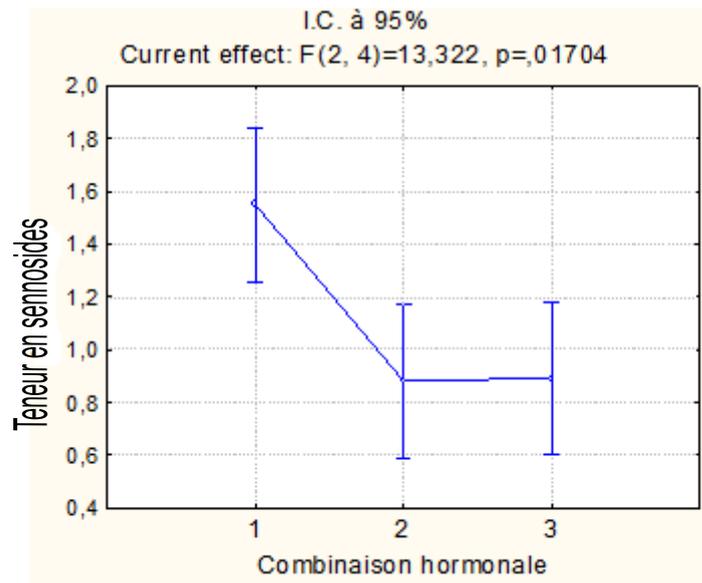


Fig 3. 24 (a) : effet de la combinaison hormonale sur la teneur en senosides B

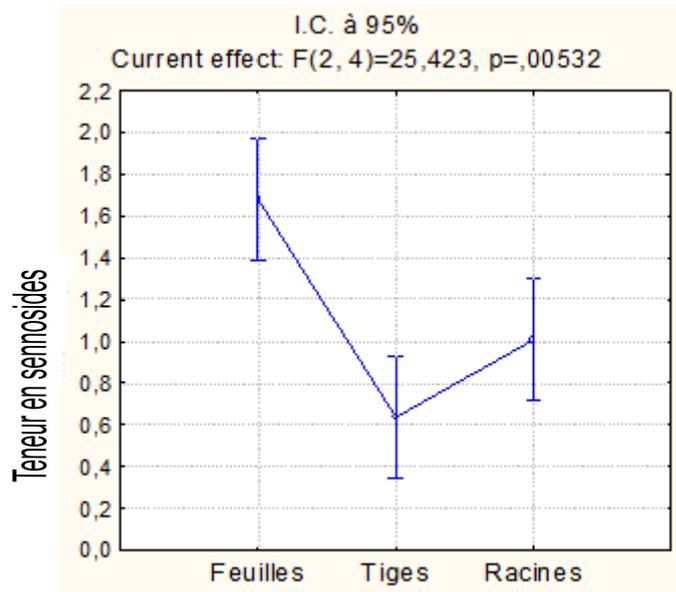


Fig 3.24 (b) : Effet de la nature de l'explant sur la teneur en sennoside B

#### 3.2.4. Effet du stress salin sur la biomasse des cals

Les données illustrés par les figures 3.25 et 3.26 et les tableaux de l'annexe 8, indiquent que les meilleurs rendements en poids frais des cals s'obtiennent dans le milieu sans sel (0% en NaCl).

Le poids frais le plus élevé (5,91g) a été enregistré dans les cals issus des explants racinaires après trois mois de culture suivie par celui des cals issus des explants caulinaires (4,42 g) tout en restant comparables pour les 3 doses en NaCl (0%, 0,5% et 1,0%). Au-delà et pour une concentration de 1% et 1,5%, le poids frais chutent même pour les cals issus des explants racinaires.

La biomasse sèche des cals sans stress salin est meilleure par rapport aux autres traitements. Le poids sec le plus élevé a été constaté chez les cals issus des explants racinaires. Ce dernier atteint 0,236, 0,256 et 0,283 respectivement durant le 1<sup>er</sup>, le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> mois. Par ailleurs, le poids sec des cals issus des explants foliaires est le plus faible, comparativement à celui de cals issus des explants. Il atteint (0,12, 0,16 et 0,20 g) respectivement pour le premier, le deuxième et le troisième mois.

Nous constatons que la salinité entraîne une légère diminution du poids sec des cals comparativement à celle du poids frais. Par ailleurs, les concentrations de 0,5 et 1% montrent un effet faible sur la biomasse sèche des cals des explants racinaires. La biomasse sèche des cals développés sur le milieu contenant du

NaCl à 1,5% subit une diminution nette quelle que soit la nature des cals. Ainsi La salinité affecte la biomasse fraîche et sèche des cals de *C. acutifolia*.

La présence du NaCl à la concentration 1,5% dans le milieu de culture réduit la croissance des cals issus des explants racinaires et cotylédonaire comparativement aux cals témoins (0% NaCl). A la concentration 1,5%, les cals issus des explants racinaires ont enregistré des valeurs élevées en biomasse sèche comparativement aux autres types de cals qui se développent dans les mêmes niveaux de salinité [70]. Selon El Yacoubi et *al.*, [139], le sodium s'accumulerait à deux niveaux cellulaires selon le type de cals : envahissement du cytosol (effet toxique) pour les cals sensibles ou compartimentage vacuolaire pour les cals tolérants. La salinité a provoqué l'accumulation de proline et de sucres solubles dans les cals tolérants inversement aux cals sensibles.

La diminution de la biomasse est due à l'effet inhibiteur de la salinité sur la croissance. Nos résultats concordent avec les travaux réalisés sur différentes plantes [140] [141] [142].

Les fortes concentrations en sel dans le milieu sont liées au stress hydrique. Des concentrations salines élevées génèrent de bas potentiels hydriques dans le milieu, une forme de sécheresse physiologique, qui rendent de plus en plus difficiles l'acquisition d'eau par les tissus végétaux [140]. Des concentrations salines trop fortes dans le milieu provoquent une altération de la nutrition minérale, en particulier, vis-à-vis des transporteurs ioniques cellulaires, le sodium entre en compétition avec le calcium et le potassium, le chlorure avec le nitrate, le phosphate et le sulfate [142].

Il est connu qu'une concentration saline élevée inhibe la croissance et réduit beaucoup de phénomènes physiologiques dans la plante. Les effets toxiques des ions spécifiques et spécialement Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> engendrent des dommages structurels et métaboliques chez les plantes. Bien que le mécanisme précis de l'endommagement ne soit pas encore bien compris, l'excès pourrait provoquer des problèmes membranaires, des inhibitions enzymatiques ou un dysfonctionnement métabolique général [141].

El-Bahr et Ghanem [127] ont constaté une diminution du poids frais et sec des cals de *Vigna sinensis* en fonction du gradient de la salinité dans le milieu de culture. De même, Youssef et *al.*, [143] ont rapporté que la présence des sels dans le milieu de culture réduit la croissance des cals de *Nigella sativa* comparativement à leur croissance dans un milieu sans sels. La croissance cellulaire des cals de *Datura innoxia* a été sévèrement inhibée par le NaCl. Un arrêt de croissance de ces cals a été signalé à la concentration (1%) en NaCl [144]. Ainsi, des concentrations élevées en sels affectent le potentiel hydrique des cellules, les activités physicochimiques, l'intégrité et les fonctions membranaires [145]. Le stress salin provoque un déséquilibre ionique et induit chez les plantes un hyper stress osmotique et un stress oxydatif qui causent des dommages aux protéines, aux membranes et à l'ADN [146] [147] [148].

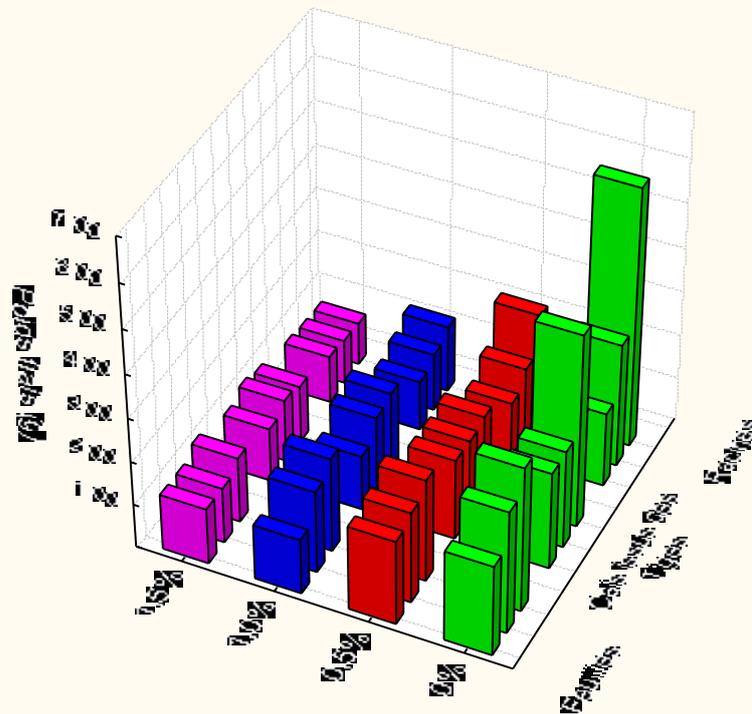


Fig 3.25 : Effet des différentes concentrations en NaCl sur le poids frais des cals durant les trois mois de culture

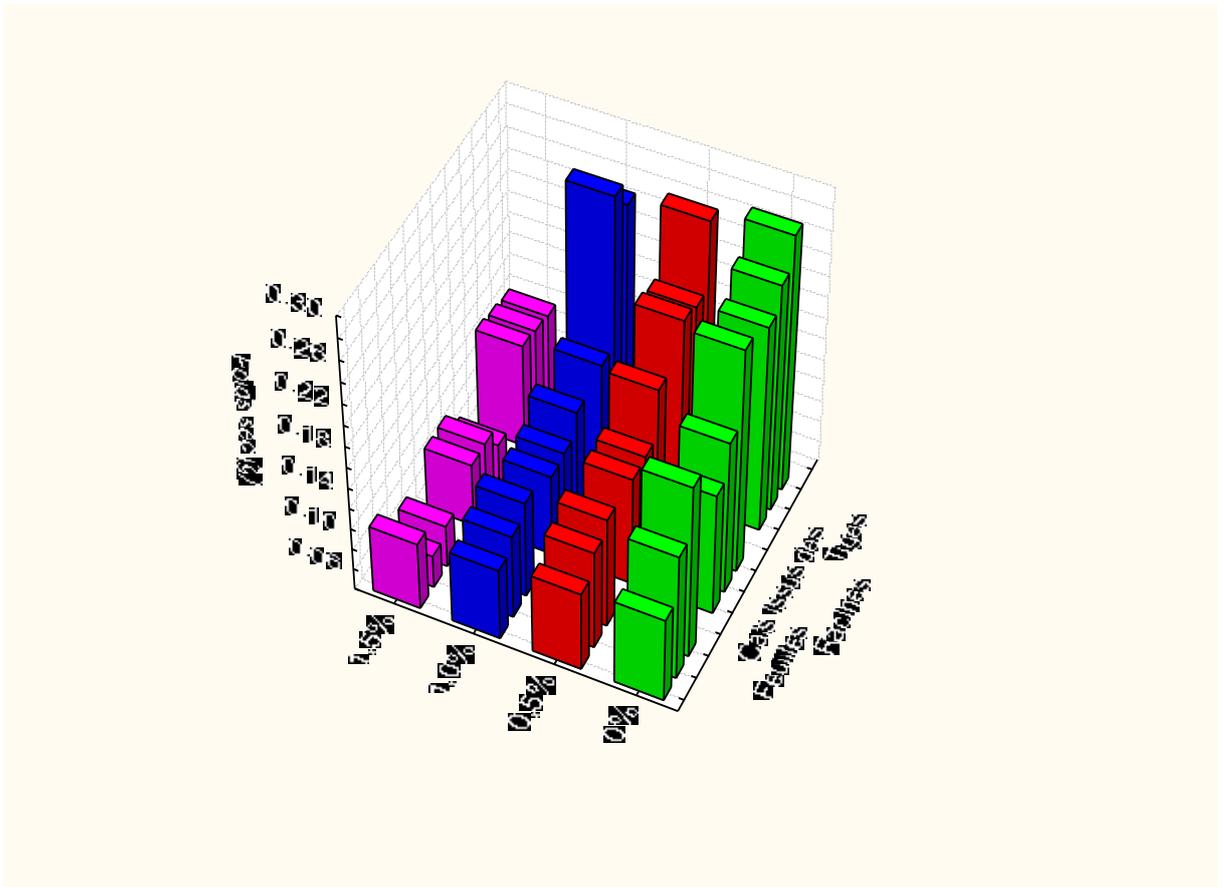


Fig 3.26 : Effet des différentes concentrations en NaCl sur le poids sec des cals durant les trois mois de culture

### 3.2.5. Effet du stress salin sur la teneur en sennosides des cals

Nos résultats obtenus (fig 3.27, 3.28a et 3.28 b et annexe 9 et 10) montrent que la teneur en sennoside B dans les cals soumis à différents niveaux de salinité varie en fonction de la nature de l'explant et le niveau de salinité.

#### 3.2.5.1. Cals issus des explants Foliaires

Les meilleurs rendements en sennosides B s'obtiennent dans les cals développés sur les milieux contenant du NaCl à 0% et 0,5% avec des moyennes de 3,22 à 3,25 µg. D'autre part des moyennes de 1,07 µg et 1,16 µg ont été observées pour les concentrations en NaCl de 1g/l et 1,5 g/l (test SNK ci-après). Chez ces cals, nous pouvons considérer les variances comme comparables (le test de Levene d'homogénéité des variances donne  $p = 0,040$ , annexe 10-1). Le test ANOVA met en évidence une différence très hautement significative entre les différentes concentrations de salinité ( $F=17,787$ ,  $p=0,00067$ ).

### 3.2.5.2. Cals issus des explants caulinaires

L'estimation de la teneur en sennosides B dans ces cals en fonction des différents niveaux de salinité, montre que les teneurs moyennes en sennoside B ne présente aucune différence significative et les variances sont comparables (test de Levene,  $p = 0,273$ , annexe 10-2). Les teneurs moyennes en sennosides B dans les cals restent relativement comparables quel que soit la concentration en NaCl utilisée ( $F=2,223$   $p = 0,1630$ ).

Cependant, si l'on se limite au seul début de période de l'essai, il faut noter que la valeur la plus élevée en sennosides B est obtenue dans les cals développés sur le milieu contenant du NaCl à 0,5%. Les quatre moyennes sont comparables au risque 5%.

### 2.2.5.3. Cals issus des explants racinaires

Les teneurs moyennes en sennosides B dans les cals à différentes concentrations salines montrent une différence très hautement significative ( $F = 36,200$  et  $p = 0,00005$ ). La teneur la plus élevée en sennoside B a été enregistrée dans le milieu contenant du NaCl à 0,5% avec une moyenne de 3,012  $\mu\text{g}$ . Par ailleurs des moyennes de 1,75  $\mu\text{g}$  et 1,697  $\mu\text{g}$  ont été observées respectivement pour les concentrations 0% et 1%.

Globalement et d'une manière générale, les teneurs en sennosides B les plus élevées ont été enregistrées dans les cals développés sur les milieux contenant du NaCl à 0,5% (même si elle reste appréciable pour les cals issus des explants foliaires sans stress). A 0,5%, une chute brutale en sennosides B a été constatée le 3<sup>ème</sup> mois chez les cals issus des explants foliaires (2,242  $\mu\text{g}$ ) et caulinaires (1,389  $\mu\text{g}$ ). Chez les cals issus des explants racinaires, les rendements en sennosides B restent comparables durant toute la période de l'essai (du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> mois).

Le NaCl à la concentration 0,5% stimule la synthèse des sennosides dans les cals provenant des différents explants, notamment dans les cals issus des explants foliaires et racinaires.

Nos résultats concordent avec les travaux de Nazif et Rady [70]. Ces derniers ont souligné que les concentrations en sennosides dans les cals de *C. acutifolia* cultivés en présence de NaCl à 0,5% sont nettement supérieures à celle

enregistrées dans les cals témoins. En l'occurrence, l'addition du NaCl à 0,5% dans le milieu de culture stimule la biosynthèse des sennosides. Néanmoins, les concentrations de 1% en NaCl l'inhibent dans les cals issus des explants foliaires. Cette même concentration provoque une légère augmentation en sennosides B dans les cals issus des explants caulinaires et racinaires. Les concentrations en NaCl qui dépassent 1,5%, affectent la synthèse des sennoside. Les concentrations élevées en NaCl deviennent toxiques pour les cellules et exercent un effet dépressif sur la croissance et le métabolisme cellulaire, entre autres la synthèse des sennosides

Selon Nazif et Rady [70], la teneur en sennosides cellulaire dans les cals de *C. acutifolia* varie dans les cellules et le milieu de culture selon la nature des explants. Le stress salin affecte énormément la production des sennosides dans les cellules des explants provenant de l'hypocotyle et les feuilles cotylédonaires. Les explants racinaires sont modérément touchés par la salinité.

L'effet inhibiteur des concentrations élevées en NaCl sur la biosynthèse des sennosides est selon Arshi et *al.*, [149] du à l'interférence qui s'établit entre Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> avec les enzymes impliqués dans la biosynthèse de ces derniers. Les cellules qui se développent dans un environnement salin subissent un stress osmotique qui résulte de la diminution du potentiel hydrique dans le milieu.

Plusieurs sennosides ont été isolées à partir de la culture *in vitro* des tissus de *C. acutifolia* développés sur des milieux à différents niveaux de salinité [150] [151].

De nombreuses études sur l'accumulation des sennosides dans des cultures cellulaires et sur les facteurs qui influencent leur production tels que les régulateurs de croissance [70], sur la composition du milieu de culture [152] [133], sur l'effet de l'illumination [154] et sur les effets des pathogènes et des éliciteurs fongiques [154] [155] ont été rapportées.

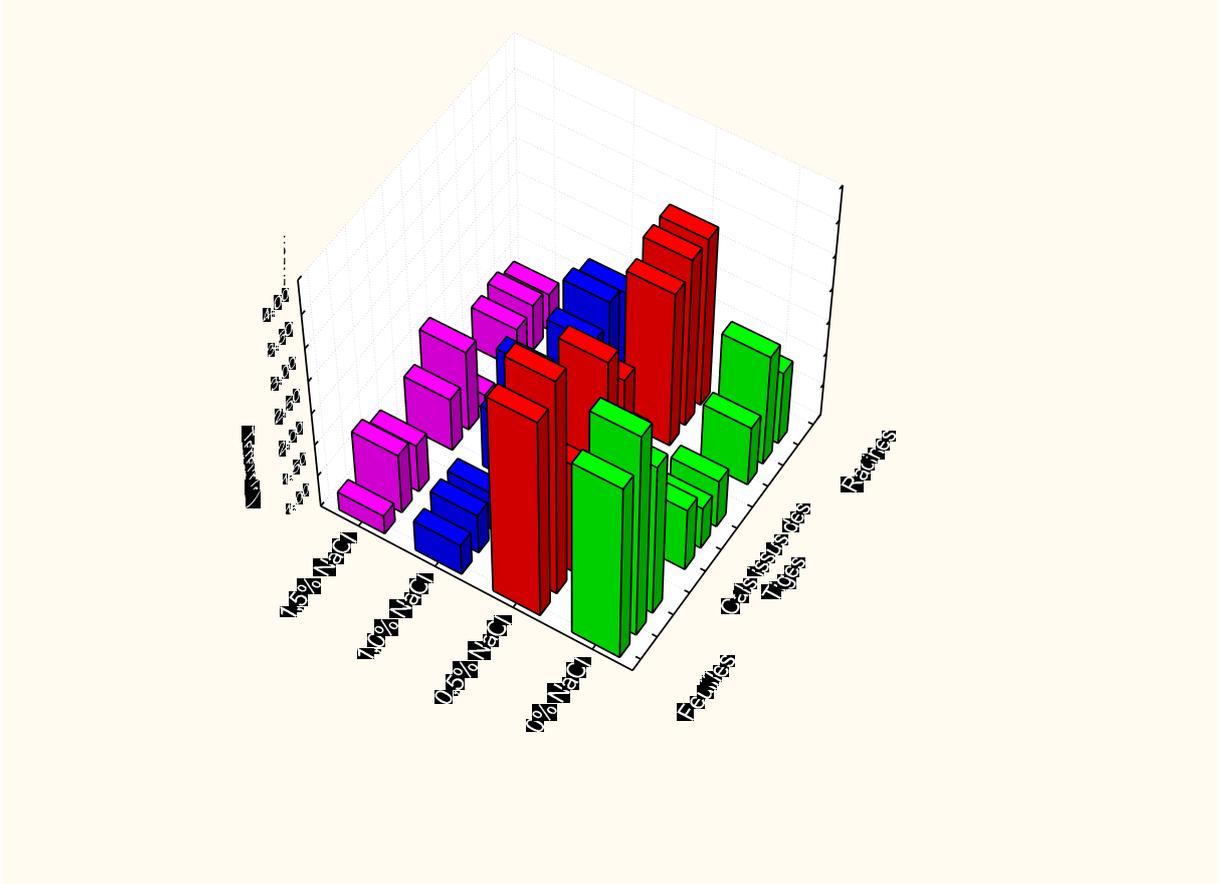


Fig 3.27 : Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en senosides B dans les cals durant les trois mois de culture

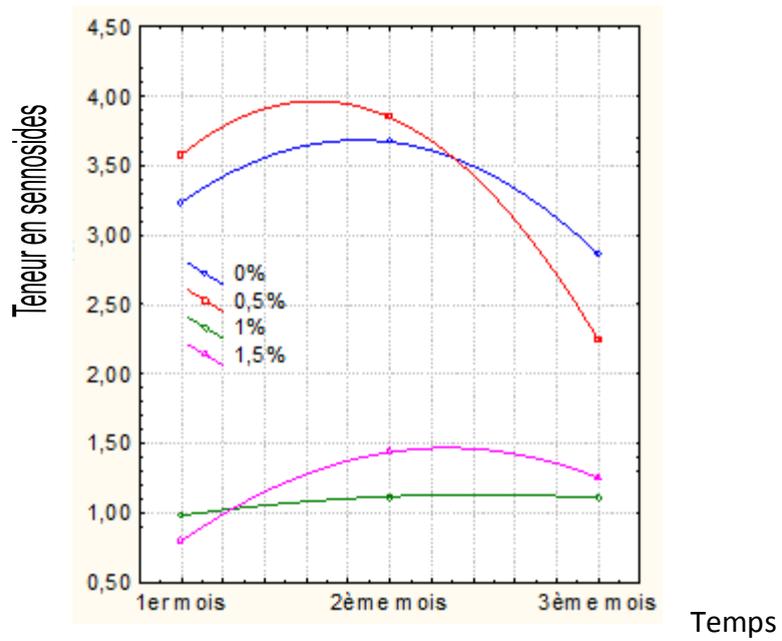


Fig 3. 28 a : Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en senoside B dans les cals issus des explants foliaires

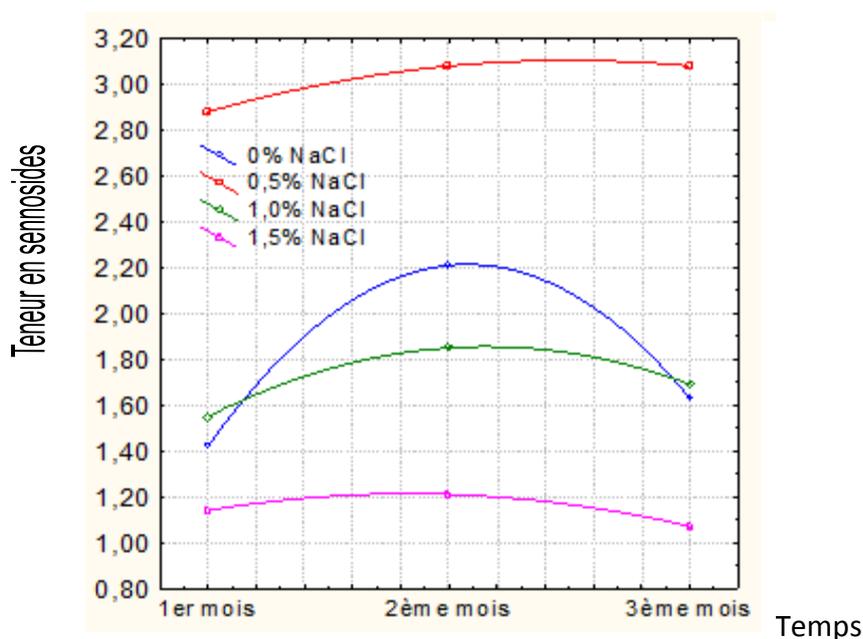


Fig 3.28 b : Effet des différentes concentrations en NaCl sur la teneur en sennoside B dans les cals issus des explants racinaires

### 3.2.6. Effet du stress thermique sur la biosynthèse des sennosides dans les vitroplants de *C. obovata*

#### 3.2.6.1. Teneur en sennosides B dans les organes des vitroplants non soumis au stress thermique

Dans les différents organes des vitroplants non soumis au froid (fig 3.29) (annexe 11 et 12), les sennosides B existent à des teneurs variables. Effectivement, les sennosides B, représentent la fraction la plus importante. Leur teneur dans les feuilles après trois mois (3,82  $\mu\text{g}$ ) est plus importante comparativement à celle des tiges (1,04  $\mu\text{g}$ ) et des racines (1,78  $\mu\text{g}$ ). Cette constatation a été soulignée par Rouibi et *al.*, [63] lors de l'étude phytochimique réalisée sur la même espèce.

Nous avons constaté que le contenu en sennoside B diminue dans la tige et la racine et augmente dans les feuilles. Dans la tige sa teneur passe de 1,27  $\mu\text{g}$  (le 1<sup>er</sup> mois) à 1,04  $\mu\text{g}$  (le 3<sup>ème</sup> mois). Celle des racines, passe de 2,04  $\mu\text{g}$  (le 1<sup>er</sup> mois) à 1,78  $\mu\text{g}$  (le 3<sup>ème</sup> mois). Par ailleurs dans les feuilles la teneur en sennoside B augmente de 2,74  $\mu\text{g}$  à 3,82  $\mu\text{g}$ .

La figure 3.30 montre que la teneur en sennosides B durant le 1<sup>er</sup> mois est la même dans les différents organes de vitroplants. Durant le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> mois de culture, le contenu en sennoside B diminue dans la tige et la racine et augmente dans les feuilles. Cette augmentation peut s'expliquer par une migration de molécules actives à partir des racines vers les feuilles.

Les différences observées ne sont pas significatives (annexe 12). En effet, le dosage des sennosides présente des valeurs comparables dans le temps (du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> mois,  $p = 0,8282$ ) et pour les trois parties du vitroplant (feuille, tige ou racine,  $p = 0,1947$ ). Nous pouvons souligner que la quantité des sennosides B synthétisés dans le vitroplant est la même, mais sa répartition entre les différents organes change entre le 1<sup>er</sup> et le 3<sup>ème</sup> mois de culture.

Teneur en sennosides en  $\mu\text{g/l}$

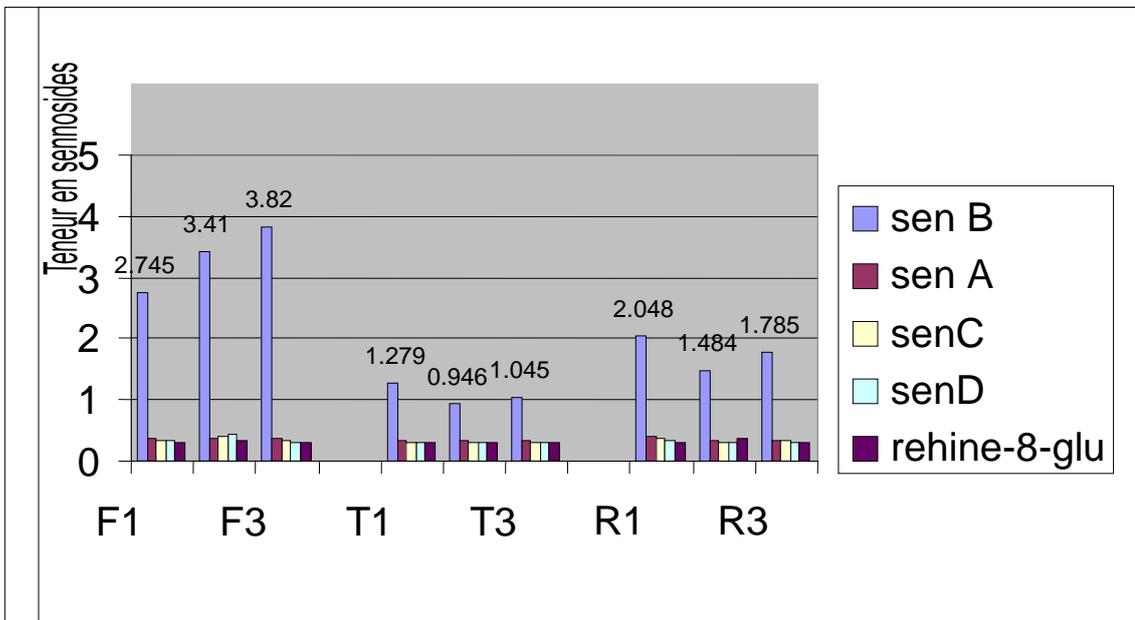


Fig 3. 29 : Teneur en sennosides dans les différents organes des vitroplants non soumis au stress durant les 3 mois de culture.

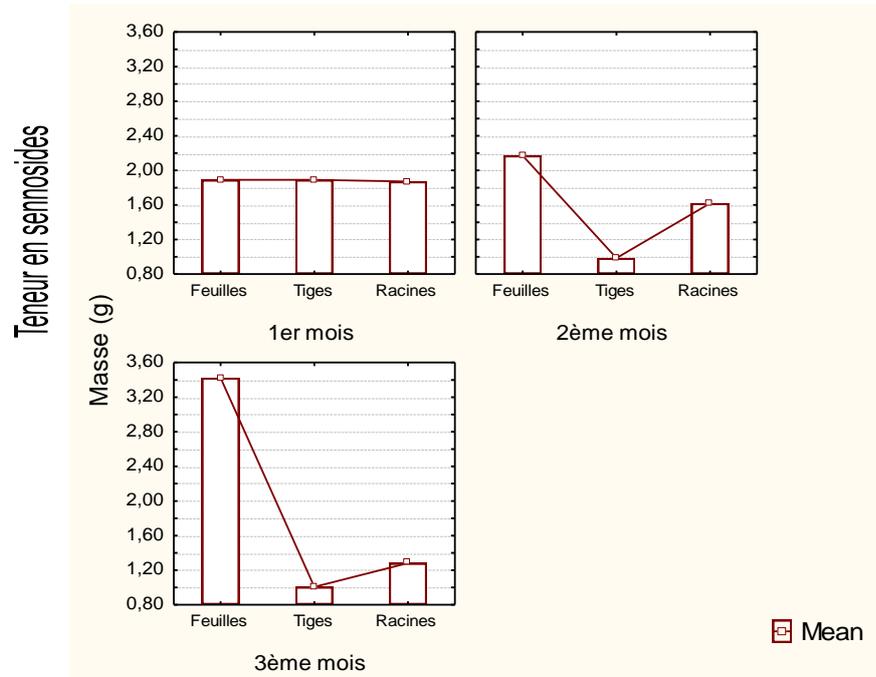


Fig 3. 30 : Variation de la concentration des sennoside B durant les trois mois de Culture.

### 3.2.6.2 Teneur en sennosides B dans les vitroplants soumis au stress thermique

Les résultats du dosage des sennosides dans les différents organes des vitroplants soumis au stress thermique sont mentionnés dans les figures (3.31, 3.32) et les tableaux (3.17, 3.18 en annexe 13 et 14).

Le sennoside B est majoritaire et la teneur des autres sennosides est très faible. Les meilleures valeurs ont été observées chez les feuilles des vitroplants, qui ont enregistré 1,81  $\mu\text{g}$ , 2,17  $\mu\text{g}$  et 3,42  $\mu\text{g}$  respectivement durant le 1<sup>er</sup>, le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> mois de culture.

Les variations de la teneur en sennosides B dans les différents organes de vitroplants, montrent que la teneur augmente dans les feuilles et diminue dans les tiges et les racines. Ainsi ces teneurs varient de (1,89 à 3,42 $\mu\text{g}$ ) pour les feuilles, de (1,89 à 1,00  $\mu\text{g}$ ) pour les tiges, et de (1,87 à 1,28  $\mu\text{g}$ ) pour les racines.

Dans les vitroplants non soumis au stress thermique, la teneur en sennosides B des feuilles dépasse légèrement celle des vitroplants soumis au stress thermique.

Si nous comparons la teneur en sennosides B (avec stress) pour les trois parties de la plante, la différence est hautement significative ( $p = 0,0008$ ) entre les feuilles, tiges et racines (annexe 13 et 14).

La comparaison des moyennes montre que la meilleure teneur en sennoside B (3,82 µg) a été enregistrée dans les feuilles des vitroplants non soumis au stress thermique suivie par celle des feuilles soumises au stress (3.42 µg). Les résultats obtenus montrent que le stress thermique entraîne une diminution de la biosynthèse des sennosides B notamment dans les feuilles et à un degré moindre dans les racines des vitroplants.

Les effets provoqués par le stress thermique sur les vitroplants de bananier ont montré que les températures extrêmes entraînent une augmentation du nombre de plantes présentant un symptôme de stress. Le pourcentage des feuilles nécrosées atteint 38% et 97% respectivement à 34°C et à 7°C [156]. Il en résulte que les températures extrêmes réduisent la hauteur des plantules et influencent l'émission de feuilles, en diminuant leur nombre de manière significative par rapport au témoin.

Les températures extrêmes n'ont aucune influence directe sur la biomasse fraîche. Actuellement, on ne dispose pas d'informations sur les modifications moléculaires et biochimiques liées au désordre provoqué par les températures extrêmes. Chez d'autres espèces, l'application exogène de régulateurs de la croissance végétale a pu limiter les dommages causés par les températures extrêmes [156].

Teneur en sennosides en µg/l

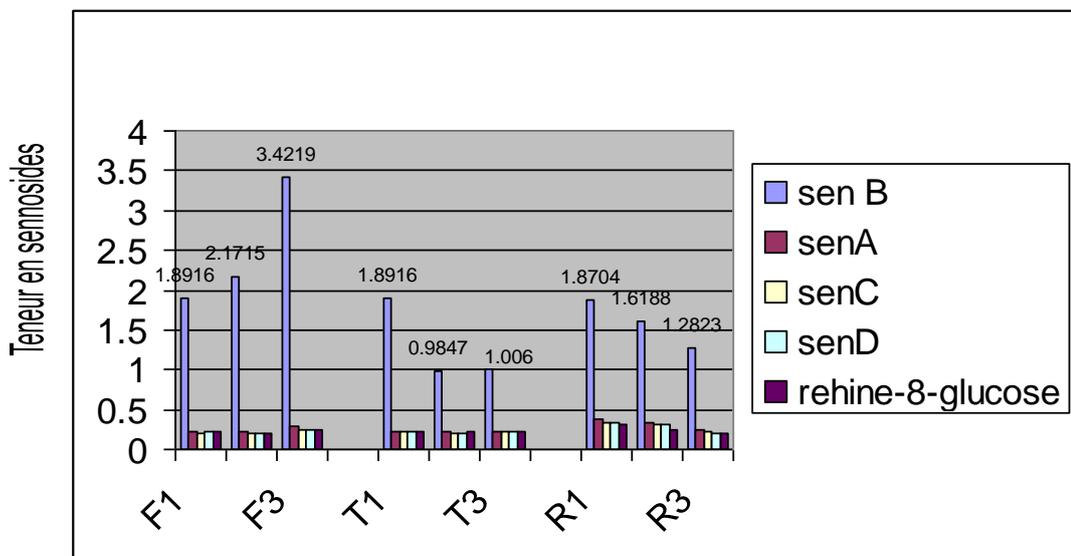


Fig 3.31 : Teneur en sennoside dans les différentes parties des vitroplants soumis au stress thermique

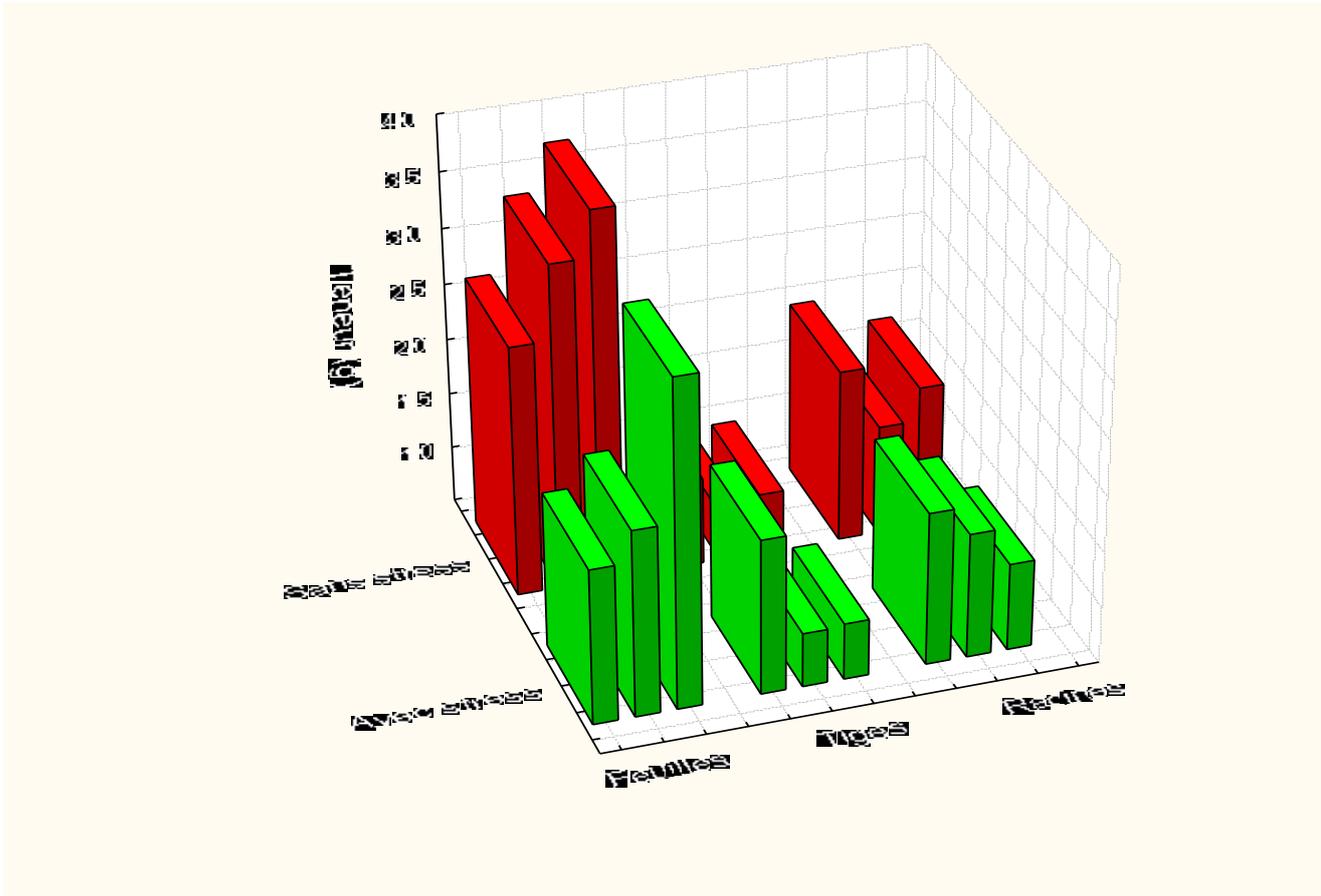


Figure 3.32 : Teneur en sennosides B dans les différents organes de vitropiant soumis et non soumis au stress thermique durant trois mois de culture

### 3.2.7. Effet du stress thermique sur la teneur en sennosides dans les cals

Les résultats de la teneur en sennosides B dans les différents types de cals soumis et non soumis au stress thermique (figure 3.33) sont les suivants.

#### 3.2.7.1. Cals soumis au stress thermique

Les cals des explants foliaires ont enregistré les teneurs les plus élevées en sennosides B (teneur dans les cals issus des explants foliaires de 2,26 µg après trois mois). Les teneurs les plus faibles ont été constatées dans les cals issus des explants caulinaires (0,65 µg).

L'étude statistique a montré que la différence observée est hautement significative entre les cals issus des explants foliaires, caulinaires et racinaires ( $F = 26,53$  et  $p = 0,00105$ , annexe 19).

### 3.2.7.2. Cals non soumis au stress thermique

Les résultats (figure 3.37), montrent que la teneur en sennosides B dans les cals issus des explants foliaires (3,25 µg), et racinaires (1,75 µg) dépasse légèrement celles issus des explants caulinaires (1,29µg). La teneur en sennosides B la plus élevée a été enregistrée dans les cals issus des explants foliaires. Par ailleurs, la diminution en sennosides B était très marquée dans les cals issus des explants caulinaires.

Le test ANOVA, (annexe 18) montre que la différence observée est très hautement significative entre les cals issus des explants foliaires, caulinaires et racinaires ( $F = 34,126$  et  $p = 0,00053$ , annexe 19). Le test SNK montre que les cals des explants foliaires et des explants racinaires, ont la meilleure teneur moyenne en sennoside B. La teneur est donc comparable pour les cals des explants foliaires et racinaires, significativement moindre pour les cals issus des explants caulinaires.

La comparaison des teneurs moyennes (T-test) dans les cals issus des explants foliaires (soumis ou non au stress thermique), montre une différence significative au risque 5% ( $p = 0,034$ ). Le stress thermique entraîne une légère diminution de la teneur en sennoside B dans les cal issus des explants foliaires. La teneur en sennosides B dans les cals issus des explants foliaires non soumis au stress est significativement meilleure (3,26 µg contre 2,26 µg).

Les températures basses entraînent une diminution de la biosynthèse des sennosides dans les vitroplants et les cals.

La biosynthèse des sennosides se fait aussi bien dans les plantules mères que dans les cals qui en dérivent. Ainsi les cellules des cals sont dotées du même potentiel génétique et de la même capacité à synthétiser les métabolites secondaires que ceux de la plante mère [157].

Selon Han *et al.*, [158], le potentiel biosynthétique est du, selon certains auteurs, à la totipotence de la cellule végétale, où chaque cellule est capable de produire la même gamme de métabolites secondaire produite par la plante mère

Par ailleurs les travaux de Shrivastava *et al.*, [68], ont montré que chez *C. senna*, quelle que soit l'origine des cellules obtenues par callogenèse, celles-ci ont le même potentiel physiologique à synthétiser des métabolites secondaires que la

plante cultivée *in vitro*. Les mêmes constatations ont été soulignées chez l'oignon par Collin et al [159].

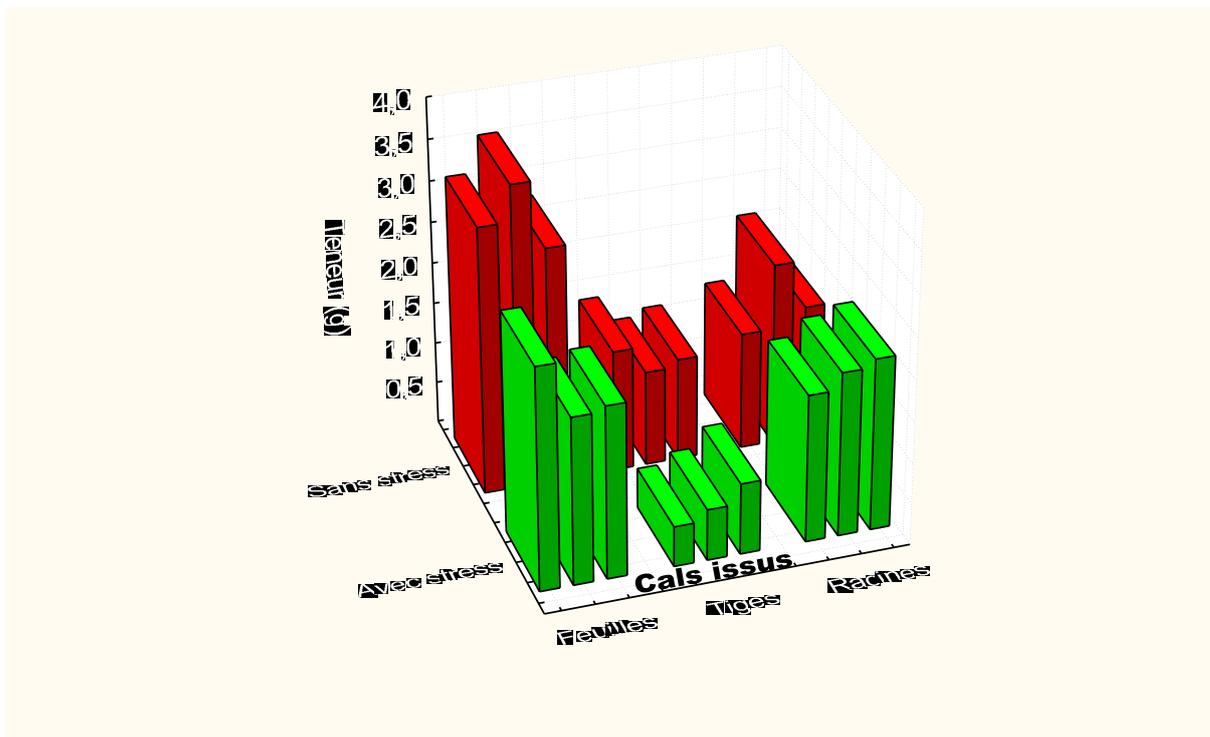


Fig 3.33 : Teneur en sennoside B dans les différents types de cals avec et sans stress thermique durant les trois mois de culture.

## CONCLUSION

Le présent travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes de séné : *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata* ainsi qu'à l'étude de l'effet de la composante hormonale et du stress salin et thermique sur la biosynthèse *in vitro* des molécules active chez *Cassia obovata*.

Cette étude nous a permis de justifier la nécessité de valoriser ces plantes qui, malgré leur usage courant en Algérie, sont restées très faiblement explorées sur le plan de l'investigation scientifique.

Le criblage phytochimique réalisé sur *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata* nous a permis d'identifier les molécules actives existantes. Ainsi, cinq molécules actives responsables de l'effet purgatif ont été identifiées par CCM et confirmées par HPLC chez les deux plantes. Il s'agit des sennosides B, A, C, la rhéine-8-glucose et le sennoside D. Nos résultats ont montré que le sennoside B est majoritaire, sa teneur chez les deux plantes dépasse 74%. La seule fraction détectée par CCL est le sennoside B.

Les huiles essentielles ont été mises en évidence mais à des faibles quantités chez *Cassia acutifolia* et *Cassia obovata*. La CG/MS, nous a permis de connaître et d'identifier leur profil chromatographique. Les principaux constituants des ces huiles sont des composés phénoliques, en l'occurrence le carvacrol et le thymol qui présentent respectivement des teneurs de 43% et 3% chez *C. obovata*, et 30.35 % et 03 % chez *C. acutifolia*.

La présence de certaines molécules qui renforcent l'effet thérapeutique telles que les flavonoïdes et certains minéraux a été décelées. L'analyse quantitative des flavonoïdes révèle leur présence à des teneurs élevées chez les deux plantes. Malheureusement, la caractérisation des flavonoïdes dans les échantillons des deux plantes n'a pas pu être réalisée par HPLC car, ils sont insolubles dans les solvants utilisés.

Par ailleurs le dosage des minéraux a montré la présence chez *C. acutifolia* et *C. obovata* d'éléments dits à l'état de traces comme le plomb et le cadmium. Leur présence dans les deux plantes serait due à une éventuelle contamination par le milieu.

Les résultats de l'analyse élémentaire par chromatographie ionique révèlent l'absence des ions fluorures, nitrates, nitrites, bromures, phosphates et calcium dans les feuilles des deux plantes.

Chez *C. acutifolia* la teneur en ions sulfates est appréciable. Elle est de 510,75 mg/l alors que Chez *C. obovata* elle n'est que de 118,12 mg/l. Néanmoins cette valeur chez *C. obovata* reste élevée en comparaison avec le témoin.

Par ailleurs, la teneur en ions chlorures est sensiblement identique chez sur *Cassia acutifolia* (600mg/l) et *Cassia obovata* (574,7mg/l).

*Cassia acutifolia* accumule des teneurs élevées en sodium (240,83mg/l) et en potassium (393,03mg/l).

L'effet antibactérien de *C. acutifolia* et *C. obovata* varie en intensité selon la sensibilité des souches testées. Ainsi, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* et *P. aeruginosa* sont considérées comme des souches sensibles à l'huile essentielle et à l'extrait éthanolique à 2g/20ml, alors que *Pseudomonas sp* et *E. coli* sont sensibles uniquement à l'extrait éthanolique à 2g/ 20ml. Toutefois, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcesens* et *Klebsiella pneumoniae* ne manifestent aucune sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle et/ou de l'extrait éthanolique.

*Il est à souligner que Candida albicans* ne manifeste aucune sensibilité vis-à-vis de l'huile essentielle et/ou de l'extrait éthanolique.

Nous pouvons dire que *C. acutifolia* et *C. obovata* présentent plusieurs molécules qui correspondraient aux effets laxatifs indiqués dans la bibliographie. En effet *C. acutifolia* et *C. obovata* se caractérisent par leur richesse en composés phénoliques. En outre, ces molécules sont recherchées sur le plan thérapeutique en raison de leur effet antioxydant, anti-cancérigène, antimicrobien et anti-inflammatoire.

Les essais réalisés dans ce travail ont montré que *C. obovata* manifeste des facultés callogènes. Le milieu approprié est celui de Marashige et Skoog auquel est additionnée une combinaison hormonale (1mg/l 2,4D + 1mg/l kinétine). Ce milieu procure un bon rendement en biomasse des cals et stimule par ailleurs la biosynthèse des sennosides, notamment les sennosides B. Ces mêmes essais montrent que la teneur en sennosides B varie selon la nature des explants callogènes. La teneur en sennosides B semble plus élevée dans les cals issus des explants foliaires, alors qu'elle est moyenne à faible dans les cals issus d'explants racinaires et caulinaires.

Il convient de souligner également que la salinité réprime la croissance des cals. Les meilleurs rendements en poids frais et sec s'observent dans les cals non soumis au stress salin. La meilleure biomasse a été constatée chez les cals issus des explants racinaires en comparaison avec les cals issus des explants caulinaires et foliaires.

Il est intéressant de noter que la salinité modérée peut exercer une action inductrice sur la synthèse des sennosides. En effet les rendements en sennosides B sont appréciables pour les trois types de cals dans les milieux contenant du NaCl à 0,5%.

Quand à l'étude de l'effet du stress thermique, nos résultats montrent que les basses températures (4°C) entraînent une diminution de la biosynthèse des sennosides B dans les cals et les vitroplants.

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que nos résultats sur la callogénèse peuvent ouvrir des perspectives quant à la valorisation et à l'exploitation de nos espèces végétales présentant un intérêt économique et pharmaceutique. Ainsi, l'équilibre hormonal, l'effet de doses convenables en NaCl et la maîtrise de certaines conditions de culture peuvent produire des biomolécules dans des conditions compétitives. L'optimisation de production de métabolites secondaires passe par la connaissance non seulement des chemins métaboliques secondaires, mais aussi des interactions entre métabolismes primaire et secondaire, ainsi que les facteurs extérieurs qui agissent sur leur biosynthèse. La culture *in vitro* de cellules végétales ou de tissus végétaux différenciés permet de contrôler une large gamme de paramètres contrairement à une culture en serre ou en champ. La recherche sur le métabolisme des plantes est ainsi facilitée et la mise au point de procédés industriels visant de hauts rendements en métabolites secondaires devient possible.

La disponibilité de ces biomolécules peut dans un avenir proche satisfaire les besoins des industries pharmaceutiques et agroalimentaires.

**APPENDICE A**  
**LISTE DES ABREVIATIONS**

2,4 D	Auxine de synthèse
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANA	Acide naphthalène acétique
ATCC	American Type Culture Collection (catalogue de microorganismes)
BAP	6 Benzyl amino purine
<i>C. obovata</i>	<i>Cassia obovata</i>
<i>C. acutifolia</i>	<i>Cassia acutifolia</i>
cm	Centimètre
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CG/SM	Chromatographie en phase gazeuse- spectrophotométrie de masse
°C	Degrés Celsius
CCM	Chromatographie sur couche mince
CCL	Chromatographie sur colonne
ClO <sub>4</sub> H	Acide perchlorique
CRD	Centre de Recherche et de Développement
Φ	Diamètre
g	Gramme
EtOH	Éthanol
ENARP	Entreprise nationale de reproduction des plantes
HCl	Acide chlorhydrique
HE	Huile essentielle
HD	Hydrodistillation
HPLC	High performance liquid chromatography
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Acide sulfurique
HNO <sub>3</sub>	Acide nitrique
INRF	Institut National de Recherche Forestière
ml	Millilitre
mm	Millimètre
Mm	Masse moléculaire
MeOH	Méthanol
MS	Murashige et Skoog
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
PA	Principe actif
pH	Potentiel d'Hydrogène
Ph.Eur	Pharmacopée Européenne
ppm	Parties Par Million
Rf	Rapport Frontal
S	Seconde
SEM	Standard error of mean
SIDA	Syndrome d'Immuno-Déficiences Acquises
SNK	Test de Student-Newman-Keuls
UV	Ultra violets

## APPENDICE B

### IDENTIFICATION DES MINERAUX

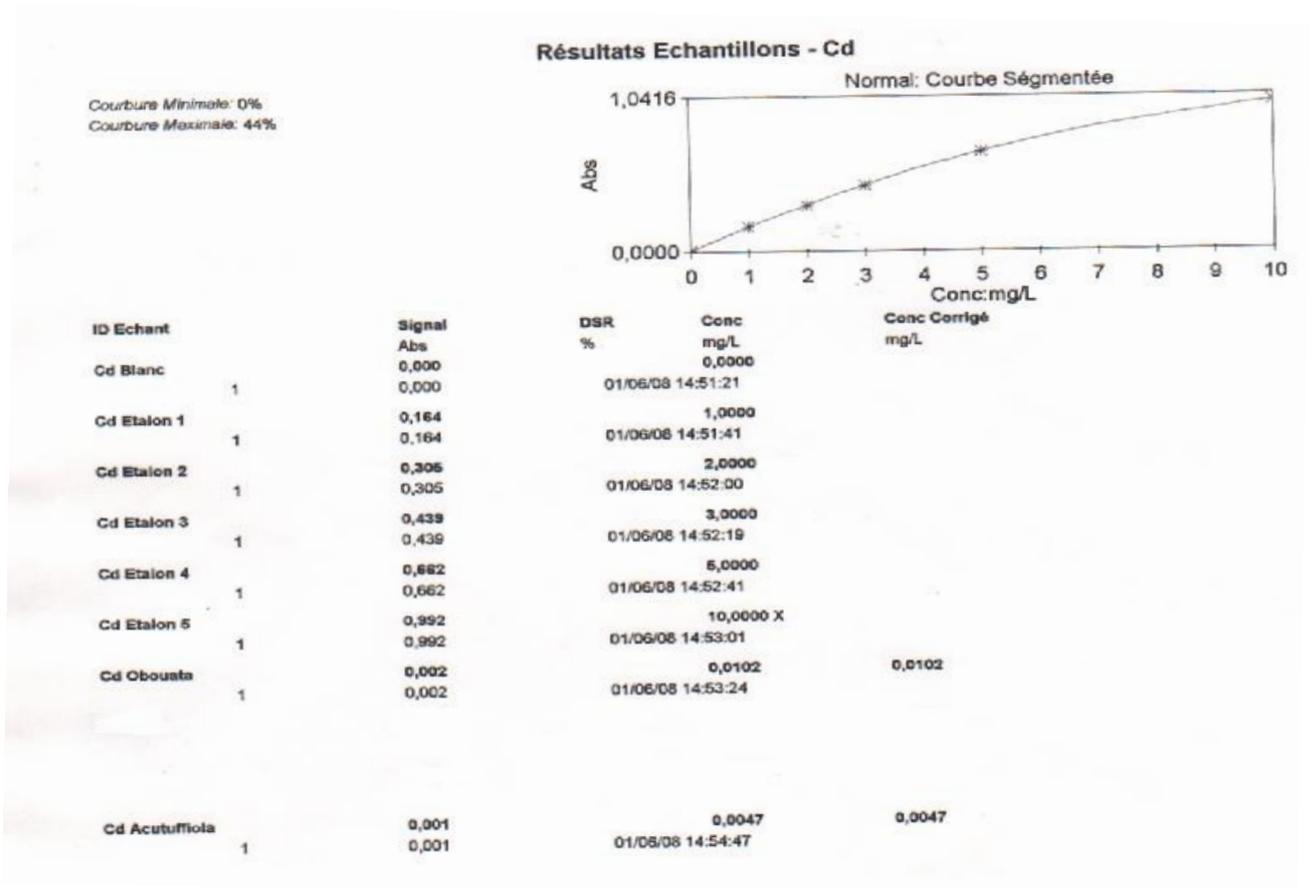
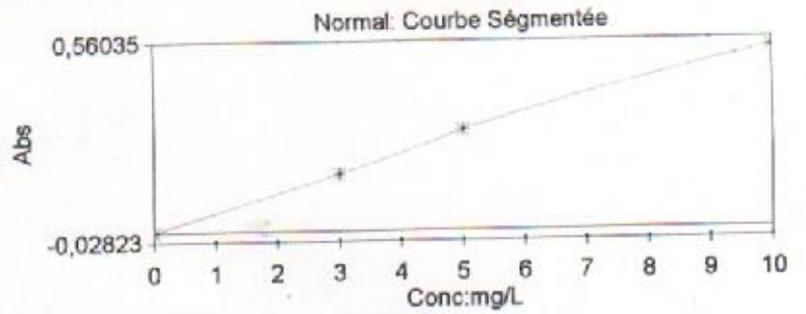


Fig 3.14 : Teneur en cadmium chez *C acutifolia* et *C obovata*

Courbure Minimale: -6%  
 Courbure Maximale: 11%

### Résultats Echantillons - Cu

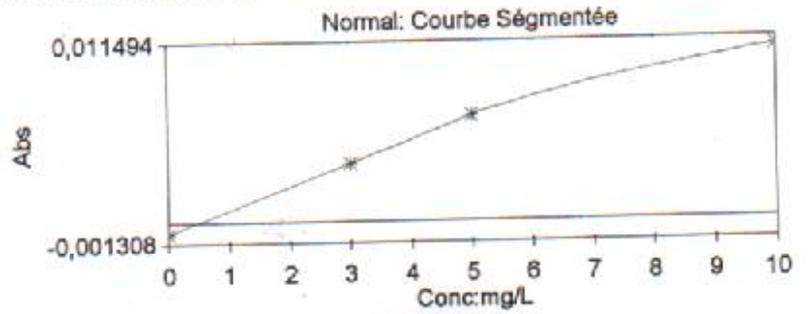


ID Echant	Signal Abs	DSR %	Conc mg/L	Conc Corrigé mg/L
Cu Blanc	-0,001		0,0000	
	-0,001	01/06/08 14:59:38		
Cu Etalon 1	0,165		3,0000	
	0,165	01/06/08 15:00:00		
Cu Etalon 2	0,292		5,0000	
	0,292	01/06/08 15:00:24		
Cu Etalon 3	0,534		10,0000	
	0,534	01/06/08 15:00:48		
Cu Obouata	0,037		0,6940	0,6940
	0,037	01/06/08 15:01:14		
Cu Acutifolia	0,035		0,6646	0,6646
	0,035	01/06/08 15:02:24		

Figure 3.15 : Teneur en cuivre chez *C. acutifolia* et *C. obovata*

Courbure Minimale: -1%  
 Courbure Maximale: 36%

### Résultats Echantillons - Fe



ID Echant	Signal Abs	DSR %	Conc mg/L	Conc Corrigé mg/L
Fe Blanc	-0,001		0,0000	
1	-0,001	01/06/08 14:44:00		
Fe Etalon 1	0,004		3,0000	
1	0,004	01/06/08 14:44:23		
Fe Etalon 2	0,007		5,0000	
1	0,007	01/06/08 14:44:49		
Fe Etalon 3	0,011		10,0000	
1	0,011	01/06/08 14:45:13		
Fe Obovata	0,007		5,0892	5,0892
1	0,007	01/06/08 14:45:40		
Fe Acutifolia	0,003		2,2590	2,2590
1	0,003	01/06/08 14:47:05		

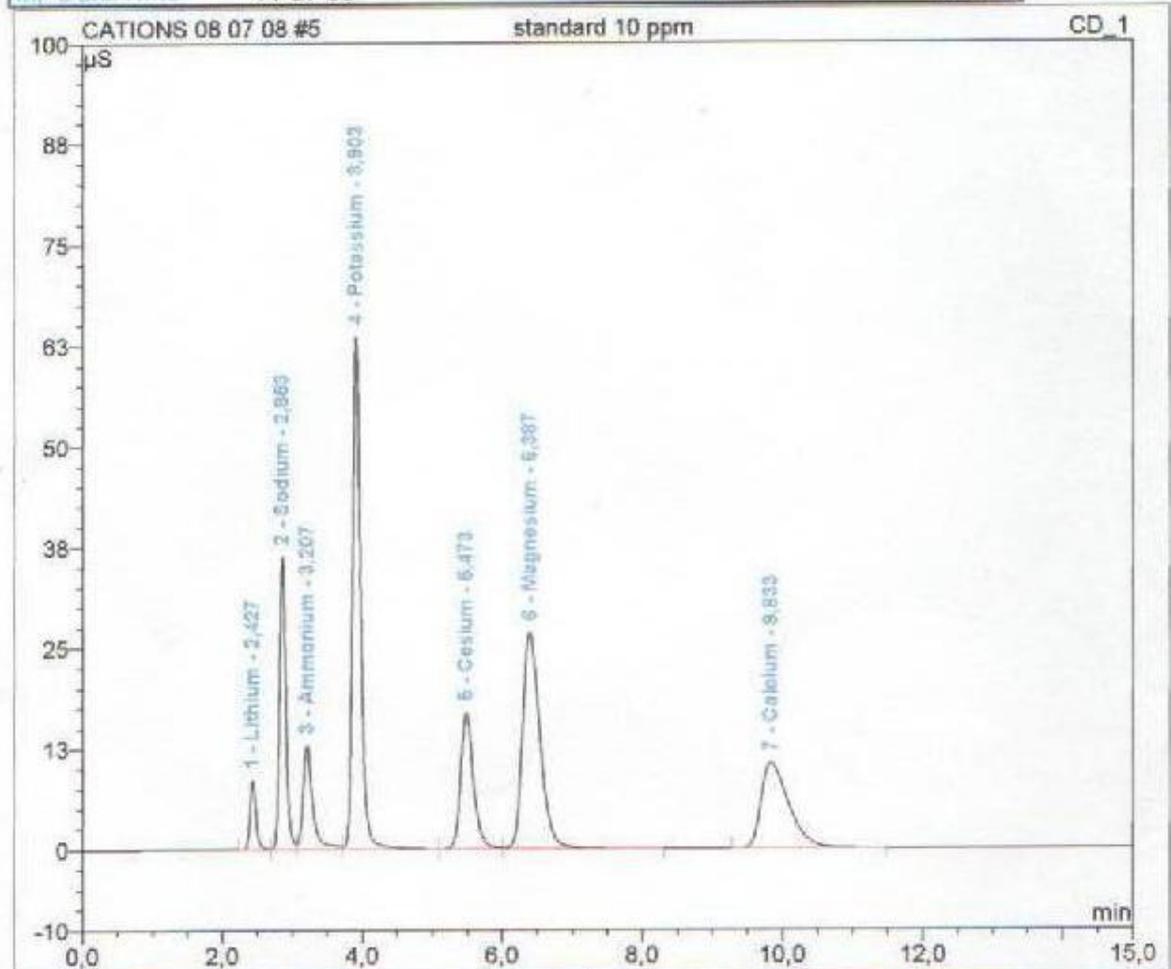
Fig 3.16 : Teneur en fer chez *C. acutifolia* et *C. obovata*

### Résultats Echantillons - Pb

ID Echant	Signal Abs	DSR %	Conc mg/L	Conc Corrigé mg/L
Pb Echantillon 10	0,001	7,2	0,0079 C	0,0079 C
1	-0,001	01/05/08 10:05:54		
2	-0,002	01/06/08 10:05:59		
Pb Echantillon 11	-0,001	10,1	0,0092 C	0,0092 C
1	-0,001	01/05/08 10:09:20		
2	-0,002	01/06/08 10:09:24		
Pb Echantillon 12	-0,001	4,6	0,0051 C	0,0051 C
1	-0,001	01/06/08 10:09:44		
2	-0,002	01/06/08 10:09:49		
Pb Echantillon 13	-0,001	13,3	0,0292 C	0,0292 C
1	-0,001	01/05/08 10:10:10		
2	-0,001	01/05/08 10:10:14		
Pb Echantillon 14	-0,001	1,8	0,0102 C	0,0102 C
1	-0,001	01/06/08 10:10:37		
2	-0,001	01/06/08 10:10:41		
Pb Echantillon 15	-0,001	9,1	0,0105 C	0,0105 C
1	-0,001	01/06/08 10:11:02		
2	-0,001	01/06/08 10:11:06		
Pb Echantillon 16	-0,001	31,1	0,0151 C	0,0151 C
1	-0,001	01/06/08 10:11:28		
2	-0,002	01/06/08 10:11:32		
Pb Echantillon 17	-0,001	6,9	0,0147 C	0,0147 C
1	-0,001	01/06/08 10:11:52		
2	-0,001	01/06/08 10:11:56		
Pb Echantillon 18	-0,001	16,2	0,0172 C	0,0172 C
1	-0,001	01/06/08 10:12:15		
2	-0,001	01/06/08 10:12:19		
Pb acutifolia	-0,000	10,7	0,0633 C	0,0633 C
1	-0,000	01/06/08 10:12:50		
2	-0,001	01/06/08 10:12:55		
Pb obovata	0,000	0,9	0,0952	0,0952
1	0,000	01/06/08 10:14:40		
2	0,000	01/06/08 10:14:45		

Fig 3.17 : Teneur en plomb chez *C. acutifolia* et *C. obovata*

Sample Name:	Standard cations	Inj. Vol.:	20,0
Sample Type:	liquide cations	Dilution Fa:	1,0000
Program:	essai 15mn	Operator:	
Inj. Date/Time:	11 07 08	Run Time:	15mn



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height µS	Area µS*min	Ref. Area %	Amount mg/l	Type
1	2.43	Lithium	8,548	0,857	2,72	9,823	BM
2	2.85	Sodium	36,292	3,859	12,26	38,293	M
3	3.21	Ammonium	12,932	2,086	6,63	46,901	M
4	3.90	Potassium	63,556	8,543	27,14	99,717	M
5	5.47	Cesium	16,869	3,594	11,42	50,368	M
6	6.39	Magnesium	26,825	7,742	24,59	49,880	MB
7	9.83	Calcium	10,555	4,799	15,24	100,171	BMB
<b>Total:</b>			175,577	31,481	100,00	395,253	

Fig 3.18 : Standard des cations (chromatographie ionique).

### Analyse d'un extrait de plante

Sample Name:	plante Obovota	Inj. Vol.:	20,0
Sample Type:	liquide cations	Dilution Fa	1000,0000
Program:	essai 15mn	Operator:	
Inj. Date/Time:	11 07 08	Run Time:	15mn

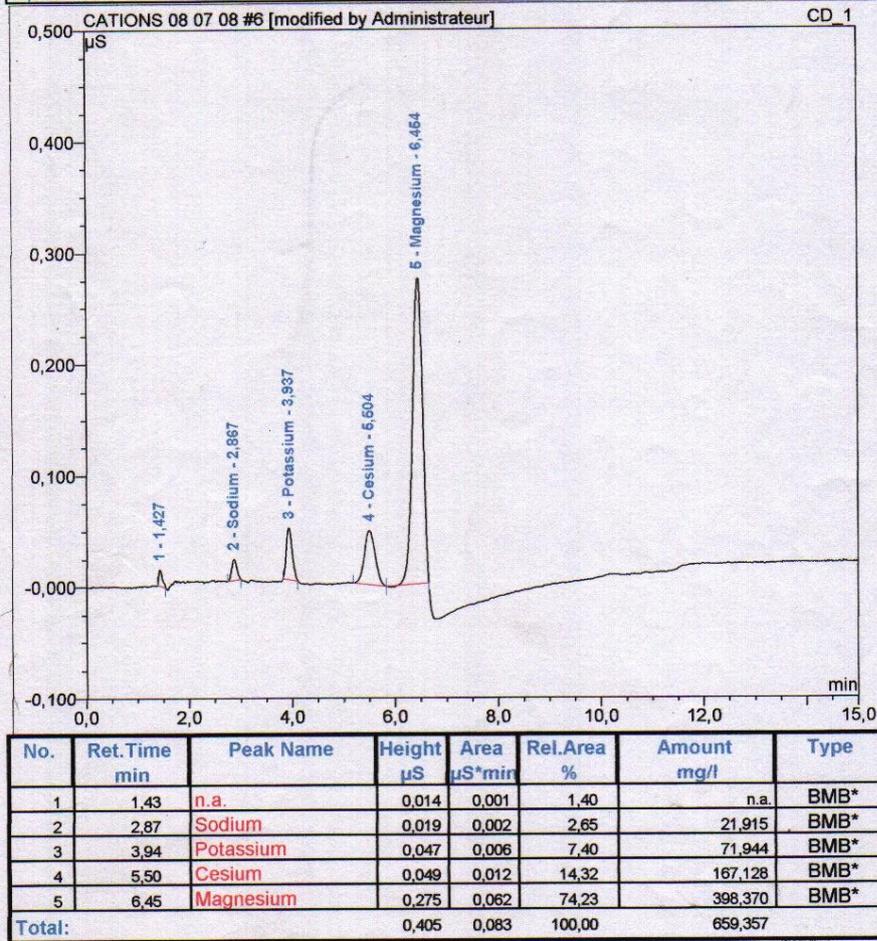


Fig 3.19 : Teneur en cations chez *Cassia obovata*

Sample Name:	plante Acutefo	Inj. Vol.:	20,0
Sample Type:	liquide cations	Dilution Fa	1000,0000
Program:	essai 15mn	Operator:	
Inj. Date/Time:	11 07 08	Run Time:	15mn

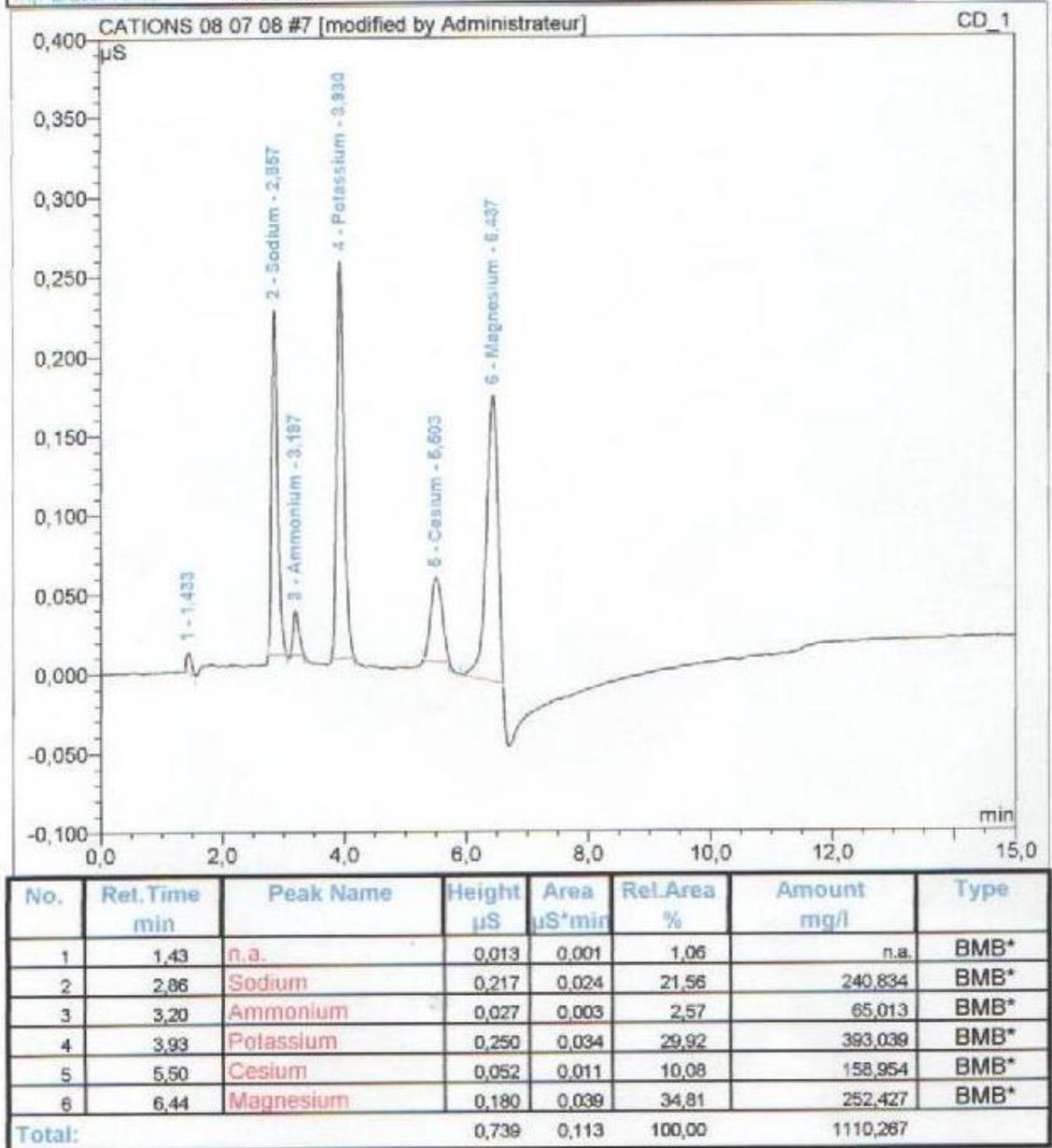
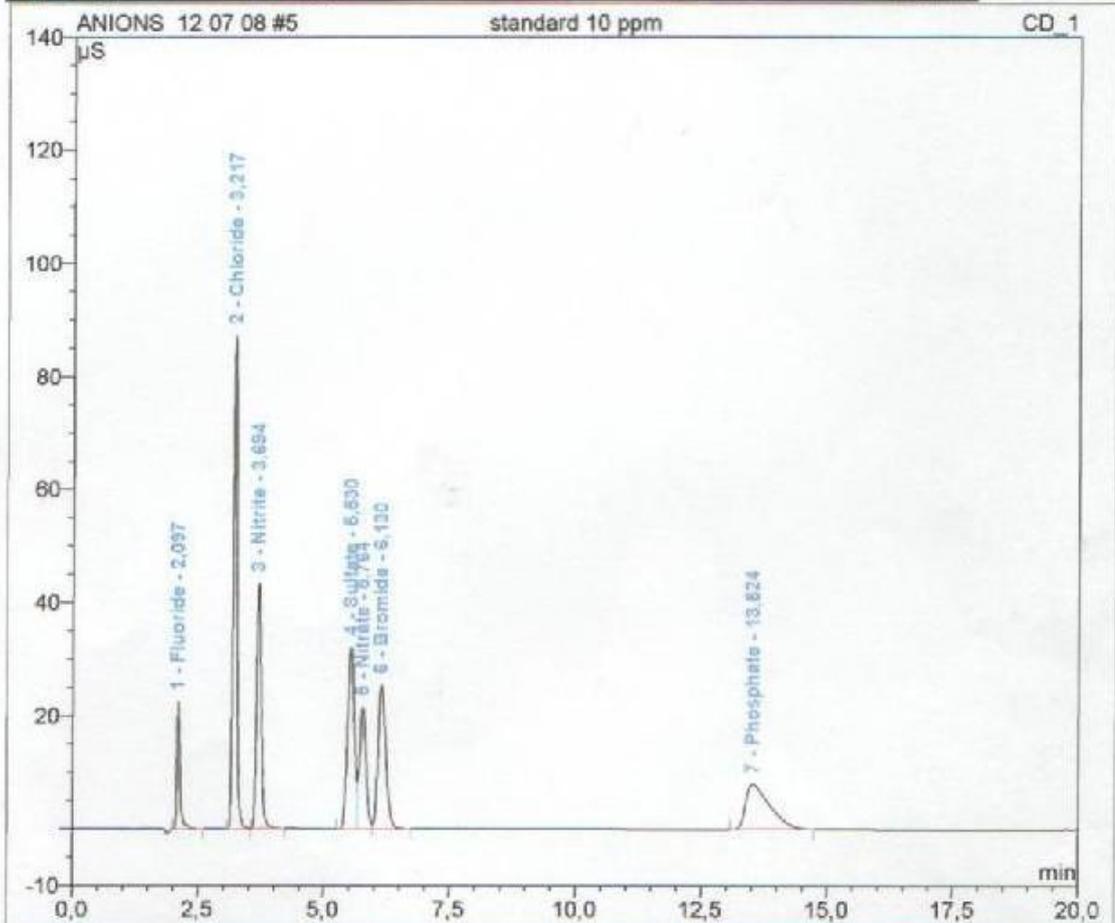


Fig 3.20 : Teneur en cation chez *Cassia acutifolia*

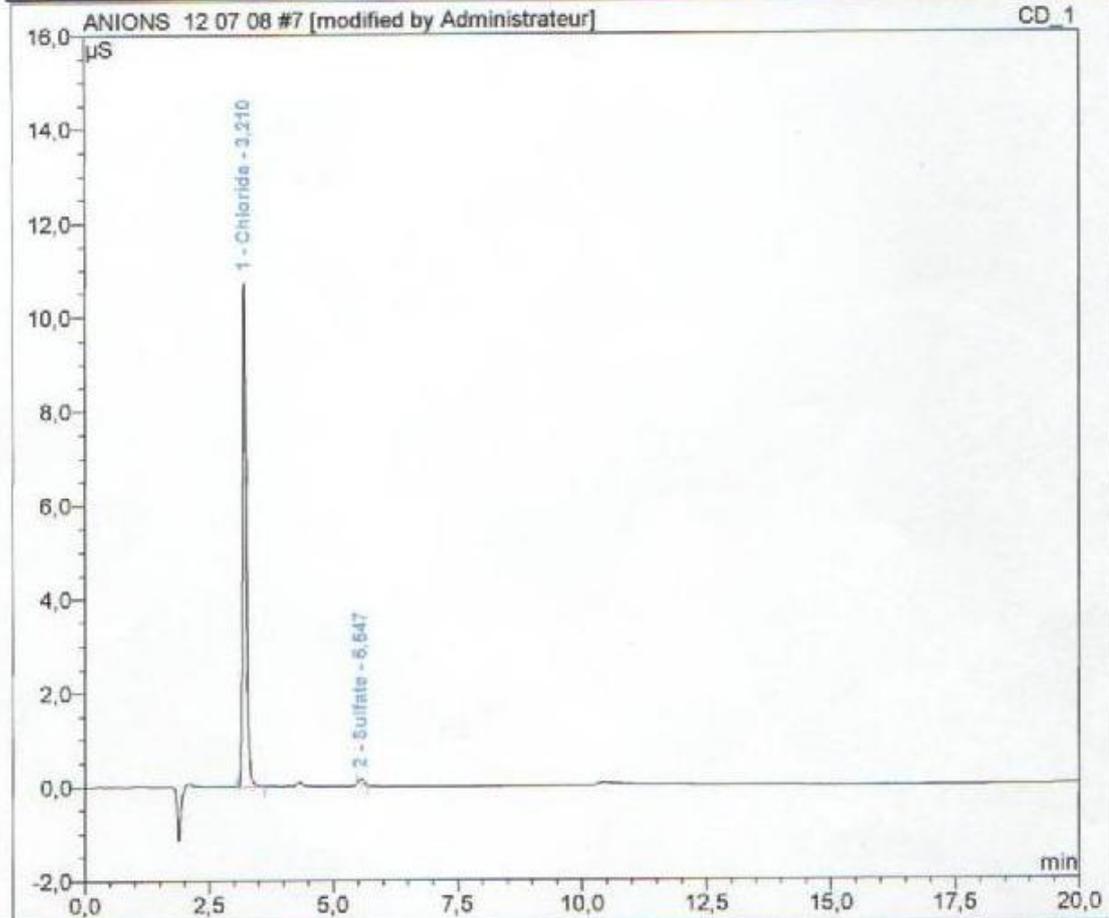
Sample Name:	Standard Anions	Inj. Vol.:	25,0
Sample Type:	liquide anions	Dilution Fa	1,0000
Program:	essai 15mn	Operator:	
Inj. Date/Time:	11 07 08	Run Time:	15mn



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height $\mu$ S	Area $\mu$ S*min	Rel. Area %	Amount mg/l	Type
1	2,10	Fluoride	22,462	1,621	5,21	10,134	BMB
2	3,22	Chloride	87,246	7,582	24,36	48,165	BM
3	3,69	Nitrite	43,368	4,646	14,93	49,119	MB
4	5,53	Sulfate	32,127	5,091	16,35	48,027	BM
5	5,76	Nitrate	21,457	3,273	10,51	50,807	M
6	6,13	Bromide	25,410	4,543	14,59	50,625	MB
7	13,52	Phosphate	7,907	4,374	14,05	100,584	BMB
<b>Total:</b>			240,005	31,130	100,00	357,461	

Fig 3.21 : standard anions

Sample Name:	plante Obovata	Inj. Vol.:	25,0
Sample Type:	liquide Anions	Dilution Fa	1000,0000
Program:	essai 20mn	Operator:	
Inj. Date/Time:	11 07 08	Run Time	20mn



No.	Ret. Time min	Peak Name	Height μS	Area μS*min	Rel. Area %	Amount mg/l	Type
1	3,21	Chloride	10,732	0,905	98,63	5747,727	BMB
2	5,55	Sulfate	0,102	0,013	1,37	118,121	BMB*
<b>Total:</b>			10,834	0,917	100,00	5865,847	

Fig 3.22 : Teneur en anions chez *Cassia obovata*

Sample Name:	plante Acutefo	Inj. Vol.:	25,0
Sample Type:	liquide Anions	Dilution Fa	1000,0000
Program:	essai 20mn	Operator:	
Inj. Date/Time:	11 07 08	Run Time:	20mn

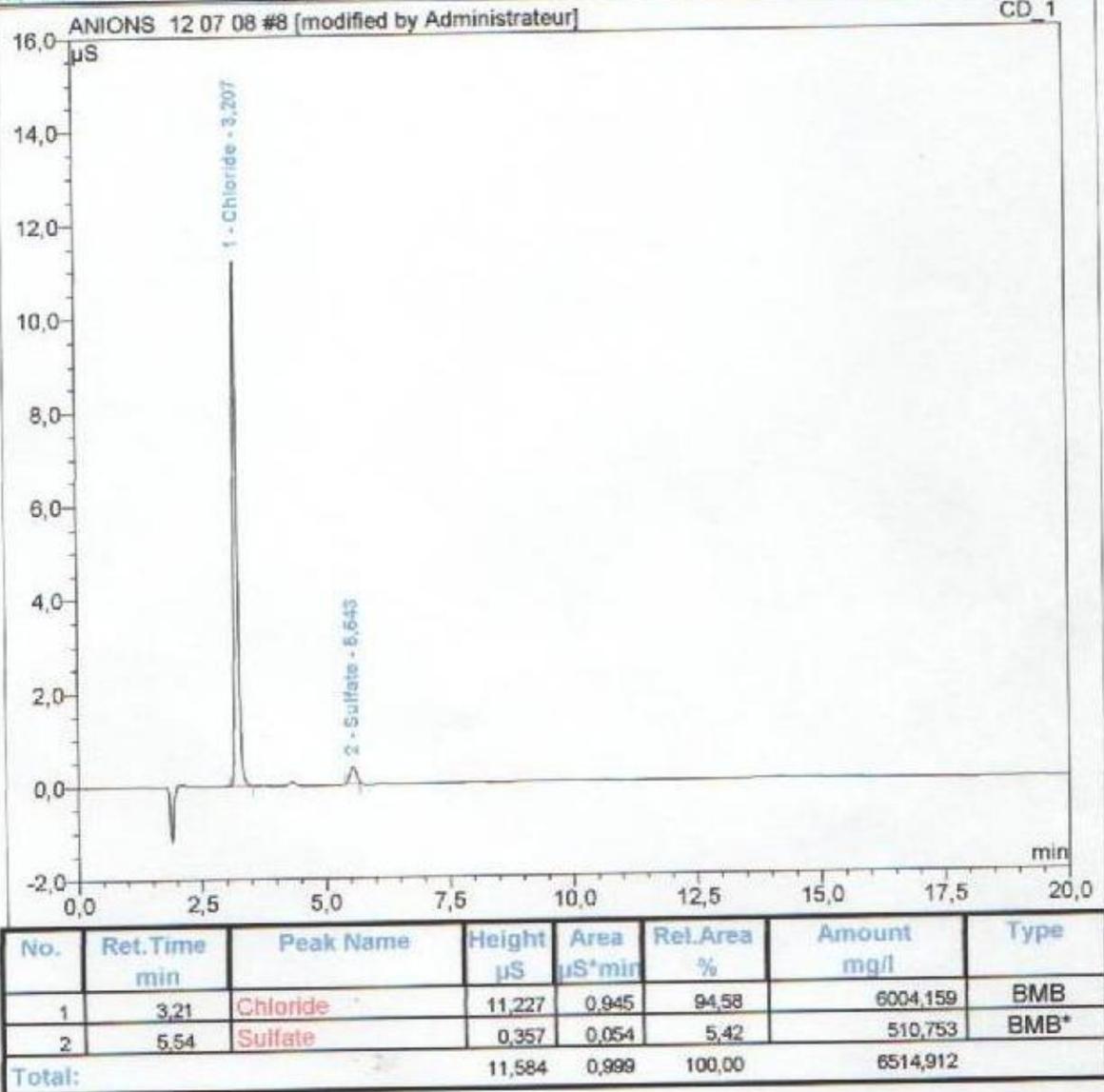


Fig 3.23 : Teneur des anions chez *Cassia acutifolia*

## APPENDICE C

### ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DES EXTRAITS ETHANOLIQUE ET AROMATIQUE



Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Staphylococcus aureus*



Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Pseudomonas aeruginosa*



Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'huile essentielle de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Staphylococcus aureus*

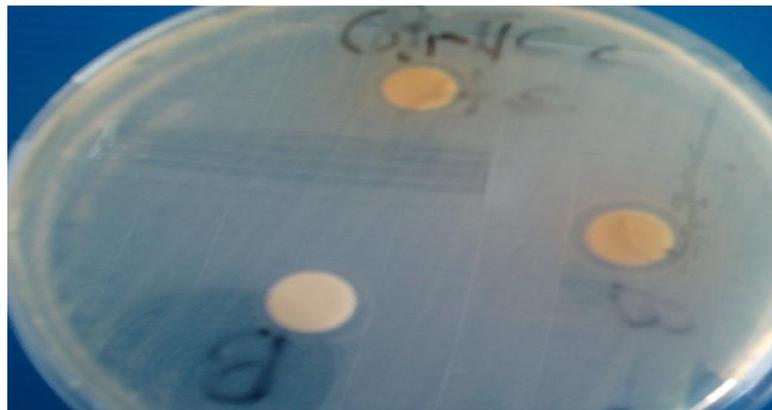


Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur l'*Agrobacterium*



Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'huile essentielle de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur l'*Agrobactérium*

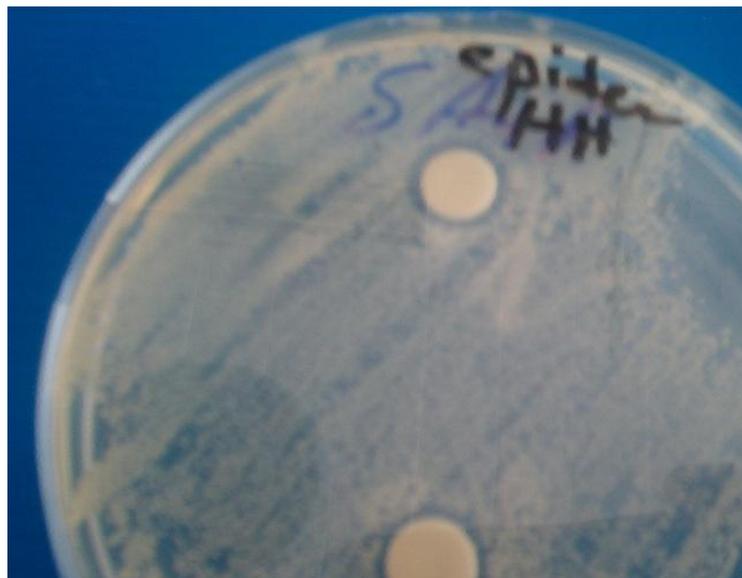


Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Staphylococcus epidermidis*



Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'huile essentielle de *C. acutifolia* sur *Bacillus subtilis*

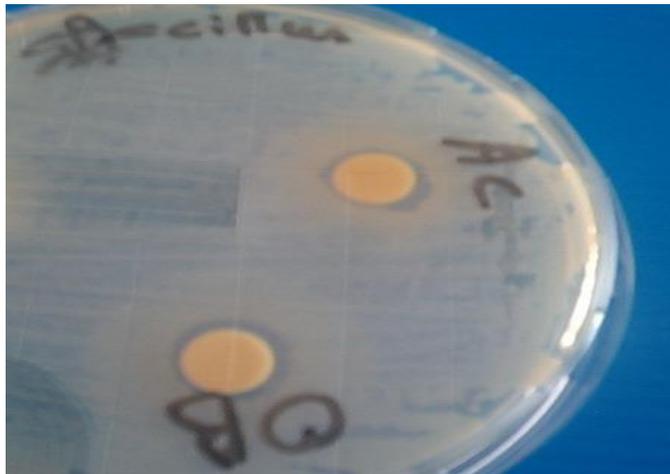


Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Bacillus subtilis*



Figure : zone d'inhibition observée lors de l'action de l'extrait éthanolique de *C. acutifolia* et *C. obovata* sur *Escherichia coli*

**APPENDICE D**  
**ETUDE STATISTIQUE**

Annexe 1 : Effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals, tableau des données :

FEUILLES	Hormone	Poids frais	Poids sec	TIGES	Poids frais	Poids sec	RACINES	Poids frais	Poids sec
	1	3,82	0,2945		2,12	0,2112		4,48	0,2617
	1	2,34	0,3112		4,82	0,4218		2,24	0,2112
	1	2,19	0,128		2,98	0,119		4,23	0,2982
	1	3,34	0,119		2,38	0,2821		3,12	0,232
	1	2,58	0,2008		3,9	0,1449		1,96	0,2402
	1	2,13	0,1907					3,33	0,2094
	1	1,72	0,2211					1,26	0,1888
	1	3,08	0,1482					2,02	0,2138
	1	2,02	0,2837					4,18	0,1917
	1							3,38	0,258
	2	1,28	0,112		4,29	0,2318		3,82	0,213
	2	3,74	0,1138		3,6	0,2592		1,12	0,1882
	2	2,21	0,324		1,92	0,1223		1,29	0,2902
	2	1,8	0,2018		2,56	0,2408		2,31	0,2838
	2	1,72	0,2169		2,38	0,2427		1,19	0,216
	2				1,34	0,1963		2,8	0,1912
	2				1,27	0,4275		1,93	0,2201
	2							3,45	0,2894
	2							2,13	0,2517
	2							1,16	0,2564
	3	2,12	0,1062		2,98	0,1872		2,86	0,1208
	3	2,27	0,1022		2,24	0,3219		1,1	0,1232
	3	1,52	0,2612		1,91	0,2212		0,82	0,0964
	3	1,18	0,1578		2,36	0,11		1,08	0,0886
	3	1,07			3,97	0,1921		1,76	0,1225
	3				2,02	0,2817		1,01	0,1064
	3				1,87	0,2442		1,08	0,0958
	3				1,45	0,3881		0,96	0,1161
	3							0,67	0,1022

Annexe 2 : Effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals

1) Cals issus des explants foliaires :

		N	Mean	Std. Deviation
Poids frais	Comb. Horm. 1	9	2,580000	,6919718
	Comb. Horm. 2	5	2,150000	,9481561
	Comb. Horm. 3	5	1,632000	,5426509
Poids sec	Comb. Horm. 1	9	,210800	,0726397
	Comb. Horm. 2	5	,193700	,0875226
	Comb. Horm. 3	4	,156850	,0740312

2) cals issus des explants caulinaires:

		N	Mean	Std. Deviation
Poids_frais	Comb. Horm. 1	5	3,240000	1,1173182
	Comb. Horm. 2	7	2,480000	1,1272533
	Comb. Horm. 3	8	2,350000	,7906959
	Total	20	2,618000	1,0166125
Poids_sec	Comb. Horm. 1	5	,235800	,1217065
	Comb. Horm. 2	7	,245800	,0923107
	Comb. Horm. 3	8	,243300	,0867231
	Total	20	,242300	,0927160

3) Cals issus des explants racinaires :

		N	Mean	Std. Deviation
Poids_frais	Comb. Horm. 1	10	3,020000	1,1058732
	Comb. Horm. 2	10	2,120000	,9814389
	Comb. Horm. 3	9	1,260000	,6703171
	Total	29	2,163448	1,1645332
Poids_sec	Comb. Horm. 1	10	,230500	,0345611
	Comb. Horm. 2	10	,240000	,0395114
	Comb. Horm. 3	9	,108000	,0130705
	Total	29	,195759	,0673806

Tableau 3.10 : Test de Student-Newman-Keuls  
Poids frais des cals issus des explants racinaires

Hormone	N	Subset for alpha = .05	
Comb. Horm. 3	9	1,2600	
Comb. Horm. 2	10	2,1200	
Comb. Horm. 1	10		<b>3,0200</b>
Sig.	0,057	1,000	

Tableau 3.11 : Test de Student-Newman-Keuls  
Poids sec des cals issus des explants racinaires

Hormone	N	Subset for alpha = .05	
Comb. Horm. 3	9	0,1080	
Comb. Horm. 1	10		<b>0,2305</b>
Comb. Horm. 2	10		<b>0,2400</b>
Sig.	1,000	0,517	

Tableau 3.12 a : Effets de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals

Combinaison hormonale	1	2	3
Poids frais des cals issus des :			
Explants foliaires	2,58 ± 0,69	2,15 ± 0,95	1,63 ± 0,54
Explants caulinaires	3,24 ± 1,12	2,48 ± 1,13	2,35 ± 0,79
Explants racinaires	3,02 ± 1,11	2,12 ± 0,98	1,26 ± 0,67
Poids sec des cals issus des :			
Explants foliaires	0,2108 ± 0,0726	0,1937 ± 0,0875	0,1569 ± 0,0740
Explants caulinaires	0,2358 ± 0,1217	0,2458 ± 0,0923	0,2433 ± 0,0867
Explants racinaires	0,2305 ± 0,0346	0,2400 ± 0,0395	0,1080 ± 0,0131

Tableau 3.12 b : Test ANOVA (effet de la combinaison hormonale sur la biomasse des cals)

Cals issus des :	Poids frais		Poids sec	
Explants foliaires	F = 2,714	p = 0,097	F = 0,677	p = 0,523
Explants caulinaires	F = 1,322	p = 0,293	F = 0,016	p = 0,984
Explants racinaires	F = 8,213	<b>p = 0,0017</b>	F = 50,156	<b>p = 0,0000</b>

Annexe 3 : Comparaison par ANOVA des poids frais et secs moyens des cals en fonction de la combinaison hormonale (1,2 ou 3) :

1) Cals issus des explants foliaires

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Poids frais	Between Groups	2,919	2	1,460	2,714	0,097
	Within Groups	8,604	16	,538		
	Total	11,524	18			
Poids sec	Between Groups	,008	2	,004	,677	0,523
	Within Groups	,089	15	,006		
	Total	,097	17			

2) Cals issus des explants caulinaires

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Poids_frais	Between Groups	14,702	2	7,351	8,213	0,0017
	Within Groups	23,270	26	,895		
	Total	37,972	28			
Poids_sec	Between Groups	,101	2	,050	50,156	0,00000
	Within Groups	,026	26	,001		
	Total	,127	28			

Annexe 4 : Effet de la combinaison hormonale sur la biosynthèse des sennosides dans les 3 types de cals :

Hormone	Type	SenB	SenA	SenC	senD	Rehine_8_Glucoslide
1	1	2,302	0,375	0,383	0,375	0,386
2	1	1,481	0,411	0,407	0,397	0,400
3	1	1,258	0,383	0,368	0,365	0,386
1	2	0,921	0,567	0,457	0,407	0,411
2	2	0,468	0,383	0,365	0,361	0,372
3	2	0,521	0,386	0,375	0,372	0,383
1	3	1,428	0,379	0,358	0,379	0,383
2	3	0,698	0,407	0,375	0,379	0,397
3	3	0,896	0,390	0,375	0,390	0,400

1 : Combinaison hormonale 1

2 : Combinaison hormonale 2

3 : Combinaison hormonale 3

Type 1 : Feuilles

Type 2 : Tiges

Type 3 : Racines

Annexe 5 : Effet de la combinaison hormonale sur la teneur en sennosides dans les cals, moyennes globales :

Plante entière		Moyenne	Erreur standard	SEM
Combinaison hormonale 1	SenB	1,55033	,403325	,698580
	SenA	,44033	,063344	,109715
	SenC	,39933	,029723	,051481
	SenD	,38700	,010066	,017436
	Reh_8_Glu	,39333	,008876	,015373
Combinaison hormonale 2	SenB	,88233	,306609	,531062
	SenA	,40033	,008743	,015144
	SenC	,38233	,012667	,021939
	SenD	,37900	,010392	,018000
	Reh_8_Glu	,38967	,008876	,015373
Combinaison hormonale 3	SenB	,89167	,212765	,368519
	SenA	,38633	,002028	,003512
	SenC	,37267	,002333	,004041
	SenD	,37567	,007446	,012897
	Reh_8_Glu	,38967	,005239	,009074

Tableau 3.13 : Teneur en sennosides en fonction du type de cal et la combinaison hormonale.

	En fonction de la combinaison hormonale		En fonction du type de cal	
Sennoside A	F = 0,5064	p = 0,6367	F = 0,6393	p = 0,5742
Sennoside C	F = 0,440	p = 0,6718	F = 0,534	p = 0,6229
Sennoside D	F = 0,260	p = 0,7833	F = 0,028	p = 0,9730
Rehine_8_Glucose	F = 0,050	p = 0,9519	F = 0,061	p = 0,9416
Sennoside B	F = 13,322	<b>p = 0,017</b>	F = 25,423	<b>p = 0,0053</b>

Annexe 6 : Teneur en sennosides, comparaison par ANOVA à effets principaux pour l'effet de « l'hormone » et du « type de cal » :

Teneur en sennoside A

Univariate Tests of Significance for SenA					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,505529	1	1,505529	323,6073	0,000056
Hormone	0,004712	2	0,002356	0,5064	<b>,636729</b>
Type	0,005949	2	0,002974	0,6393	<b>,574216</b>
Error	0,018609	4	0,004652		

Teneur en sennoside C

Univariate Tests of Significance for SenC					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,332485	1	1,332485	1072,615	0,000005
Hormone	0,001094	2	0,000547	0,440	<b>,671785</b>
Type	0,001327	2	0,000663	0,534	<b>,622914</b>
Error	0,004969	4	0,001242		

Teneur en sennoside D

Univariate Tests of Significance for SenD					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,303403	1	1,303403	3326,893	0,000001
Hormone	0,000204	2	0,000102	0,260	<b>,783296</b>
Type	0,000022	2	0,000011	0,028	<b>,973047</b>
Error	0,001567	4	0,000392		

Teneur en rehine\_8\_Glucoside

Univariate Tests of Significance for Reh_8_Glu					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,375147	1	1,375147	5106,798	0,000000
Hormone	0,000027	2	0,000013	0,050	<b>,951881</b>
Type	0,000033	2	0,000016	0,061	<b>,941619</b>
Error	0,001077	4	0,000269		

Teneur en sennoside B

Univariate Tests of Significance for SenB					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	11,05119	1	11,05119	334,5523	0,000053
Hormone	0,88015	2	0,44008	13,3224	<b>,017037</b>
Type	1,67956	2	0,83978	25,4227	<b>,005319</b>
Error	0,13213	4	0,03303		

Annexe 7 : Teneurs moyennes en sennoside B :

1) En fonction de la combinaison hormonale :

Weighted Means					
Current effect : F(2, 4)=13,322, p=,01704					
Effective hypothesis decomposition					
Hormone	Masse	SEM			
1	1,550333	0,403325			
2	0,882333	0,306609			
3	0,891667	0,212765			

2) En fonction du type de cal :

Weighted Means					
Current effect : F(2, 4)=25,423, p=,00532					
Effective hypothesis decomposition					
Type	Masse	SEM			
Feuilles	1,680333	0,317429			
Tiges	0,636667	0,142988			
Racines	1,007333	0,217961			

## Annexe 8 : Effet du stress salin sur la biomasse des cals

### Poids frais (g)

	%NaCl Période	0%	0,50%	1%	1,50%
Feuilles	1er mois	2,082	1,94	1,267	1,282
	2ème mois	2,823	2,10	1,89	1,275
	3ème mois	3,33	2,36	2,17	1,50
Tiges	1er mois	2,227	1,845	1,260	1,232
	2ème mois	2,245	1,818	1,687	1,43
	3ème mois	4,42	1,907	1,793	1,293
Racines	1er mois	1,696	1,278	1,13	1,080
	2ème mois	2,823	1,624	1,32	1,01
	3ème mois	5,91	2,43	1,52	0,973

### Poids sec (g)

	%NaCl Période	0%	0,50%	1%	1,50%
Feuilles	1er mois	0,12	0,115	0,108	0,104
	2ème mois	0,16	0,134	0,12	0,071
	3ème mois	0,205	0,145	0,132	0,08
Tiges	1er mois	0,156	0,143	0,117	0,10
	2ème mois	0,186	0,145	0,120	0,101
	3ème mois	0,253	0,189	0,14	0,08
Racines	1er mois	0,236	0,216	0,147	0,139
	2ème mois	0,256	0,210	0,286	0,135
	3ème mois	0,283	0,271	0,261	0,131

Annexe 9 : Effet du stress salin sur la teneur en sennosides dans les cals issus de différents explants et cultivés in vitro pendant 3 mois :

Temps	Sennoside	Type	0%	0,50%	1,00%	1,50%
1	B	Feuilles	3,234	3,578	0,981	0,794
2	B	Feuilles	3,67	3,847	1,116	1,435
3	B	Feuilles	2,862	2,242	1,105	1,25
1	A	Feuilles	0,492	0,567	0,638	0,499
2	A	Feuilles	0,542	0,414	0,581	0,432
3	A	Feuilles	0,694	0,514	0,51	0,485
1	C	Feuilles	0,386	0,461	0,585	0,485
2	C	Feuilles	0,411	0,404	0,404	0,358
3	C	Feuilles	0,606	0,422	0,411	0,404
1	D	Feuilles	0,347	0,4	0,549	0,482
2	D	Feuilles	0,344	0,333	0,333	0,319
3	D	Feuilles	0,567	0,383	0,347	0,34
1	R	Feuilles	0,312	0,358	0,531	0,478
2	R	Feuilles	0,337	0,319	0,319	0,283
3	R	Feuilles	0,549	0,351	0,312	0,298
1	B	Tiges	1,477	3,142	1,477	1,321
2	B	Tiges	1,155	2,543	2,048	1,743
3	B	Tiges	1,245	1,389	0,843	0,733
1	A	Tiges	0,503	0,595	0,485	0,337
2	A	Tiges	0,337	0,489	0,439	0,609
3	A	Tiges	0,4	0,404	0,531	0,379
1	C	Tiges	0,485	0,521	0,453	0,305
2	C	Tiges	0,294	0,397	0,358	0,468
3	C	Tiges	0,351	0,358	0,91	0,322
1	D	Tiges	0,478	0,485	0,443	0,259
2	D	Tiges	0,266	0,308	0,305	0,393
3	D	Tiges	0,319	0,337	0,319	0,319
1	R	Tiges	0,475	0,294	0,436	0,269
2	R	Tiges	0,28	0,305	0,305	0,312
3	R	Tiges	0,322	0,308	0,276	0,29
1	B	Racines	1,424	2,88	1,548	1,144
2	B	Racines	2,21	3,078	1,853	1,208
3	B	Racines	1,63	3,078	1,69	1,07
1	A	Racines	0,418	0,602	0,414	0,439
2	A	Racines	0,57	0,574	0,432	0,375
3	A	Racines	0,393	0,542	0,489	0,39
1	C	Racines	0,358	0,461	0,344	0,372
2	C	Racines	0,436	0,443	0,358	0,326
3	C	Racines	0,337	0,429	0,365	0,337
1	D	Racines	0,326	0,39	0,308	0,34
2	D	Racines	0,358	0,358	0,312	0,294
3	D	Racines	0,312	0,365	0,315	0,301
1	R	Racines	0,294	0,347	0,28	0,301
2	R	Racines	0,337	0,319	0,319	0,283
3	R	Racines	0,283	0,322	0,283	0,308

Annexe 10 : Teneur en sennoside B avec stress salin :

1) Cals issus des explants foliaires :

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,473	3	8	<b>0,040</b>

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13,566	3	4,522	<b>17,787</b>	<b>0,00067</b>
Within Groups	2,034	8	,254		
Total	15,599	11			

2) Cals issus des explants caulinaires:

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,562	3	8	<b>0,273</b>

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,405	3	,802	<b>2,223</b>	<b>0,16295</b>
Within Groups	2,884	8	,361		
Total	5,289	11			

3) Cals issus des explants racinaires :

Test of Homogeneity of Variances

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4,154	3	8	<b>0,048</b>

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5,626	3	1,875	<b>36,200</b>	<b>,00005</b>
Within Groups	,414	8	,052		
Total	6,041	11			

Tableau 3.14 : Test de Student-Newman-Keuls

	N	Subset for alpha = 0.05	
1,0% NaCl	3	1,0673	
1,5% NaCl	3	1,1597	
0,5% NaCl	3		<b>3,2223</b>
0% NaCl	3		<b>3,2553</b>
Sig.	0,828	0,938	

Tableau 3.15 : Test de Student-Newman-Keuls

	N	Subset for alpha = .05	
1,5% NaCl	3		1,2657
0% NaCl	3		1,2923
1,0% NaCl	3		1,4560
0,5% NaCl	3		2,3580
Sig.			, 195

Tableau 3.16: Test Student-Newman-Keuls

	N	Subset for alpha = .05		
1,5% NaCl	3	1,1407		
1,0% NaCl	3		1,6970	
0% NaCl	3		1,7547	
0,5% NaCl	3			<b>3,0120</b>
Sig.	1,000	0,764	1,000	

Annexe 11 : Teneur en sennoside B dans les différents organes de vitroplants en fonction du temps

Vitroplants témoins

Type	<u>feuilles</u>	<u>tiges</u>	<u>racines</u>
1 <sup>er</sup> mois	2,74	1,27	2,04
2 <sup>ème</sup> mois	3,41	0,94	1,48
3 <sup>ème</sup> mois	3,82	1,04	1,78

Vitroplants soumis au stress

Type	Feuilles	Tiges	Racines
1er mois	1,8916	1,8916	1,8704
2ème mois	2,1715	0,9847	1,6188
3ème mois	3,4219	1,006	1,2823

Annexe 12: Teneur en sennoside B en fonction du temps et du type d'organe (ANOVA à effets principaux)

Univariate Tests of Significance					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	28,9401	1	28,9401	62,4230	0,0014
Période	0,1833	2	0,0917	0,1977	<b>0,8282</b>
Type	2,3481	2	1,1741	2,5324	<b>0,1947</b>
Error	1,8545	4	0,4636		

Annexe 13 : Effet du stress thermique sur la teneur en sennoside B dans les différentes parties des vitroplants pendant trois mois :

Période	Type	Avec stress	Sans stress
1	1	1,8916	2,745
2	1	2,1715	3,41
3	1	3,4219	3,82
1	2	1,8916	1,279
2	2	0,9847	0,946
3	2	1,006	1,045
1	3	1,8704	2,048
2	3	1,6188	1,484
3	3	1,2823	1,785

Période : 1 : mois

2 : 2mois

3 : 3mois

Type : 1 : Feuilles

2 : Tiges

3 : Racines

Tableau 3.17 : Teneur moyenne en sennoside B sans stress

Type	teneur moyenne	SEM	N
Feuilles	3,3250	0,3132	3
Tiges	1,0900	0,0987	3
Racines	1,7723	0,1629	3

Tableau 3.18 : Teneur moyenne en sennoside B avec stress

Type	teneur moyenne	SEM	N
Feuilles	2,4950	0,4704	3
Tiges	1,2941	0,2988	3
Racines	1,5905	0,1704	3

Annexe 14 : Teneur en sennoside B dans les feuilles, tiges et racines (sans stress)

ANOVA

	Univariate Tests of Significance				
	SS	Degr. of	MS	F	p
Type	7,87158	2	3,93579	29,2834	0,000802
Error	0,80642	6	0,13440		

Annexe 15 : Teneur en sennoside B dans les feuilles, tiges et racines

Statistiques descriptives

		Feuilles Descriptive Statistics		
Variable		Valid N	Mean	Standard Error
Sans stress		3	3,325000	0,313222
Avec stress		3	2,495000	0,470441
		Tiges Descriptive Statistics		
Variable		Valid N	Mean	Standard Error
Sans stress		3	1,090000	0,098727
Avec stress		3	1,294100	0,298813
		Racines Descriptive Statistics		
Variable		Valid N	Mean	Standard Error
Sans stress		3	1,772333	0,162936
Avec stress		3	1,590500	0,170359

Annexe 16 : Teneur en sennosides dans les cals issus des différents explants et cultivées in vitro pendant 3 mois (sans stress) :

	sen B	sen A	sen C	sen D	rehine-8-glu
F1	2,682	0,372	0,28	0,269	0,255
F2	2,023	0,358	0,276	0,241	0,266
F3	2,086	0,351	0,262	0,234	0,266
T1	0,489	0,305	0,266	0,244	0,266
T2	0,622	0,259	0,255	0,227	0,248
T3	0,864	0,259	0,241	0,237	0,227
R1	1,789	0,372	0,252	0,237	0,252
R2	1,991	0,358	0,283	0,248	0,248
R3	2,086	0,28	0,259	0,248	0,237

Annexe 17 : Teneur en sennoside B dans les cals issus des différents explants (cultivés in vitro) :

Période	Type	Avec stress	Sans stress
1	1	3,234	2,682
2	1	3,67	2,023
3	1	3,862	2,086
1	2	1,477	0,489
2	2	1,155	0,622
3	2	1,245	0,864
1	3	1,424	1,789
2	3	2,21	1,991
3	3	1,63	2,086

Période : 1 : 1 mois      2 : 2 mois      3 : 3 mois  
Type : 1 : Feuilles      2 : Tiges      3 : Racines

Annexe 18 : Teneur en sennoside B dans les cals issus des différents explants (cultivés in vitro) :

Comparaison des moyennes en fonction du type de l'explant (foliaire, caulinaire et racinaire)

Test d'homogénéité des variances

	Statistique de Levene	ddl1	ddl2	Signification
Sans stress	2,618	2	6	0,152
Avec stress	1,427	2	6	0,311

## ANOVA

## Sans stress

Effect	Univariate Tests of Significance Sigma-restricted parameterization				
	SS	Degr. of	MS	F	p
Type	4,35437	2	2,17719	34,1257	0,000528
Error	0,38279	6	0,06380		

## Avec stress

Effect	Univariate Tests of Significance Sigma-restricted parameterization				
	SS	Degr. of	MS	F	p
Type	8,85045	2	4,42523	44,6596	0,000249
Error	0,59453	6	0,09909		

Mean sans stress	Mean avec stress	t-value	df	p
3,2553	2,2637	-3,158	4	0,0034

## Teneur moyens sans stress

Type	Moyenne	SEM	N
<b>Feuilles</b>	<b>3,2553</b>	<b>0,2335</b>	3
Tiges	1,2923	0,0959	3
Racines	1,7547	0,2353	3

## Teneur moyens avec stress

Type	Moyenne	SEM	N
<b>Feuilles</b>	<b>2,2637</b>	<b>0,2100</b>	3
Tiges	0,6583	0,1098	3
Racines	1,9553	0,0876	3

Annexe 19 : Test SNK

## Avec\_stress

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		N	
		1	2
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>	Tiges	3	1,292333
	Racines	3	1,754667
	Feuilles	3	<b>3,588667</b>
	Signification		0,122
			1,000

## Sans\_stress

		Sous-ensemble pour alpha = 0.05	
		N	
		1	2
Student-Newman-Keuls <sup>a</sup>	Tiges	3	,658333
	Racines	3	<b>1,955333</b>
	Feuilles	3	<b>2,263667</b>
	Signification		1,000
			0,186

Annexe 19 : ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Sans_stress	Between Groups	6,319	2	3,160	26,531	0,00105
	Within Groups	,715	6	,119		
	Total	7,034	8			
Avec_stress	Between Groups	4,354	2	2,177	34,126	0,00053
	Within Groups	,383	6	,064		
	Total	4,737	8			

Poids moyens (sans stress et avec stress)

Type; Weighted Means (3D stress thermique.sta) Current effect: F(2, 6)=26,531, p=,00105 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type	Sans stress	Sans stress	Sans stress	Sans stress	N
1	Feuilles	3,255333	0,233493	2,250693	4,259974	3
2	Tiges	1,292333	0,095919	0,879627	1,705039	3
3	Racines	1,754667	0,235305	0,742231	2,767102	3

Type; Weighted Means (3D stress thermique.sta) Current effect: F(2, 6)=34,126, p=,00053 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Type	Avec stress	Avec stress	Avec stress	Avec stress	N
1	Feuilles	2,263667	0,209956	1,360300	3,167034	3
2	Tiges	0,658333	0,109767	0,186044	1,130622	3
3	Racines	1,955333	0,087572	1,578543	2,332123	3

## REFERENCES

1. Bruneton, J., "Elément de Phytochimie et de Pharmacognosie", édition Tec & Doc, Paris, Lavoisier, (1987), 199 p.
2. Padulosi, S., Leaman, D., Quek, P., "Challenges and opportunities in enhancing the conservation and use of medicinal and aromatic herbs". Journal of Herbs spices and Medicinal Plant 9, (2004), 234 p.
3. Loic, G., "Les plantes et les médicaments". Ed. Delachaux et Niestlé S A, Paris, (2006).
4. Tourte, Y., et Tourte C., "Génie génétique et biotechnologies: Concepts et Méthodes". Ed. Dunod, Paris, (1998).
5. Kung, S., Arntzen, C.J., "Plant Biotechnology". Boston: Butterworth, Smith J. E. 2<sup>nd</sup> Ed. London: Edward Arnold, (1988), 337-353.
6. Kaabache, M., Dehamna, S., et Harzallah, D., "Substances naturelles et flore d'Algérie : Origine, Répartition". 1er Congrès Nat. de Chimie, Univ. M'sila, Algérie, (2004).
7. Benchelah, A.C, and Maka, M., "Flore de Sahara : Voyage ethnobotanique avec les touaregs du Tassili". Paris, (2000), 150-152.
8. Verdrager, J., "Ces médicaments qui nous viennent des plantes". Ed. Maloine S. A., (1978), 9-13.
9. Wichtl, M., et Anton, R., "Plantes thérapeutiques". Edition Tec & Doc, (1999), 4-14.
10. Akerele, O., "L'OMS et la médecine traditionnelle: Chemin parcourue et perspectives". Chronique OMS, 38 (1984), 84-90.
11. Anonyme., "Médecine traditionnelle". OMS, 56<sup>ème</sup> assemblée mondiale de la santé 56/18, (2003), 1-4.
12. Anonyme., "CATIE un guide pratique des plantes médicinales pour les personnes vivants avec le VIH". Réseau canadien d'info-traitement sida (CATIE).
13. Baba Aissa, F., "Encyclopédie des plantes utiles, flores d'Algérie et du Maghreb". Edition EDAS-librairie moderne, Alger, (2000), 368 p.
14. Colette, K.D., "Les plantes médicinales". Edition ALS, (2004)., 57-64.
15. Iserin, P., "Encyclopédie de plantes médicinales : identifications préparations soins". Bordas : Larousse, (1996), 336 p.
16. Thurzova, L., "Les plantes-santé qui poussent autour de nous". édition Bordas, (1981), 268 p.
17. Valnet, J., "Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes". 5<sup>ème</sup> édition: Maloine, Paris, (1983), 59, 711.
18. Leclerc, H., "Précis de phytothérapie". Masson, (1983), 170 p.
19. Bianchini, et Corbetta, F., "Atlas des plantes médicinales". Paris, Fernand Nathan Edite, (1975), 231p.
20. Chamaleau, A., "Les usages externes de la phytothérapie". Paris : Maloine. (1979), 200 p.
21. Chevallier, A., "Encyclopédie des plantes médicinales". Ed. Reader's Sigest, Canada, (1997).
22. Schawenberg, P., et Paris, F., "Guide des plantes médicinales". Paris, Delachaux et Niestlé, 3<sup>ème</sup> édition, (1977), 396 p.
23. Harborne, J., "Introduction to ecological biochemistry". 3rd edition New York Academic press, (1988), 267-283.
24. Hopkins, W.G., "Physiologie végétale: Molécules et métabolisme". Ed. De boeck, Paris, (2003), 273-281.
25. Iserin, P., "Larousse Encyclopédie des plantes médicinales". Edition Larousse, (2001), 10-17, 132.
26. Belaiche, P., "Traité de phytothérapie et d'aromathérapie". Tome I, Ed. Maloine SA, (1979), 136 p.
27. Bruneton, J., "Pharmacognosy: phytochemistry and medicinal plants". Edition Lavoisier, (1999), 1119.

28. Grisebach, H., and Ebel, J., "Phytoalexine, chemische abwehrstoffe höherer Pflanzen". *Angew. Chem*, 90, (1978), 668 p.
29. Cadwell, M., Robberecht, R., and Flint, S.D., "Internal filters: Prospects for UV acclimation in higher plants". *Physiologia Plantarum*, 58, (1983), 445-450.
30. Volak, J., Stodola, J., "Plantes médicinales", Grund, Paris, (1983), 298 p.
31. Bruneton, J., "Pharmacognosie". Edition Tech & Doc, Lavoisier, Paris, (1993), 1220 p.
32. Guignard J, L., "Abrégé de Biochimie végétale". Masson, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, (1979), 184 p.
33. Richter, G., "Métabolisme des végétaux : physiologie et biochimie". Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, (1993), 303 p.
34. Bruneton, J., "Pharmacognosie". Edition Tech & Doc, Lavoisier, Paris, (1985), 526 p.
35. Malcolm, S.B., "Cardenolide-mediated interactions between plants and herbivores". In: G. A. Rosenthal, M.R. Berenbaum (eds.), *Herbivores: Their interactions with secondary metabolites*. Vol. 1. The chemical participants. 2nd ed. San Diego: Academic press, (1991), 251-296.
36. Seigler, D.S., "Cyanide and cyanogenic glycosides". In: GA. Rosenthal, MR. Berenbaum (eds.), *Herbivores: Their interactions with secondary metabolites*. Vol. 1. The chemical participants. 2nd ed. San Diego: Academic press, (1991), 35-77.
37. Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wertele, E.S., and Bollinger, W.H., "Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials". *Science*, 228, (1985), 1154-1160.
38. Iserin, P., "Encyclopédie de plantes médicinales : identifications préparations soins". Bordas : Larousse, (1996), 336 p.
39. Southon, I.W., and Buckingham, J., "Dictionary of Alkaloids". Edition Chapman and Hall, London, (1989), 281-283.
40. Misawa, M.A., and Goodbody, E., In: F. DiCosmo, M. Misawa (eds.), "Plant cell culture secondary metabolism: Toward industrial application". Boca Raton: CRC Press, (1996), 123-138.
41. Pousset, J.L., "Plantes médicinales Africaines, utilisation pratique". Paris, (1989), 38-43.
42. Le Clerc, J., Hazebroucq, A.A., Dorvault, J., "L'officine". XXII<sup>ème</sup> édition Vigot, Paris, (1978), 74-108.
43. Pharmacopée Européenne., 4<sup>ème</sup> édition, Strasbourg, Conseil d'Europe, (2002).
44. Pousset, J.L., "Plante médicinales Africaines". Secum Edi sud, (2004), 286 p.
45. Paris, R.R., et Myose, H., "Précis de Matière médicale". Édition Masson, Paris, (1981), 365 p.
46. Sahki, A., et Sahki, R., "Le Hoggar, promenade botanique". Edition Esop, Lyon/Chamonix, (2004), 311 p.
47. Abdallahi, O.M., "Etude de quelques insectes récoltées en Mauritanie occidentale sur *Cassia acutifolia* et *Cassia italica*". Ecole nationale supérieure, n°5, Nouakchott, (2002), 73-95.
48. Evan, W.C., "Pharmacognosy". 14<sup>th</sup> edition, London, (1998), 235-239.
49. Ranjana, A., "Yield of *Cassia angustifolia* in combination with different tree species in a silvi-herbal trial under hot arid conditions in India". *Bioresource Technology*, vol 86, (2003), 165-169.
50. Fernand, V.E., Dinh, D.T., and Washington, S.J., "Determination of pharmacologically active compounds in root extracts of *Cassia alata* L. by use of high performance liquid chromatography". *Talanta*, 15, 74(4), (2007), 896-902.
51. Paris, M., and Hurabielle, M., "Abrégé de matière médicale: Pharmacognosie". Tome 1, édition Masson, Paris, (1981), 457 p.
52. Bala, S., Unival, G.C., Dubey, T., and Singh, S.P., "An improved Method for the Analysis of sennosides in *Cassia angustifolia* by High Performance Liquid Chromatography". *Phytchemical analysis*, vol 12, (2001), 277-280.
53. Harza, B., Sharma, M.D., and Sanyal, U., "Separation methods of quinonoid constituents of plants used in oriental traditional medecines". *Journal of Chromatography B*, vol 812, (2004), 259-275.
54. Kuhnert, N., Molod, H.Y., "An efficient total synthesis of chrysophanol and the sennoside C aglycon". *Tetrahedron Letters*, vol 46, (2005), 7571-7573.

55. Sun, S.W., and Su, H.T., "Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, (2002), 881-894.
56. Leng-Peschlow, E., "Acceleration of large intestine time in rats by sennosides and related compounds". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, London, (1986), 369-373.
57. Valnet, J., "Phytothérapie, traitement des maladies par les plantes". 6<sup>ème</sup> édition, Maloine, Paris, (1992), 712 p.
58. Gattuso, A., and Kamm, M.A., "Adverse effects of drugs used in the management of constipation and diarrhea". *Drug Safety*, 10 (1), 1994, 47-65.
59. Mairesse, M., Ledent, C., "Asthme et rhinite d'origine professionnelle causés par le séné". *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*, vol 47, (2007), 371-372.
60. Pharmacopée Européenne. 5<sup>ème</sup> édition, Strasbourg, Conseil d'Europe, (2005), 2600 p.
61. Anonyme. "Guide Pratique du Laboratoire de Chimie, Méthodes d'analyse". Edition Delta CH-1026 Denges, (1984), 127 p.
62. Karel, M., "Pharmaceutical application of thin-layer and paper chromatography". *Pharmaceutical Sciences*, V 62, Issue 6, (1972), 1032 p.
63. Rouibi, A., Saidi, F., Boutoumi, H., "Extractions and characterization of some actives principals of senna". *Bulten USAMV. Cluj Napoca*, V.63, (2007), 400-404.
64. Guignard, J.L., "Biochimie végétale". Masson, 2<sup>ème</sup> édition, Paris, (2000), 281 p.
65. Heller, R., Robert, E., and Claud, L., "Physiologie végétale", 6<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris, (2007), 323p.
66. Leclerc, H., "Microbiologie Générale". Edition Masson, Paris, (1975), 195 p.
67. Reynoso-cuevas, L., Gallegos-Martinez, M.E., Cruz-Sosa, F., and Gutierrez-Rojas, M., "In-vitro evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contamination soils". *Bioresource Technology* 86 (2003) 165-169.
68. Shrivastava, N., Tejas, P., and Shrivastava, A., "Biosynthetic potential of in vitro grow callus of *Cassia senna* L. var. Senna". *Current Science*, V. 99, n° 11, (2006).
69. Murashige, T., and Skoog, F., "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures". *Physiol. Plant*, 15, (1962), 473 p.
70. Nazif, N.M., Rady, M.R., and Seif El-Nasr., "Stimulation of anthraquinone production in suspension cultures of *Cassia acutifolia* by salt stress". *Fitoterapia*, 71, (2000), 34-40.
71. Lemli, J., Verhaeren, E., and Cuveele, J., "Research on drugs containing anthraquinone principales. A note on alcoholic washing of senna leaflets". *Plant Med. Phytotherapie*, 19, (1985), 57-61.
72. Kabelitz, L., and Reif, K., "Anthranoide in Seenesdrogen - Ein analytischer Beitrag zur Risikobewertung". *Dutsch.Apoth.-Ztg*, 134, (1994), 5085-5088.
73. Madi, A., "Caractérisation et comparaison du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales (Thym et Sauge) et la mise en évidence de leurs activités biologiques". *Mémoire de Magister en Biotechnologie, Département de Biologie, Université Mantouri Constantine, Algérie*, (2009), 54-55.
74. Navaro, J.M., Flores, P., Garrido, C., and Martinez, V., "Change in the contents of antioxidants compounds in pepper fruits at different ripening stage as affected by salinity". *Food Chemistry*, 96, (2006), 66-73.
75. Gupta, R., Modi, J.N., and Mehta, K.G., "Studies on cultivation of senna (*Cassia angustifolia* Vahl) in north Gujarat". *South Idian Hort*, 25, (1977), 26-29.
76. Lohar, D.R., Bhatia, P.K., Gaed, S.P., and Chaw, D.D., "Seasonal variation in the content of sennoside in Senna leaves". *Pharm. World Sci*, 1(1), (1979), 206-208.
77. Sharma, H.K., Daiya, K.S., and Chawan, D.D., "Sennosides and carbohydrates in developing pods of *Cassia* species". *Pharma. World. Sci*, 4(3), (1982), 83-84.
78. Cano, L.M., Odilia, A., Hernandez, H., and Sanchez, J.R., "Seasonal variations in the content of sennosides in leaves and pods of two *Cassia fistula*". *Populations. Phytochem*, 29, (1990), 3095-3099.

79. Arshi, A., Abdin, M.Z., and Iqbal, M., "Sennosides content and yield attributes of *Cassia angustifolia* Vahl. As affected by NaCl and NaCl<sub>2</sub>". *Scientia Horticulture*, 111, (2006), 84-90.
80. Bilia, A.R., Cioni, P., Morelli, I., Coppi, A., Lippi, A., and Tomei, P.E., "Essential oil of *Satureja montana* L.: Composition and yield of plants grown under different environmental conditions". *J. Essent. Oil Res.* 4, (1992), 563-568.
81. Agnani, H., "Essential oil constituents of *Cassia alata* from Gabon". *J. Essent. Res*, vol 17, (2005), 410-412.
82. Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Poli, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M., and Wright, A.V., "Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria". *J. Agric. Food Chem.*, 46, (1998), 3590-3595.
83. Kim, M.K., Choi, G.J., and Lee, H.S., "Fungicidal property of *Curcuma longa* L. rhizome-derived curcumin against phytopathogenic fungi in greenhouse". *J. Agric. Food Chem.* 51, (2003), 1578-1581.
84. Ultee, A., Slump, R.A., Steging, G.A., and Smid, E.J., "Antimicrobial activity of carvacrol towards *Bacillus cereus* on rice". *J. Food Prot.*, 63, (2000), 620-624.
85. Nychas, G.J.E., "Natural antimicrobial from plants", In G. W. Gould (ed), *New methods of food preservation*. Blackie Academic and professional, London, (1995), 58-89.
86. Davidson, P.M., "Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds" In MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville, *Food microbiology fundamentals and frontiers*, ASM Press, (1997), 520-556.
87. Singh, G., Marimutho, P., De Heluani, C.S., and Catalan, C.A., "Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components". *J. Agric. Food Chem.*, 54, (2002), 174-181.
88. Denyer, S.P., and Hugo, W.B., "Biocide induced damage to the bacterial cytoplasmic membrane". In S. P. Denyer & W. B. Hugo, *Mechanisms of action of biocides; their study and exploitation*, The Society for Applied Bacteriology, Technical Serie No 27. Oxford: Oxford Blackwell Scientific Publication, (1991), 171-188.
89. Tranter, H.S., Tassou, C.C., and Nychas, G.J., "The effect of the olive phenolic compounds, oleuropein, on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*". *Journal of Applied Bacteriology*, 74, (1993), 253-260.
90. Chukwujekwu, J.C., Coombes, P.H., Mulholland, D.A., and Van Staden, J., "Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*". *South African Journal of Botany* 72, (2006), 295-297.
91. Khan, M.R., Kihara, M., Omoloso, A.D., "Antimicrobial activity of *Cassia alata*". *J. Ethnopharmacol*, 72, (2000), 561-564.
92. Ranganathan, S., and Balajee, S.A., "Anti-cryptococcus activity of combination of extract of *Cassia alata* and *Ocimum sanctum*". *Mycoses* 43 (7-8), (2002), 299-30.
93. Somchit, N.M., Reezal, I., Elysha, I., and Mutalib, A.R., "*In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*". *Journal of Ethnopharmacognosy*, 84, (2003), 1-4.
94. Agarkar, S.V., and Jadge, D.R., "Phytochemical and pharmacological investigation of genus of *Cassia alata*". *Rev. Asian J. Chem.*, 11, (1993), 295-299.
95. Crockett, C.O., Guede-Guida, F., Pugh, D., Vangah-Hamda, M., Robinson, T.J., Olubadewo, J.O., and Ochillo, R.F., "*Cassia alata* and the preclinical search for the therapeutic agents for the treatment of opportunistic in AIDS patients". *Cell. Mol.Biol*, 38, (1992), 799-802.
96. Ibrahim, D., and Osman, H., "Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia". *J. Ethnopharmacol.*, 45, (1995), 151-156.
97. Yong-mi, K., Chi-Hoon, L., Hyo-Gyung, K., Hoi-Seon, L., "Anthraquinones isolated from *Cassia tora* seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, (2004), 6096-6100.
98. Mohammadi, Z., "Etude du pouvoir antibactérien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemsen". *Mémoire de Magister en*

- chimie appliquée, Département de Chimie, Université Aboubakr Belkaid Tlemcen, Algérie, (2006).
99. Djabou, N., "Sambucus nigra L. une plante de la Pharmacopée traditionnelle nord Africaine". Mémoire de Magister en chimie appliquée, Département de Chimie, Université Aboubakr Belkaid, Tlemcen, Algérie, (2006), 52-53.
  100. Lee, S.E., Hwang, H.J., Jeong, H.S., and Kim, J.H., "Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity". *Life Science* 73, (2003), 167-179.
  101. Arenz, A., Klein, M., Fieche, K., Grob, J., Drewke, C., Hemscheidt, T., and Leistner, E., "Occurrence of neurotoxic 4'-O- Methylpyridoxine in Ginkgo biloba leaves, Ginkgo Medication and Japanese Ginkgo". *Food, Planta Med.*, 62, (1996), 548-551.
  102. Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., and Aruoma, O.L., "Antioxydant activities of phenolic, proanthocyanidins, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*". *J. Agric. Food Chem*, 50, (2002), 5042-5047.
  103. Emerit, J., Edeas, M., and Bricaire, F., "Neurodegenerative diseases and oxidative stress". *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58, (2004), 39-46.
  104. Mates, J.M., Perez-Gomez, C., and Nunez de Castro, I., "Antioxydant enzymes and human diseases". *Clinical Biochemistry* 32, (1999), 595-603.
  105. Rosenkranz, H., "A paradigm for determining the relevance of short-term assays: application to oxidative mutagenesis". *Mutation Research* 508, (2002), 21-27.
  106. Ramade, F., "Ecotoxicologie". Masson 2<sup>ème</sup> Edition, Paris, (1979), 116 p.
  107. Yang, X.E., Baligar, V.C., Foster, J.C., and Martens, D.C., "Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in rye grass and maize grown with different nickel levels". *Plant Soil* 196, (1997), 271-276.
  108. Bin, C., Xiaouru, W., Lee, F.S.C., "Pyrolysis coupled with atomic absorption spectrometry for determination of mercury in chinese medicinal materials". *Anal Chim Acta*, 447, (2001), 161-9.
  109. Amit, K., and Gupta, S., "Phytoextraction capacity of the plants growing on tannery sludge dumping sites". *Bioresource Technology*, 98, (2006), 1788-1794.
  110. Salt, D.E., Blaylok, M., Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., and Raskin, I., "Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metal from the environment using plants". *Biotechnology, Journal of Phytochemistry*, 13, (1998), 468-474.
  111. Garbisu, L., and Alkorta, I., "Phytoextraction: a cost effective plant based technology for the removal of metals from the environment". *Bioresource. Technology*, 77, (2001), 229-236.
  112. Mazliak, P., "Nutrition et métabolisme". Hermann, Paris, (1981), 302 p.
  113. Patel, A.D., and Pandey, A.N., "Effect of salinity on growth, water status and nutrient accumulation in seedling of *Cassia Montana*". Department of Biosciences, Saurashtra University, Rajkot-360005, Gujrat, India, (2006).
  114. Marschner, H., "Mineral Nutrition of Higher Plants". London: Academic Press, 61-96. In Hopkins WG. *Physiologie végétale: Molécules et metabolism*, Ed. De boeck, Paris, (2003), 273-281.
  115. Tester, M., and Davenport, R., "Na<sup>+</sup> tolerance and Na<sup>+</sup> transport in higher plants". *Annals of Botany* 91, (2003), 503-527.
  116. Romheld, V., "Different strategies for iron acquisition in higher plants". *Physiologia Plantarum* 70, (1987), 231-234.
  117. Basgel, S., Erdemoglu, S.B., "Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey". *Science of the total environment* 359, (2006), 82-89.
  118. Alam, S.M., "Nutrient uptake by plants under stress conditions". In: Pessaraki M, Ed, *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker, Inc, (1994), 227-246.
  119. Munns, R., "Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypotheses". *Plant Cell Environ*; 16, (1993), 15-24.

120. Gil, P., Liu, Y., Orbovic, E., Verkamp, K.L., Poff, P., and Green, J., "Characterization of the auxin-inducible SAUR-ACI gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*". *Plant Physiology* 104, (1994), 777-784.
121. Abel, S., and Theologis, A., "Early genes and auxin action". *Plant Physiology*, 1119, (1993), 17 p.
122. Vanderhoelf, L.N., and Stahl, C.A., "Separation of two responses to auxin by means of cytokinin inhibition". *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, 72, (1975), 1822-1825.
123. Libbenga, K.R., and Mennes, A.M., "Hormone binding and its role in hormone action", In: Davies PJ (d) *Plant hormones and their role in plant growth an development*. Boston: Martinus Nijhoff, (1987), 194-221.
124. Webb, J.T., Banthorpe, D.V., and Watson, D.G., "Monoterpene synthesis in shoots regenerated from callus cultures", *Phytochemistry* 23 (4), (1984), 903 p.
125. Neergheen, V., and Bahorun, T., "Optimisation of growth and polyphenolic production in *Cassia fistula* callus cultures". *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.* 4, (2002), 181-185.
126. Pareilleux, A., and Vinas, R., "A study on the alkaloid production by resting cell suspensions of *Catharanthus roseus* in a continuous flow reactor", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19, 316 (1984).
127. El-Bahr, M.K., and Ghanem, S.A., "Responses of *Vigna sinensis* callus cultures to NaCl salinity", *J. Hort.* 17 (1), Egypt, (1990), 85 p.
128. Hussein, M.S., Reda, A.A., El-Bahr, M.K., Ghanem, S.A., "Effect of some amino acids on the growth and alkaloid production of *Datura stramonium* L. cultured *in vitro*", *J. Pharm. Sci.* 35 (1), Egypt, (1994), 561p.
129. Lindsey, K., and Yeoman, M.M., "The relationship between growth rate differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures". *J. Exp. Bot.* 34, (1983), 1055 p.
130. Godoy-Hernandez, G., and Loyola-Vargas, V.M., "Effect of fungal homogenate, enzyme inhibitors and osmotic stress on alkaloid content of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures". *Plant cell reports*, 10, (1991), 537 p.
131. Bohm, H., and Wittman, H.G., "Molecular Biology". *Biochemistry and Biophysics Berlin: Springer-Verlag*, (1977), 118-119.
132. Raj, P.P., and Abdulahi, N.I., "Occurences of anthraquinones in the leaves of *Cassia* species". *Nig. J. Pharm.* 9, (1978), 160-165.
133. Strobel, J., Hieke, M., and Georger, D., "Increased anthraquinone production in *Galium vernum* cell cultures induced by polymeric adsorbents". *Plant cell tissue Org Cult*, (1991), 24-207.
134. Kurosaki, F., Nagase, and H., Nishi, A., "Stimulation of anthraquinone production in rhubarb tissue culture by ethylene- generating reagent". *Phytochemistry*, 31, (1992), 2735 p.
135. Van-der-leer, T., Wijnsma, R., Van-der-Heijden, R., Verpoorte, R., and Baerheim, A., *Plant Physiol Biochem*, Paris, 29, (1994), 91 p.
136. Subbaiah, K.V., Mehta, A.R., and Shah, R.R., "Studies on polyphenol content in tissue cultures of *Datura* and *Cassia* grown on defined medium". In 3<sup>rd</sup> International Congress of Plant Tissue Culture, Leicester, (1974), 181 p.
137. Shah, R.R., Subbaiah, K.V., and Mehta, A.R., "Hormonal effect on polyphenol accumulation in *Cassia* tissues cultered *in vitro*". *Can. J. Bot.* 54, (1976), 1240-1245.
138. Mahesh, V. K., Sharma, R., Singh, R. S., 1984. Anthraquinones and kaempferol from *Cassia fistula* species. *J. Nat. Prod.* 47:733-751.
139. El Yacoubi, H., Rochdi, A., Koutoua, A., and Rachidai, A., "Sélection et évaluation de lignés de cals stables et tolérantes vis-à-vis du stress salin chez le citrange (Troyer) (*Citrus sinensis* (L) x *Poncirus trifoliata* (L) Raf.) ". CIRAD, EDP Sciences, (2004).
140. Papp, J.C., Balt, M.C., and Terry, N.A., "Comparative study of the effect of NaCl salinity on respiration, photosynthesis and leaf extension growth in *Beta vulgaris* L. (Sugarbeet)". *Plant Cell Environ.* 6, (1983), 675-677.

141. Leopold, A.C., and Willing, R.P., "Evidence for toxicity effects of salt on membrane". In: Tousivessen, R.C., Stales, G.H. 5Eds.), Salinity Tolerance in Plants. Wiley, New York, (1984), 67-76.
142. Zidane, I., Azaizeh, H., and Neumann, P.N., "Does salinity reduce growth in maize root epidermal cells by inhibiting their capacity for cell wall acidification". Plant Physiol. 93, (1996), 7-11.
143. Youssef, A.A., Rady, and M.R., Ghanem, S.A., "Growth and some primary products in callus cultures of *Nigella sativa* as influenced by various cultural condition and salt stress". Fitoterapia, LXIX (4), (1998), 329 p.
144. Tyagi, A.K., Rashid, A., and Maheshwari, S.C., "Sodium chloride resistant cell line from haploid *Datura innoxia* mill. A resistance trait carried from cell to plantlet and vice versa *in vitro*". Protoplasma 195, (1981), 327 p.
145. Chang, S.J., Doubler, C., Kilo, T.V., Suttner, R., Klein, J., Schmidt, M.E., Gibson, P.T., and Lignot, D.A., "Association of loci underlying field resistance to soybean sudden death syndrome (SDS) and cyst nematode (SCN) race 3". Crop Sci. 37, (1997), 965-971.
146. Zhu, J.K., "Plant salt tolerance". Trends Plant Sci. 6, (2001), 66-71.
147. Gomez, J.M., Hernandez, J.A., Jimenez, A.L., Del Rio, A., and Sevilla, F., "Differential response of antioxidant system of chloroplasts and mitochondria to long-term NaCl stress of pea plant". Free Rad. Res. 3, (1999), 11-18.
148. Hernandez, J.A., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J.J., and Sevilla, F., "Response of antioxidant systems and leaf water relations top NaCl stress in pea plant". New Phytol. 141, (1999), 241-251.
149. Arshi, A., Abdin, M.Z., and Iqbal, M., "Effect of CaCl<sub>2</sub> on growth performance, photosynthetic efficiency and nitrogen assimilation of *Cichorium intybus* L. grown under NaCl stress", Acta Physiol. Plant, 28, (2006), 137-147.
150. Friedrich, H., and Baier, S., "Studies on the components of senna leaves", Planta Med, 26, (1974), 193.
151. Kitanaka, S., Igarashi, H., and Takido, M., "Formation of pig- ments by the tissue culture of *Cassia occidentalis*", Chem Pharm Bull; 33, (1985), 971 p.
152. Robins, R.I., and Rhodes, M.J.C., "The production of anthraquinones by cell suspension cultures of *Cinchona ledgeriana*", Appl Microbiol Biotechnol, 24, (1986), 35 p.
153. Suzuki, H., Matsumoto, T., and Mikami, Y., "Effects of nutritional factors on the formation of anthraquinonones by *Rubia cordifolia* cells in suspension culture", Agric Biol Chem, 49, (1985), 519p.
154. Wijnsma, R., Van-Weerden, I.N, Ruighaver, J.E., Harkes, P.A.A., Verpoorte, R., and Baerheim-Svendsen, A., Proc Int Congr Plant Tissue Cell Cult 6<sup>th</sup>,(1986), Abstr 141.
155. Dornenburg, H., and Knorr, D.J., "Release of Intracellularly Stored Anthraquinones by Enzymatic Permeabilization of Viable Plant-Cells", Process Biochem, 27, (1992), 161 p.
156. Gonzalez-Olmedo, J.L., and Borroto, C.G., "Use of plant growth regulators to control flowering in Citrus", Biol Plantarum 29 (5), (1985), 342-349.
157. Brown, J.T., and Charlwood, B.V., "Differentiation and monoterpene biosynthetic in plant cell cultures". In: Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures (eds Morris, P., Scragg, A. H., Stafford, A. and Fowler, M. W.), Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, (1986), 68-74.
158. Han, Y.S., Van-der-Heijden, R., and Verpoorte, R., "Improved anthraquinone accumulation in cell cultures of *Cinchona* `Robusta` by feeding of biosynthetic precursors and inhibitors". Plant Cell Tissu. Org. Cult. 67, (2001), 201-220.
159. Collin, H.A., Musker, D., and Britton, G., "Flavour production in onion tissue culture". In Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures (Eds Morris, P., Scragg, A. H., Stafford, A. and Fowler, M. W.), Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, (1986), 54-62.