

**UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences Agronomiques Vétérinaires et Biologiques**

Département de Biologie

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité: Biotechnologie Végétale

**ÉTUDE ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE D'UNE PLANTE  
MÉDICINALE À CARACTÈRE THÉRAPEUTIQUE,  
*ARISTOLOCHIA LONGA L.***

Par

**BENSALAH Latifa**

Devant le jury composé de

S. A SNOUSSI	Professeur, U. de Blida	Président
N. BOUCHENAFI	Maître de conférence, U. de Blida	Examinatrice
A. BERBER	Maître de conférence, U. de Blida	Examineur
F. SAIDI	Maître de conférence, U. de Blida	Rapporteur
H. CHERIF	Chargé de cours, U. de Blida	Co-rapporteur

Blida, Mars 2009

## RESUME

Cette étude a porté sur quelques caractères biochimiques de *Aristolochia longa* L., principalement la teneur en acide aristolochique.

L'analyse de la fraction minérale des cendres par chromatographie ionique et par spectrométrie d'absorption atomique montre que le sodium (40%) et le calcium (30%) sont les cartions majoritaires. Dans les anions le nitrite est dominant. Il représente 46% des anions détectés.

La caractérisation de certains métabolites secondaires révèle que les acides phénols, les tanins catéchiques et les quinones sont présents dans les feuilles et dans les tubercules. Les alcaloïdes se trouvent uniquement dans les tubercules alors que les flavonoïdes et les flavones ont été caractérisés dans les feuilles seulement. *Aristolochia longa* L. est pauvres en saponines.

La purification de l'acide aristolochique révèle que *Aristolochia longa* L. est riche en cet acide. Sa teneur dans les feuilles (0,0099%) est plus faible, en période de floraison, comparativement avec celle des tubercules (0,025%). Après maturité des graines, la teneur en acide aristolochique des tubercules augmente (0,0698%).

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de l'acide aristolochique purifié ainsi que les extraits alcooliques nous a permis d'identifier les acides aristolochiques I et II dans les feuilles et dans les tubercules.

Le test du pouvoir antibactérien de la concrète alcoolique et de l'acide aristolochique purifié des tubercules révèle qu'ils sont actifs sur *Proteus vulgaris*. La concrète alcoolique est aussi active sur *Bacillus subtilis*.

Mots clés: *Aristolochia longa* L., caractérisation biochimique, métabolites secondaires, acide aristolochique I, acide aristolochique II, pouvoir antibactérien.

## SUMMARY

This study carried on some biochemical characters of *Aristolochia longa* L., mainly its aristolochic acid content.

The analysis of mineral matter of ashes by ionic chromatography and atomic absorption shows that sodium (40%) and calcium (30%) are the majority cations. In the anions, nitrite is dominating. It represents 46% of the detected anions.

The characterization of some secondary metabolites reveals that phenol acids, tannins catechic and quinones are present in leaves and roots. The alkaloids are detected only in the roots whereas flavonoids and flavones are characterized in leaves only. Content of saponins of *Aristolochia longa* L. is low.

The aristolochic acid purification reveals that *Aristolochia longa* L. is rich with this acid. Its content in the leaves (0,0099%), in flowering period, is weaker comparatively with its content in the roots (0,025%). After maturity of seeds, the aristolochic acid content of roots increases (0,0698%).

The analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) of the purified aristolochic acids and alcoholic extracts enabled us to identify aristolochic acids I and II in the leaves and roots.

Antibacterial activity test of alcoholic extract and aristolochic acid purified from roots reveals that are active on *Proteus vulgaris*. Alcoholic extract is also actives on *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Aristolochia longa* L., biochemical characterization, secondary metabolites, aristolochic acid I, aristolochic acid II, antibacterial activity.

## الملخص

، تحديداً تهدف هذه الدراسة إلى إظهار بعض الخصائص الكيميائية الحية (الخصائص البيوكيميائية) للزراوند الطويل ، أظهر تحليل الجزء المعدني (*Aristolochia longa* L. (Acides aristolochiques) محتواه من الأحماض الزراوندية بطريقة التسجيل التوني الشاردي (الطريقة الكروماتوغرافية الشاردية) و طريقة القياس الطيفي للامتصاص الذري أن للرماد يمثلان الشوارد الموجبة الغالبة. في الشوارد السالبة، النيتريت هو الشاردة السددة (%) و الكالسيوم (30%) الصوديوم (40) إذ يمثل 46 من الأيونات المكشوفة.

، التانات الكاتيشية (acides phénols) بين تمييز بعض المركبات الثانوية أن الأحماض الفينولية توجد في الأوراق و الدرنات. تتميز الدرنات باللكلويد (quinones) و الكينون (tanins catéchiques) . (flavones) و الفلافون (flavonoïdes) أما الأوراق فلها تحتوي على مركبات الفلافونويد (alcaloïdes) . أن الزراوند الطويل غني بهذا المركب. في فترة الإزهار، (acide aristolochique) بين استخلاص الحمض الزراوندي ( من هذا الحمض. في (0,025% من الحمض الزراوندي أقل بكثير من محتوى الدرنات (0,0099% محتوى الأوراق (0,0698%) فترة ما بعد نضوج البذور، محتوى الدرنات من الحمض الزراوندي يرتفع .  
سمح تحليل الحمض الزراوندي النقي و المستخلص الكحولية بطريقة التسجيل التوني السائلة ذات النتائج القياسية بتعيين في الأوراق و الدرنات. II و الأحماض الزراوندية  
أظهر اختبار الفعالية ضد البكتيرية للمستخلص الكحولي و الحمض الزراوندي النقي المستخلص من الدرنات انهما فعالان ضد *Bacillus subtilis*.. للمستخلص الكحولي فعالية أيضا ضد *Proteus vulgaris*

، فعالية II، الحمض الزراوندي المفاتيح : الزراوند الطويل، التمييز البيوكيميائي، المركبات الثانوية، الحمض الزراوندي ضد البكتيريا.

## REMERCIEMENT

Au terme de ce travail je tiens à remercier en premier Dieu pour m'avoir donné la santé, le courage, la volonté et la patience afin de mener à bien ce travail.

Mes remerciements s'adressent ensuite à mes parents qui sont la force de tout succès dans ma vie, ainsi que mes frères (Yacin, Ayoub et Walid) pour leurs encouragements.

Ce travail a été effectué sous la direction de Madame SAIDI et Madame CHERIF. Je voudrais leur exprimer ici ma profonde gratitude pour les nombreux conseils qu'elles m'ont prodigués tout au long de ce travail, leurs encouragements incessants et leur aide.

Qu'il me soit permis également de remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont facilité la réalisation de ce travail, en particulier:

- Dr HAMAIDI, chef de département de Biologie, pour l'intérêt qu'il a porté à ce mémoire,
- Dr OUSSADOU, chef de département adjoint chargé de la post-graduation et de la recherche scientifique- Département de Biologie, pour sa confiance, son aide et ses conseils,
- Dr BOUTOUMI, Chargé de cours – Département de Chimie industrielle, pour sa patience et son aide précieuse.

Je tiens à remercier profondément et sincèrement toutes les personnes du complexe Antibiotical de Médéa-groupe SAIDAL, en particulier:

Mr BOUKALKAL, Directeur des ressources humaines, pour m'avoir facilité l'accès au complexe,

- Mr BENZINA, Mr TAIB, Mr KERMICH et toute l'équipe du laboratoire de physico-chimie pour leur disponibilité et leur aide,
- Mr BENAOUDA et toutes les personnes de la cellule HPLC qui m'ont aidé à manipuler à l'HPLC.
- Le directeur du hall technique du centre universitaire de Médéa pour la facilité qui m'a offert pour réaliser des analyses de HPLC.

Mes vifs remerciements s'adressent à Mr NEMRI pour sa patience, sa collaboration, son encouragement et son aide.

Je suis très honoré que Mr SNOUSSI, professeur de l'université de Blida, ait accepté de présider le jury de ce mémoire.

Que Mr BERBER et Mme BOUCHENAFa trouvent ici l'expression de ma grande satisfaction pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.

Je tiens à remercier tous mes enseignants et mes collègues du Département de Biologie et toutes les personnes qui m'ont aidé et ont voulu voir le fruit de ce travail.

## TABLE DES MATIERES

RESUME.....	
REMERCIEMENT.....	
TABLE DES MATIERES.....	
LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX.....	
INTRODUCTION.....	12
1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
1.1 Généralités sur les Aristoloches.....	14
1.2 <i>Aristolochia longa</i> L.....	21
1.3 Etapes d'études d'une plante médicinale.....	27
1.4 Techniques d'étude d'une plante médicinale.....	31
2. MATERIAUX ET ESSAIS.....	36
2.1 Introduction.....	36
2.2 Matériaux utilisés.....	37
2.3 Essais.....	38
3. ANALYSES ET INTERPRETATION DES RESULTATS.....	53
3.1 Résultats et interprétation.....	53
3.2 Discussion.....	90
CONCLUSION .....	101
REFERENCES.....	
GLOSSAIRE.....	

## LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	<i>Aristolochia longa</i> L.	20
Figure 1.2	Tubercule de <i>Aristolochia longa</i> L.	22
Figure 1.3	Partie aérienne de <i>Aristolochia longa</i> L.	22
Figure 1.4	Fleur de <i>Aristolochia longa</i> L.	23
Figure 1.5	Fruit de <i>Aristolochia longa</i> L.	24
Figure 2.1	Echantillon de <i>Aristolochia longa</i> L.	37
Figure 2.2	Principe de la chromatographie ionique	41
Figure 2.3	Principe de la spectrophotométrie UV-visible	45
Figure 3.1	Position des étamines par rapport à l'ovaire	53
Figure 3.2	Coupe transversale de la partie supérieure de l'ovaire	54
Figure 3.3	Coupe transversale au niveau de l'ovaire	54
Figure 3.4	Coupe transversale de la tige	56
Figure 3.5	Grains de pollen de <i>Aristolochia longa</i> L.	57
Figure 3.6	Chromatogramme des cations	



Figure 3.7	Chromatogramme des anions	58
		59
Figure 3.8	Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des tubercules	62
Figure 3.9	Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des feuilles	63
Figure 3.10	Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des tubercules	65
Figure 3.11	Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des feuilles	66
Figure 3.12	Résultats de la chromatographie sur couche mince	68
Figure 3.13	Composition des tubercules	70
Figure 3.14	Analyse du standard par HPLC	71
Figure 3.15	Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC	72
Figure 3.16	Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC	73
Figure 3.17	Analyse de l'acide aristolochique purifié des feuilles par HPLC	75
Figure 3.18	Composition de l'acide aristolochique purifié des feuilles en période de floraison	76
Figure 3.19	Analyse de l'acide aristolochique purifié de tubercules par HPLC	76
Figure 3.20	Composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules	

	en période de floraison	78
Figure 3.21	Analyse du standard par HPLC	79
Figure 3.22	Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC	80
Figure 3.23	Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC	81
Figure 3.24	Analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules par HPLC	82
Figure 3.25	Analyse du mélange des deux acides aristolochiques purifiés des tubercules par HPLC	84
Figure 3.26	Composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules après maturité des graines	85
Figure 3.27	Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche des tubercules	87
Figure 3.28	Teneur en acide aristolochique dans la concrète alcoolique des tubercules	87
Figure 3.29	Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche et la concrète alcoolique des feuilles en période de floraison	88
Figure 3.30	Résultats du test antibactérien	89
Tableau 1.1	Quelques terpènes des espèces <i>Aristolochia</i>	18
Tableau 1.2	Quelques composés chimiques de <i>Aristolochia longa</i> L.	25
Tableau 1.3	Principales réactions de caractérisation des métabolites	29

	secondaires	42
Tableau 2.1	Conditions de l'analyse par chromatographie ionique	47
Tableau 2.2	Les révélateurs et les métabolites secondaires recherchés dans la concrète alcoolique de <i>Aristolochia longa</i> L.	57
Tableau 3.1	Résultats de la teneur en eau	58
Tableau 3.2	Teneur en cendres des tubercules	59
Tableau 3.3	Cations détectés par chromatographie ionique	59
Tableau 3.4	Anions détectés par chromatographie ionique	60
Tableau 3.5	Résultats de la spectrométrie d'absorption atomique	61
Tableau 3.6	Teneur en azote total et en protéines dans les tubercules	61
Tableau 3.7	Teneur en composés apolaires des tubercules et des feuilles	62
Tableau 3.8	Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des tubercules	63
Tableau 3.9	Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des feuilles	64
Tableau 3.10	Teneur en composés polaires des tubercules et des feuilles	65
Tableau 3.11	Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des feuilles	66

Tableau 3.12	Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des tubercules	68
Tableau 3.13	Résultats de la caractérisation des métabolites secondaires	69
Tableau 3.14	Taux de migration ( <i>Rf</i> ) des métabolites secondaires caractérisés	70
		72
Tableau 3.15	Teneur en acide aristolochique dans les feuilles et les tubercules	73
Tableau 3.16	Résultats de l'analyse du standard	74
Tableau 3.17	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des feuilles	75
Tableau 3.18	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des tubercules	77
Tableau 3.19	Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des feuilles	79
Tableau 3.20	Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules	80
		81
Tableau 3.21	Résultats de l'analyse du standard	
Tableau 3.22	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des feuilles	82
Tableau 3.23	Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des tubercules	84
Tableau 3.24	Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules	89
Tableau 3.25	Résultats du test de confirmation	
Tableau 3.26	Résultats du test antibactérien	

## INTRODUCTION

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires pour la défense et la survie dans l'écosystème. Il est estimé que chaque végétal produit au moins une centaine de ces molécules [1]. Certains de ces métabolites sont responsables de l'action physiologique et par suite de l'utilisation thérapeutique des drogues, ils sont appelés principes actifs [2].

Les métabolites secondaires sont recherchés parce qu'ils sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques qui promouvoient des effets de santé. Ces activités comprennent des activités antibactériennes, anticancéreuses, antifongiques et antioxydantes utilisées dans les secteurs industriels de l'agriculture, de l'alimentation et pharmaceutiques [3]. Afin de découvrir de nouveaux composés bioactifs, plusieurs techniques d'extraction et de purification d'un métabolite secondaire sont utilisées tel : l'extraction par solvant, chromatographie sur couche mince (CCM), chromatographie liquide à haute performance (HPLC), chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) et la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse et à la spectrométrie de résonance magnétique (CL- MS- RMN) [3].

Les métabolites secondaires existent chez tous les végétaux, mais leur nature chimique diffère selon les taxons [1]. Le taxon des *Aristolochiacées* est utilisé en médecine traditionnelle depuis l'époque gréco-romaine. Les extraits des différentes aristoloches sont connus par leurs effets pour faciliter les accouchements, comme toniques, fébrifuges, antispasmodiques, purgatives et autres [4].

L'étude de ces extraits a révélé essentiellement des acides aristolochiques et dérivés, dont la structure particulière est caractéristique de la famille des *Aristolochiacées* [4].

En outre, la composition du sol, le climat, la période de récolte, la conservation et la dessiccation du matériel végétal peuvent influencer sur la composition chimique de la plante [5].

Ainsi, la séparation et la purification du principe actif essentiel, l'acide aristolochique, ont permis aux pharmacologues de reprendre l'examen des différents aspects des propriétés thérapeutiques attribuées à la famille des *Aristolochiacées*. Elle permet aussi de vérifier que l'acide aristolochique est bien responsable des propriétés observées parmi lesquelles les propriétés antibactériennes et antitumorales sont les plus intéressantes [4]. Mais le pouvoir mutagène, génotoxique et cancérigène de ce principe actif rend les plantes *Aristolochia* toxiques. Par conséquent, plusieurs pays ont interdits tout produit contenant l'acide aristolochique [6]. Néanmoins, une étude ethnobotanique a montré que *Aristolochia longa* L. est toujours utilisée en Algérie [7].

Dans cette étude nous avons entamé l'étude biochimique de *Aristolochia longa* L.. C'est une espèce de la famille des *Aristolochiacées*, distribuée particulièrement dans la région méditerranéenne.

Ainsi, les objectifs de ce travail sont :

- Caractérisation de quelques métabolites secondaires de *Aristolochia longa* L.,
- Détermination de la teneur en acide aristolochique des feuilles et des tubercules pour estimer la toxicité de cette espèce,
- Test du pouvoir antibactérien de quelques extraits des tubercules de *Aristolochia longa* L., en particulier l'acide aristolochique qui est connu par son activité antibactérienne.

# CHAPITRE 1

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 Généralités sur les *Aristolochiacées*

#### 1.1.1 Caractères généraux des *Aristolochiacées*

*Aristolochia* est un terme grec dérivant de deux mots : *aristos* = meilleur et *lokhos* = accouchement, qui font référence aux qualités abortives et emménagogues des plantes du genre *Aristolochia* [8].

La famille *Aristolochiaceae* est une famille [9], [10] de plantes dicotylédones [10], [11] qui étaient, dans l'antiquité, considérées comme plantes médicinales [8]. Cette famille botanique comprend approximativement 625 espèces [9]. Elles sont réparties en 7 genres [9], [18]. Parmi ces derniers, *Aristolochia* et *Asarum* sont les plus importants [9]. Les *Aristolochiacées* sont des plantes herbacées ou des lianes [10]. Elles existent, plus rarement, sous forme de buisson [10].

Les feuilles sont plus fréquemment alternées, pétiolées, simples et entières [12], [13], [14], [15]. Le limbe peut parfois être bilobé [12] ou trilobé [13]. Les feuilles présentent une nervation palmée [12], [10]. Les stipules sont généralement absentes [12].

Les fleurs des *Aristolochiacées* sont hermaphrodites actinomorphes [12], [10] ou zygomorphes [16], [12], [10]. Le calice est formé de trois sépales soudés [10], [15]. Il est tubulaire, en forme de S ou en pipe [10]. Il présente trois lobes étalés ou un lobe de grande taille [10]. Le Périanthe caduc est irrégulier, tubuleux en languette et poilu à l'intérieur [15]. Les étamines sont insérées sur l'ovaire. Leur nombre varie de 6 à 12

selon les genres [11]. Les Carpelles, de 4 à 6, sont souvent soudées mais libres chez *Saruma*. L'ovaire est semi-infère ou infère [10]. Il est uniloculaire ou pluriloculaire de 4 à 6 loges [10], [15]. La placentation est axiale ou pariétale. Les stigmates, au nombre de 4 à 6, sont souvent lobés. Les ovules sont nombreux, nectaires souvent formés par tâches de poils glanduleux sur le tube du calice [10], [15].

A l'exception du genre *Saruma*, qui produit des follicules [12], les fruits sont des capsules [12], [10], [11] ressemblant parfois à des nucelles [12] ou à une baie à 3 ou 5 loges [11]. Chacune de ces loges renferme un grand nombre de graines [10]. Ces graines renferment un abondant albumen cartilagineux à réserves oléagineuses ou plus rarement amylacées [12]. Elles sont souvent pendantes et déhiscentes à partir de la base aplatie [10]. Elles sont ailées ou associées à un tissu charnu [10]. Elles contiennent un embryon très petit, enfermé dans un endosperme charnu [11].

#### 1.1.2 Distribution des Aristoloches

Les *Aristolochiacées* sont surtout tropicales [16], [17], [12], [18], [9], [10] et subtropicales [16], [17], [18]. Elles vivent ainsi dans les régions tempérées [17], [12], [10], [19], [20], [21], dans la région méditerranéenne en particulier [16], [9]. La famille des *Aristolochiacées* se rencontre sur tous les continents à l'exception de l'Australie [12], [10].

#### 1.1.3 Reproduction des Aristoloches

La biologie florale des aristoloches offre des particularités remarquables [10]. Elle présente une nette adaptation à la pollinisation par les insectes [10]. Les fleurs des *Aristolochiacées* sont pollinisées par les diptères [17], [10], les arthropodes en particulier [16]. Le syndrome de la pollinisation est particulièrement spécialisé chez les espèces du genre *Aristolochia* dont les fleurs réalisent un piège très élaboré au moyen du calice hautement adapté [17], [10]. Les insectes sont attirés par la couleur [10] et les odeurs ammoniacales [12]. Les insectes chargés de pollen sont piégés dans la partie inférieure du tube calycinal [16], [12], [10], où ils ne peuvent pénétrer que par une étroite ouverture, souvent pourvue de poils dirigés vers le bas [10]. Durant la première étape de la vie florale, le pollen est déposé au sommet du gynécée sur les stigmates



réceptifs qui sont étalés au-dessus des anthères toujours fermées [16], [10]. Après la pollinisation, les stigmates se fanent et prennent une position dressée [12], [10]. Ils exposent à ce moment les anthères qui deviennent déhiscentes [16], [12], [10]. Les insectes sont saupoudrés de pollen et peuvent émerger du calice [16], [12], [10] après que les poils dirigés vers le bas et / ou le tube du calice soient fanés [10].

Les graines des espèces du genre *Aristolochia*, typiquement aplaties, sont disséminées par le vent. D'autres espèces sont hydrochores, elles possèdent des graines visqueuses permettant un transport externe par les animaux [10].

Les espèces de la famille des *Aristolochiacées* préfèrent les endroits ombrés, sur un sol frais et poreux [13]. Les aristoloches présentent une inflorescence variable : en grappe [3], [13], cyme, corymbe [12] ou fleurs solitaires axillaires [13], [22]. La floraison a lieu au printemps ou en été [13].

#### 1.1.4 Composition chimique des Aristoloches

Les principaux composants chimiques des *Aristolochiacées* sont : l'acide aristolochique, l'aristolochine (un alcaloïde hautement toxique), l'acide malique, les tanins, les résines, l'allantoïne, la phytostérine [2], l'huile essentielle [21], les flavones, les terpènes, l'aporphine et les divers composés classiques des extraits végétaux [4].

#### Les principes amers :

Les principes amers ne forment pas un groupe chimique. Leur seule propriété commune est la saveur amère qui leur confère l'activité thérapeutique. Le nombre de plantes à saveur amère est très élevé. Certaines d'entre elles possèdent d'autres effets énergétiques et peuvent même être des poisons violents. De ce fait, les drogues contenant des principes amers sont utilisées à des doses bien choisies, celles qui ne manifestent pas de toxicité [5].

Les acides aristolochiques sont extraits à partir des feuilles et des racines des plantes du genre *Aristolochia*. Ce sont des dérivés d'acide carboxylique 3-4 méthyl-néodioxy-10-nitro-1-phénanthrène. Ces acides sont des substances jaunes, amères [21] et sont souvent accompagnés d'aristolactames : dérivés métaboliques de ces acides.

Jusqu'à l'année 2002, il a été mentionné 29 acides aristolochiques et 23 aristolactames dans les différentes *Aristolochiacées* [23], [24].

L'acide aristolochique a longtemps été prescrit comme régulateur du flux menstruel [25]. Il augmente la phagocytose des globules blancs [25], [26], [27]. Il présente des propriétés cicatrisantes pouvant être mise à profit au cours du traitement des fistules, ulcères, furonculoses, acnés rebelles, infections gynécologiques et urinaires [25]. L'acide aristolochique stimule le système immunitaire [26], [27], [28] et inactive le venin des serpents [29]. L'acide aristolochique est utilisé en médecine traditionnelle comme anti-inflammatoire [30], [23], [31], diurétique et analgésique [32]. Il est aussi inhibiteur de tumeur [31], [28], [21], anticancer [28], antibactérien [21], [31], antifongique et antiviral [31].

### Les terpènes

Ce sont des lipides construits à partir d'un motif de base : l'isoterpène, molécule insaturée à cinq carbone [1]. Selon le nombre d'unités isoterpéniques qui les constituent, il existe : les monoterpènes en C<sub>10</sub>, les sesquiterpènes en C<sub>15</sub>, les diterpènes en C<sub>20</sub>, les triterpènes en C<sub>30</sub>, les tétraterpènes en C<sub>40</sub> [33], [34], [35], [21] et les polyterpènes [34], [2]. Plus de 200 terpènes ont été isolés et caractérisés chez les espèces du genre *Aristolochia*. Ils contiennent, principalement, des diterpènes, sesquiterpènes ainsi que des monoterpènes, triterpènes et des tetraterpènes [18].

### Les huiles essentielles

Les huiles essentielles, appelées parfois essences, sont des mélanges complexes de substances fluides, volatiles, à odeur aromatique agréable. Elles se forment à l'intérieur des cellules spécialisées [36]. Une huile essentielle est un mélange complexe qui renferme principalement des terpénoïdes et, dans certains cas, des dérivés phénylpropaniques [33].

Une étude sur plusieurs espèces du genre *Aristolochia* originaire du Brésil montre que l'huile essentielle de ces plantes contient (Tableau 1.1) : des composés aliphatiques (alcane, alcène, alcool, aldéhyde, cétone, acide gras et des esters

aliphatiques), des terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes et sesquiterpènes oxygénés) et des composés aromatiques [37].

Tableau 1.1 : Quelques terpènes des espèces *Aristolochia*

Type de terpène	Certains composés
Monoterpènes	Largement distribués dans les huiles essentielles des espèces <i>Aristolochia</i> , surtout sous forme cyclique. Exemples : menthane et pinane [18].
Sesquiterpènes	Plus de 24 types de sesquiterpènes ont été rapportés au genre <i>Aristolochia</i> dont les principaux : cadinène, aristolène, germacrène et bicyclogermacrène [18].
Diterpènes	Vaste groupe de composés dérivés de géranyl-géranyl-pyrophosphate [18].
Triterpènes	Groupe de divers composés dérivés du squalène tel que le lupeol et l'acide ursolique [18].
Tetraterpènes	Résultent de l'association de deux molécules géranyl-géranyl pyrophosphate tel que le loliolide et les apocaroténoïdes [18].

## Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Presque toujours hydrosolubles. Ils sont responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois même de celle des feuilles [35]. Les Flavonoïdes sont présents dans les cellules superficielles et jouent un rôle d'écran vis-à-vis des effets nocifs du rayonnement ultraviolet [34].

## Les tanins

Historiquement, l'importance des drogues à tanins est liée à leurs propriétés tannantes [35] c'est-à-dire à la propriété qu'ils ont de transformer la peau fraîche en un matériau imputrescible qui est le cuir [33], [35], [38]. Les tanins sont des composés polyphénoliques [38] hydrosolubles [35], [34] ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3 000 [33], [35], [38]. Ils précipitent les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [33], [35]. Ils sont réputés par leur action astringente [36], [38].

## Les alcaloïdes

Le terme alcaloïdes a été introduit par W. MESNER au début du XIX<sup>ème</sup> siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases donc comme des alcalis [35], [38], [2]. Les alcaloïdes ont des masses moléculaires variant de 100 à 900 [35]. Ce sont des substances organiques complexes [36]. Ils sont doués à faibles doses de propriétés biologiques marquées [35]. Ils agissent particulièrement sur le système nerveux central et le système nerveux sympathique ou parasympathique [36].

Les aristolactames font partie des alcaloïdes naturels de type aporphinique dérivant des isoquinoléines. Ils constituent une partie des produits naturels extraits des diverses parties de végétaux appartenant essentiellement aux familles des *Aristolochiacées* et des *Annonacées*. Des études pharmacologiques ont fait mention des activités cytotoxiques et antitumorales pour certains éléments de cette famille [39].

## Résines

Ce sont des substances colloïdales. Elles résultent de l'action de l'oxygène sur les terpènes [36]. Ce sont des produits de constitution complexe, souvent formés dans un appareil sécréteur et définis par un ensemble de propriétés physiques. Ce sont des substances amorphes, dures à la température ordinaire mais se ramollissent par chauffage. Elles sont souvent transparentes ou translucides, à cassure colloïdale brillante [2].

### 1.2 *Aristolochia longa* L.

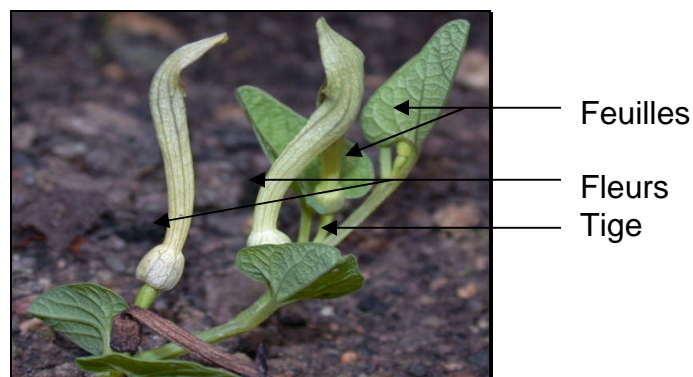


Figure 1.1: *Aristolochia longa* L. [49].

*Aristolochia longa* L. (Figure 1.1) est connue sous le nom de "Zarraound ettawil" [40] ou "gittsa el haya" [41], [42]. Le nom générique de *Aristolochia longa* L. dérive de deux mots grecs, rappelant l'emploi des aristoloches pour faciliter l'accouchement. Le terme *longa* s'applique à la souche allongée [41].

### 1.2.1 Classification de *Aristolochia longa* L.

La classification de *Aristolochia longa* L. selon MAIRE [15] est la suivante :

- Règne : *Végétal*
- Embranchement : *Spermaphytes*
- Sous Embranchement : *Angiospermes*
- Classe : *Dicotylédones*
- Sous Classe : *Apétales*
- Ordre : *Aristolochiale*
- Famille : *Aristolochiaceae*
- Genre : *Aristolochia*
- Espèce : *A. longa*

### 1.2.2 Généralités sur *Aristolochia longa* L.

*Aristolochia longa* L. est une plante vivace à souche tubéreuse [41]. Le tubercule est cylindrique, napiforme, ou ovoïde parfois lobé, verticale [15] et ligneux [50] (Figure 1.2). Il s'amincie vers son extrémité chez les jeunes individus, sans disque dans les individus âgés cet amincissement est presque insensible [40]. Le tubercule est brun et rugueux extérieurement [40], de couleur jaunâtre [40] et roussâtre intérieurement [44] (Figure 1.2).

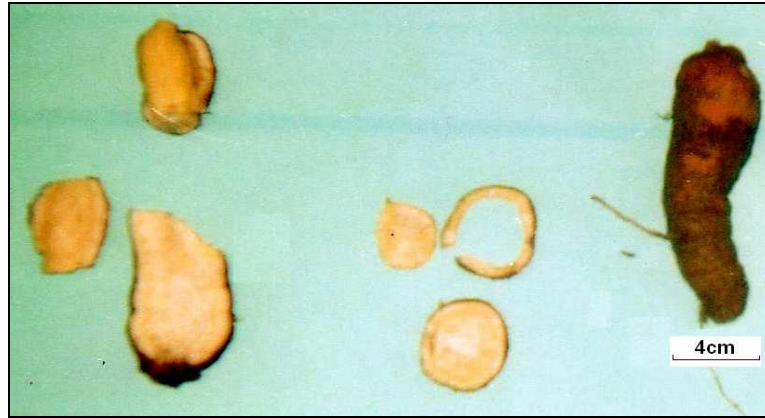


Figure 1.2: Tubercule de *Aristolochia longa* L.. (Photo d'origine)

La tige de *Aristolochia longa* L. est faible, grêle [40], dressée [14], [15], [41] (Figure 1.3 A) et quadrangulaire [15], [45] (Figure 1.3 B). La longueur de la tige varie 30-80 cm [15], [41] mais elle peut atteindre 1m [46]. Elle est glabre ou légèrement pubescente portant à la base quelques écailles [15].



Figure 1.3: Partie aérienne de *Aristolochia longa* L. [43].

Les feuilles sont persistantes, entières, coriaces [43], alternées et pétiolées [14], [15], [41], [47] (Figure 1.3 A). Elles sont largement ovales-cordiformes [41], [40] (Figure 1.3 C). Elles présentent des nervures en réseau [41] (Figure 1.3 C). Elles sont de couleur vert foncé en dessus, vert un peu glaucescent en dessous [15].

Les fleurs de cette espèce sont axillaires [14], [15], [40], solitaires [41], [15], [40], à pédicelles naissant à l'aisselle des feuilles [41] (Figure 1.4 A). Le périanthe est tubuleux renflé à sa base [41], atteignant 5 cm de long [41] parfois 8 cm [15]. La couleur de la fleur est verdâtre ou jaunâtre [15] marquée de rayures brunes [41], [15] (Figure 1.4 A). Elle est tapissée intérieurement de poils épidermiques [51] (Figure 1.4 B). Le limbe est unilabié [15]. Il se termine par une languette triangulaire [41] (Figure 1.4 C).

Les six anthères sont portées sur le péristyle. L'ovaire est infère, oblong anguleux surmonté d'un style très court. Il se termine par un stigmate concave à six divisions [41].

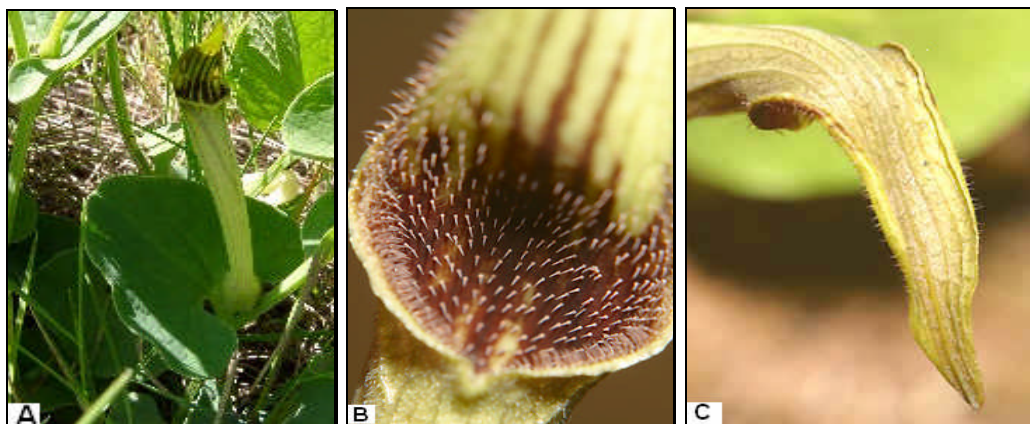
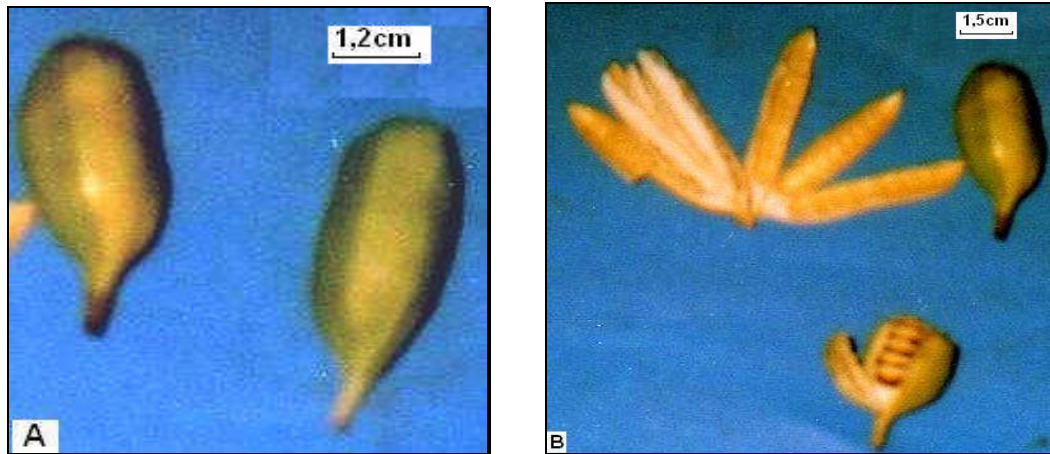


Figure 1.4 : Fleurs de *Aristolochia longa* L. [43].

Le fruit de *Aristolochia longa* L. est une capsule [14], [15], [40], [45] ovale, ressemblant à une petite poire [40], [45] (Figure 1.5 A), divisé intérieurement en 6 loges [40] par 6 valves [15] (Figure 1.5 B). La capsule est ellipsoïdale-subglobuleuse ou pyriforme, pendante, septicide à déhiscence commençant par le sommet [15].





a/ vue externe du fruit

b/ fruit ouvert

Figure 1.5 : Fruit de *Aristolochia longa* L. (photo d'origine)

Les graines sont aplaties, disposées horizontalement les unes sur les autres [40] (Figure 1.5.B). Elles sont brunes [15], [45], convexes et chagrinées sur une face, concave sur l'autre, avec un raphé charnu, saillant, très large [15] et roussées [45]. L'odeur est légèrement nauséuse, la saveur est vive, âcre et amère [40].

L'époque de floraison de *Aristolochia longa* L. se situe entre les mois de mars et mai [41]. Cette espèce évolue dans les endroits humides tels que les broussailles [41], sur des pâturages pierreux, argileux et sablonneux [48]. Elle montre aussi une distribution méditerranéenne [41].

### 1.2. 3 Composition chimique de *Aristolochia longa* L.

L'étude de cette espèce a été faite par plusieurs chercheurs. Les composés présents chez *Aristolochia longa* L. sont regroupés dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2 : Quelques composés chimiques de *Aristolochia longa* L.  
(Structure en appendice B)

Métabolites	Composés
Lipides	<p><u>Partie aérienne</u> : acides gras libres (40%) : acide palmitique, acide stéarique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique ; dérivés des acides gras tel : glycérides (9%), esters d'acides monohydroxyliques (15%), sitostérol (6%), alcools isopréniques (3%) ainsi que des squalènes (27%) [49].</p> <p><u>Tubercule</u> : acides gras : acide palmitique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique ; glycérides ; des esters éthyliques et isobutyliques de l'acide palmitique, oléique et linoléique, des sitostérols et d'autres composés non identifiés [49].</p>
Huiles essentielles	<p>Monoterpènes : acétate de bornyle , bornanol, pin-2-en-8-ol, 8-acetoxy-pin-2-ene et le (S)-Linalol.</p> <p>Sesquiterpènes : <math>\beta</math>- Caryophyllène, Oxyde de caryophyllène, <math>\Delta^{1(10)}</math> Aristolène et <math>\Delta^{1(10)}</math> Aristolone [50]</p>
Aristolactames	Aristolactame Ia [28]
Acides aristolochiques	Acide aristolochique I, acide aristolochique II, acide aristolochique IV, méthyle ester acide aristolochique IV et 2-Phénanthro-[3,4-d]-1,3-dioxole-6-nitro-5-acide carboxy –amido -propanique méthyle ester sodium aristolochate II [51], [28].

#### 1.2.4 Vertus de *Aristolochia longa* L.

*Aristolochia longa* L. présente des effets alexipharmques et alexitéres. Elle facilite le flux menstruel, l'accouchement et l'écoulement des lochies. L'infusion édulcorée de cette espèce est employée à titre de diurétique et d'emménagogue. *Aristolochia longa* L. est utilisée contre les chloroses, la leucophlegmatie, l'asthme humide, l'anorexie glaireuse [40] et comme tonique [40], [42]. Elle est stimulante et utilisée dans le traitement de la goutte [40]. Cette espèce est utilisée pour combattre les différentes espèces de catarrhe [40], [46].

*Aristolochia longa* L. dissipe les obstructions de la rate et les douleurs de côté. Une décoction de *Aristolochia longa* L., employée en fomentation ou en boisson, dissipe les affections de la matrice en débilitant les humeurs [52]. Cette espèce est céphalique, pectorale, hystérique et vulnérable. L'infusion des feuilles a été utilisée pour prévenir la phtisie ou l'ulcération des poumons qui accoutume de suivre le crachement de sang [53].

Le rhizome de *Aristolochia longa* L., en poudre, avec du beurre salé (smèn) est utilisé pour traiter des infections cutanées et la gangrène [54], [55]. L'ingestion de petites quantités de cette poudre avec du miel ou du beurre salé est aussi utilisée pour le traitement des douleurs abdominales et les infections de la partie supérieure du tractus respiratoire [54]. *Aristolochia longa* L. est connue par sa grande activité antibactérienne [56], [54], contre des souches anaérobies et aérobies [54], et anticancer [63], [18], en particulier en cas de sclérose, de cancer d'utérus et de cancer du nez [18].

Enfin, Bellakhdar (1997) donne aux racines de cette espèce les utilisations suivantes, qui récapitulent toutes ses vertus :

- en cas d'affections intestinales, ou de morsures de serpents,
- diurétique ou d'éméto-cathartique,
- pour remédier aux palpitations de l'aorte,
- la plante entière pour soigner les blessures ou lutter contre la teigne [58].

### 1.3 Étapes d'étude d'une plante médicinale

Le contrôle ou essai d'une drogue est particulièrement important. Il a pour but de vérifier son identité, de contrôler sa pureté, de s'assurer de sa qualité donc de son activité. Cet essai doit être effectué sur un échantillon moyen, prélevé au hasard. Il comprend un contrôle botanique, un contrôle physico- chimique, et éventuellement un contrôle physiologique [2], [38].

#### 1.3.1 Contrôle botanique

##### 1.3.1.1 Étude morphologique et analyse des caractères organoleptiques de la drogue

Cette étude comprend notamment l'examen de la drogue (à l'œil nu et à la loupe binoculaire), la reconnaissance de l'organe et la détection des éléments étrangers (poussières, moisissure, falsifications grossières). On prend en considération aussi l'odeur pour les plantes à essences ainsi que la saveur, exemple l'amertume, l'astringence pour les plantes à tanins [2], [38].

L'identification de la plante impose de connaître ses dénominations internationales qui sont les noms du genre et de l'espèce en latin. Ils sont complétés par le nom de l'auteur et éventuellement par la variété [59].

##### 1.3.1.2 Analyse microscopique

La recherche de certains tissus caractéristiques tels que : les poils épidermiques sécréteurs, les cellules sécrétrices épidermiques ou autres, les canaux excréteurs, fait l'objet d'une analyse microscopique des organes utilisés.

Le contrôle botanique vise donc à déceler la présence éventuelle d'éléments étrangers, les altérations, les substitutions, ou les falsifications. Il assure ainsi un premier contrôle d'identité et de pureté [2], [38].

### 1.3.2 Contrôle physico-chimique

Il complète le contrôle de l'identité et de la pureté. Il permet de doser les principes actifs et donne des renseignements sur l'activité de la drogue. Ce contrôle se divise en :

#### 1.3.2.1 Essais qualitatifs

Ils permettent d'identifier les drogues végétales par la mise en évidence de certains principes qui peuvent être actifs ou non, mais caractéristiques de la plante envisagée. Cette mise en évidence s'effectue par :

1- des tests physiques ou chimiques qui sont réalisés sur la drogue ou sur un extrait tel que l'examen en lumière ultraviolette. De nombreux essais de solubilité, de coloration et de précipitation sont effectués (Tableau 1.3). Ces dernières peuvent aussi servir à la caractérisation et au dosage des principes actifs en chromatographie sur couche mince ou sur papier [2], [38].

2- une séparation et une identification des différents principes par des micro-méthodes physico- chimiques : Une chromatographie sur papier, une chromatographie sur couche mince, une chromatographie en phase gazeuse, une électrophorèse, ainsi que des techniques combinées tel la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [2], [38].

Tableau 1.3 : Principales réactions de caractérisation des métabolites secondaires

Réactifs	Coloration ou précipitation	Substances caractérisées
Réaction de Leibermann : Anhydre acétique+acide sulfurique.	Bleu puis violet puis vert	Stéroïdes
Réaction de Carr et Price : trichlorure d'antimoine	Violet	Saponogénines.
Réaction de Borntraeger : potasse ou soude	Rouge	Anthraquinones.
Chlorure ferrique	Bleu- noir	Tanins galliques
	Brun- vert	Tanins catéchiques.
Réaction de la Cyanidine : magnésium +acide chlorhydrique	Rose-orangé ou rouge	Flavonoïdes
Réactif de Baljet : acide picrique	Orangé	Cardénolides
Réactif de Kadde : acide dinitro-3-5-benzoïque	Rouge violacé	Cardénolides
Réactif de Raymond-Marthoud : m-dinitrobenzène	Violet fugace	Cardénolides
Papier picrosodé	rouge	Hétérosides cyanogénétiques
Réactif de Mayer : solution neutre de mercuriodure de potassium	Précipité blanc	Alcaloïdes
Réactif de Dragendorff : solution acide d'iodobismuthite de potassium	Précipité rouge orangé	Alcaloïdes
Réactif de Bouchardat : solution d'iode de potassium iodé	Précipité brun	Alcaloïdes

### 1.3.2.2 Essais quantitatifs

#### Dosage de l'eau

Les végétaux frais sont très riches en eau. En effet, les feuilles en contiennent 60 à 80% et les tissus lignifiés 40 à 50%. Pour une bonne conservation des drogues, la teneur en eau doit être inférieure à 10%. Il est important de la connaître puisqu'elle influe directement sur celle des principes actifs [38].

#### Dosage des cendres

Le dosage des éléments minéraux est toujours préconisé. Il permet de déceler les falsifications par des charges minérales, ou les souillures par la terre au moment de la récolte de divers organes végétaux [2], [38].

#### Dosage des principes actifs

Il permet, en général, d'apprécier la qualité de la drogue. Il commence toujours par une extraction et une purification des principes à doser. Le dosage des principes actifs fait appel à des techniques diverses. Celles-ci dépendent essentiellement de la nature chimique des principes actifs et de leur quantité présumée dans la drogue [2], [38].

### 1.3.3 Contrôle physiologique

Cet essai consiste à déterminer l'action de la drogue sur un être vivant animal (et quelques fois végétal) intact ou sur un organe isolé maintenu en survie. Lorsque cette action est évaluée, on a un dosage biologique [38]. L'essai physiologique d'une drogue comprend deux parties :

### 1.3.3.1 Détermination de la toxicité

Il existe deux types de toxicité :

- la toxicité aiguë : correspond à la recherche de la dose minimale létale ou la dose létale 50%.
- la toxicité chronique à moyen et à long terme.

### 1.3.3.2 Détermination de l'activité spécifique

La détermination de l'activité spécifique, sur différentes fonctions ou organes ou sur des organes isolés en survie, est fonction des propriétés physiologiques du ou des principes actifs. Elle consiste à :

- vérifier l'action spécifique de la drogue sur les différentes fonctions physiologiques ou sur les organes chez l'animal,
- réaliser des essais *in vitro* et *in vivo*, sur les cellules animales et végétales,
- rechercher l'activité antimicrobienne par inhibition de croissances de certains germes.

Cependant, malgré les progrès scientifiques dans le domaine de la recherche, l'exploitation des résultats observés chez les animaux ne peut être extrapolé à l'homme [2], [38].

## 1.4 Techniques d'étude d'une plante médicinale

L'étude d'une plante médicinale nécessite plusieurs techniques. Selon le traitement de cette plante, les techniques utilisées varient. Ces dernières peuvent être :

### 1.4.1 Des méthodes microscopiques

La microscopie est un ensemble de techniques permettant d'obtenir une image des structures biologiques. Cette image est soit observée à l'oeil nu, soit photographiée, soit enregistrée par caméra et stockée sur ordinateur pour retraitement. Les techniques de



révélation permettent aujourd'hui d'identifier de façon précise toutes les molécules et les photographies peuvent être analysées pour des études quantitatives (taille, nombre et emplacement des éléments observés) [59].

#### 1.4.2 Des méthodes chromatographiques

C'est un ensemble de méthodes de séparation basées sur différents principes physiques. Toutefois, ces méthodes ont en commun d'utiliser un support, qui peut être :

- une poudre très fine qui offre une grande surface grâce à ses nombreux grains,
- un solide percé de fins canalicules dont la surface interne est considérable.

Les molécules à séparer sont dissoutes dans un solvant convenable et la solution ainsi obtenue circule entre les particules du support ou dans les microcanalicules. Des interactions physiques s'établissent entre le support qui possède une très grande surface de contact et les molécules à séparer. Des réactions de fixation rapides et réversibles se produisent. Leur force dépend de la nature chimique des molécules à séparer. Celles-ci sont retenues selon leur structure chimique, en faisant passer à travers le support une solution convenable (à vitesse constante). Cette opération a pour but d'entraîner certaines molécules plus vite que d'autres, ce qui permet leur séparation [61].

##### 1.4.2.1 Chromatographie sur couche mince

Cette méthode est rapide. Elle dure entre 30 minutes à 2 heures, suivant le solvant utilisé et l'adsorbant. Une montée du solvant de 10 cm depuis la ligne de départ est considérée comme généralement suffisante pour une bonne séparation [2]. La préparation à analyser et les solutions de référence sont déposées sur une plaque recouverte d'une phase stationnaire. La séparation des constituants du mélange déposé est réalisée par développement d'un solvant. Les bandes de migration, correspondant aux composants, sont ensuite révélées [62].

La chromatographie sur couche mince est utilisée pour séparer des principes liposolubles et hydrosolubles [2].

#### 1.4.2.2 Chromatographie liquide

La chromatographie en phase liquide sur colonnes est devenue un outil analytique performant utilisé dans des domaines variés allant de l'analyse de fluides biologiques à celui des produits pétroliers lourds [63].

La chromatographie liquide à haute performance est une méthodologie spéciale, applicable à tous les types de chromatographie en colonne avec élution en phase liquide. Elle est d'une extrême sensibilité. Elle présente un grand pouvoir séparateur, une excellente reproductibilité et une séparation rapide. Elle utilise comme support des particules de faible diamètre. La pression nécessaire à l'élution est donc élevée. Elle nécessite un appareillage lourd dont le fonctionnement est contrôlé par ordinateur. De très petites quantités de matériel à analyser sont demandées [61].

#### 1.4.2.3 Chromatographie ionique

La chromatographie ionique est une technique analytique qui permet l'analyse quantitative et qualitative des espèces ionique présentes dans un échantillon liquide dépourvu de matière en suspension. Le terme de chromatographie ionique regroupe toutes les méthodes de dosage d'ions (organiques ou non) par chromatographie en phase liquide [64].

Le domaine d'excellence de la chromatographie ionique est l'analyse des eaux. Elle est très performante pour la détermination des anions inorganiques (fluorures, chlorures, sulfates et autres) et de certains cations inorganiques comme ceux de la famille des alcalins et alcalino-terreux tel que le lithium, le sodium, le magnésium et le calcium [65].

### 1.4.3 Techniques spectroscopiques

#### 1.4.3.1 Spectrophotométrie UV-visible

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible repose sur l'absorption du rayonnement par les molécules dans le domaine allant de 190 nm à 800 nm. A la température ambiante, la plupart des molécules sont dans leur état électronique et leur état de vibration fondamental. Ces molécules vont donc pouvoir absorber des photons UV-visible et changer leurs états énergétiques électroniques de vibration et de rotation [66]. Ceci se traduit par une loi d'absorption : la loi de Beer-Lambert [66] :  $A = \epsilon \cdot l \cdot c$  [61], [67]

A: Absorbance (sans unité)

$\epsilon$ : Coefficient d'absorption moléculaire ( $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) ou coefficient d'extinction molaire ( $cm^2 \cdot mol^{-1}$ ).

c: Concentration de la substance dans la solution (mol/l) [73].

La spectrophotométrie UV-visible est utilisée dans beaucoup de domaines : chimie, pharmacie, environnement, agroalimentaire, biologie et autres [66]. Elle s'applique notamment à l'analyse des gaz dont beaucoup ont des spectres d'absorption en UV. Les spectrophotomètres UV-visible peuvent servir de détecteurs pour d'autres techniques analytiques comme la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) [66].

#### 1.4.3.2 Spectroscopie atomique

Les atomes d'un plasma obtenu par excitation électrique ou thermique absorbent ou émettent des radiations de longueurs d'onde discrètes et caractéristiques. Leurs spectres permettent non seulement de les identifier avec certitude mais aussi, dans certaines conditions, de les doser [68]. On distingue :

### Spectrométrie d'absorption atomique (S.A.A)

Un atome, initialement à l'état fondamental, peut passer dans un état excité à condition qu'on lui fournisse un quantum d'énergie égal à la différence d'énergie entre le niveau excité et le niveau fondamental. L'énergie fournie peut être d'origine thermique, cinétique (entraînant des collisions entre particules) ou lumineuse [69]. Cette méthode consiste à mesurer l'absorption des radiations photoniques spécifiques par des atomes en phase vapeur. Elle repose sur la propriété selon laquelle un élément métallique peut absorber des radiations qu'il est lui-même susceptible d'émettre [61].

### Spectrométrie d'émission atomique (photométrie de flamme)

Lorsqu'une solution saline est chauffée par une flamme l'eau s'évapore et les sels minéraux restent à l'état d'ions. Les atomes ainsi portés à haute température captent une partie de l'énergie apportée par la flamme et passent à un état excité. Puis l'atome excité revient à son état basal en libérant de l'énergie sous forme d'une émission de lumière dont la longueur d'onde est caractéristique de l'ion ou de l'atome considéré [61].

La spectrométrie atomique est sans nul doute la méthode la plus générale d'identification des éléments métalliques (analyse quantitative et qualitative) [70].

Si la spectrométrie de flamme est utilisée, essentiellement, pour le dosage des alcalis, la spectrométrie d'absorption atomique est plus générale. Elle est utilisée pour le dosage de divers métaux en toxicologie et en pharmacologie [61].

## **CHAPITRE 2**

### **MATERIAUX ET ESSAIS**

#### 2.1 Introduction

La partie expérimentale de ce travail a un double but :

- le premier s'intéresse à la caractérisation biochimique de certains métabolites secondaires de *Aristolochia longa* L., en particulier sa teneur en acides aristolochiques.
- Le deuxième, est consacré à l'étude du pouvoir antibactérien de quelques extraits de cette plante.

Les extractions ont été réalisées au niveau du laboratoire de recherche de biologie végétale, du département de Biologie à l'université Saad Dahlab de Blida. Les analyses physicochimiques ont été faites dans :

- le laboratoire de physicochimie du complexe Antibiotical de SAIDAL- Médéa,
- le laboratoire de physicochimie du centre universitaire de Médéa,
- Le laboratoire central de la Police scientifique et technique d'Alger,
- Le laboratoire de Recherche Nucléaire de Draria-Alger

Les essais sur le pouvoir antibactérien de quelques extraits de *Aristolochia longa* L. ont été réalisés au niveau :

- du laboratoire de stérilité du complexe Antibiotical de SAIDAL-Médéa,
- du laboratoire de recherche de Biologie Végétale du département de Biologie (Université Saad Dahlab-Blida).

## 2.2 Matériaux utilisés

### Matériel biologique

Les plantes de *Aristolochia longa* L. ont été récoltées dans la forêt de *Chréa*. Les feuilles et les tubercules ont été récoltés en période de floraison au cours de deux sorties le 24/04/2007 et le 06/05/2007. Après maturité des graines, un autre prélèvement a eu lieu le 23/07/2007.

L'identification de la plante a été faite au sein du *Parc National de Chréa* (Direction de Blida). Cette identification a été confirmée au Département de Botanique de l'Institut National d'Agronomie- El Harrach (Alger) et au laboratoire de Biologie Végétale du Département d'Agronomie de l'université de Blida.

Les plantes ont été lavées et séchées à l'abri de la lumière et à la température ambiante (28 à 30°C). Après séchage, les parties aériennes et souterraines ont été broyées séparément pour obtenir une poudre fine, qui a servi pour la préparation des extraits.

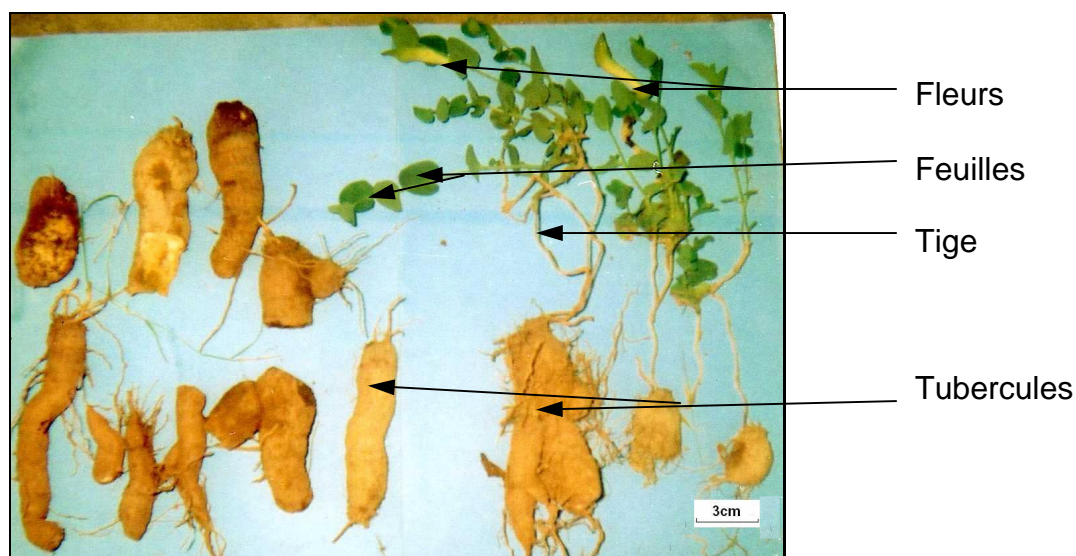


Figure 2.1: Echantillon de *Aristolochia longa* L. (photo d'origine)

Les bactéries testées sont identifiées et référencées par le laboratoire de stérilité (Complexe Antibiotical-SAIDAL) et par le laboratoire de microbiologie du Département d'Agronomie de l'université de Blida.

Le matériel utilisé pour l'extraction, la purification et le test antibactérien est porté en appendice B.

### 2.3 Essais

Notre expérimentation est divisée en trois parties :

- essai macroscopique et microscopique de l'espèce,
- essai physicochimique pour la caractérisation biochimique de *Aristolochia longa* L., en particulier purification et quantification de l'acide aristolochique,
- essai sur le pouvoir antibactérien du principe actif et de la concrète alcoolique des tubercules de *Aristolochia longa* L..

#### 2.3.1 Etude macroscopique et microscopique de *Aristolochia longa* L.

Le but de cette étape est de chercher des spécificités morphologiques et anatomiques de la plante. Nous nous appuyons sur :

##### Examen macroscopique de la fleur

Nous avons cherché des spécificités florales caractéristique de *Aristolochia longa* L.. Nous avons cherché le nombre des étamines et leur position par rapport à l'ovaire, le nombre de carpelles et le type de placentation.

##### Examen microscopique de la tige

Nous avons étudié dans cette étape la tige seulement puisque nous n'avons pas réussi de faire des coupes parfaites au niveau de la feuille et du tubercule. Les feuilles

sont très fines et au cours de la réalisation des coupes nous avons altéré leur structure. Les tubercules sont très durs et donc la réalisation de coupes fines n'a pas été possible.

La coloration est réalisée selon le protocole adopté au sein du laboratoire de Biologie Végétale du département de Biologie (Université de Blida), avec les étapes suivantes :

- les coupes sont plongées dans l'eau de Javel à 12° pendant 10 à 15 min pour vider les cellules,
- Après rinçage à l'eau courante 5 à 10 min, les coupes sont traitées par l'acide acétique (10%) pendant 1 à 2 min pour faciliter la diffusion des colorants,
- Elles sont ensuite lavées à l'eau courante 5 à 10 min et placées dans le vert de méthyle pendant 15 à 20 min,
- Les coupes sont rincées à l'eau courante 5 à 10 min puis plongées dans le rouge Congo 15 à 20 min,
- Après lavage à l'eau courante, elles sont montées entre lame et lamelle puis observées au microscope photonique.

### 2.3.2 Essai physicochimique

Le but de cette étude est de :

- déterminer la teneur en eau et en cendres,
- caractériser certains métabolites secondaires de *Aristolochia longa* L.,
- déterminer la teneur et les types des acides aristolochiques.

#### 2.3.2.1 Détermination de la teneur en eau et en cendres

##### Teneur en eau

Nous avons suivi le protocole de ZERRAD et al [71]. Ainsi nous avons placé des échantillons des feuilles et des tubercules de poids déterminé dans une étuve portée à



75°C. Les échantillons ont été pesés chaque 24 heures jusqu'à la stabilisation du poids sec de la matière végétale.

### Etude des cendres

Nous avons fait la minéralisation selon le protocole de MARTIN et al [72], PINTA [73], PINTA [74].

### Mode opératoire

Les étapes de la minéralisation sont les suivantes :

- Dans une capsule en porcelaine, nous pesons 1g de poudre des tubercules finement broyés,
- Nous disposons la capsule au four à moufle froid, puis nous élevons la température jusqu'à 450 °C pendant 2 heures. Nous maintenons les échantillons encore pendant 2 heures,
- après refroidissement pendant toute la nuit, nous
- couvrons la capsule par un papier aluminium avant de sortir les cendres pour les peser.

Nous avons extrait les minéraux de ces cendres avec l'acide chlorhydrique. Les étapes sont:

- nous humectons les cendres par 2 à 3 ml d'acide chlorhydrique concentré,
- nous chauffons sur une plaque chauffante jusqu'à l'apparition des premières vapeurs, puis nous ajoutons quelques millilitres d'eau déminéralisée,
- Nous filtrons, dans une fiole jaugée, et nous rinçons 3 ou 4 fois à l'eau déminéralisée tiède.

L'analyse des minéraux se fait par la chromatographie ionique. Le protocole utilisé dans cette étape c'est celui du laboratoire central de la Police Scientifique et Technique d'Alger.

## Principe de la chromatographie ionique

La phase mobile est une solution tampon aqueuse et la phase stationnaire la plus courante est constituée de polystyrène sous forme de sphères de quelques micromètres de diamètre. Ces sphères ont été chimiquement transformées en surface pour faire apparaître des sites ioniques. Ces derniers permettent l'échange de leurs contre-ions mobiles avec des ions, de même signe, présents dans la phase mobile. La séparation repose sur les coefficients de distribution ionique entre les deux phases [75].

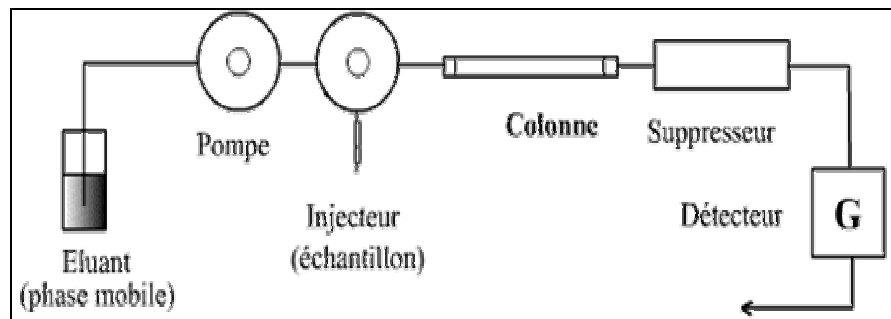


Figure 2.2: Principe de la chromatographie ionique [65].

## Mode opératoire

1 ml de la solution des cendres est dilué dans un litre d'eau. De cette solution, nous avons injecté 20  $\mu$ l dans l'appareil de la chromatographie ionique de type ICS 3 000. Les conditions de cette analyse sont regroupées dans le Tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Conditions de l'analyse par chromatographie ionique

	Cations	Anions
Eluant	NaOH 30 mM	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 11mM
Débit	1,5 ml/min	1 ml/ min
Température	30°C	Ambiante (25-28°C)
Colonne	Ion Pac ASM-HC 4x 250 mm	Ion Pac CS12A 4x 250 mm
Détecteur	CD25	CD25
Suppresseur	ASRS ultra II 4mn	CSRS ultra II 4mn

Une autre fraction des minéraux a été déterminée par la spectrométrie d'absorption atomique au niveau du laboratoire de Recherche Nucléaire de Draria (Alger).

#### Principe de la spectrométrie d'absorption atomique

Cette méthode consiste en la mesure de l'absorption de radiations photoniques spécifiques par des atomes en phase vapeur. Elle repose sur la propriété selon laquelle un élément métallique peut absorber les radiations qu'il est lui-même susceptible d'émettre. L'absorption d'une énergie lumineuse par un atome métallique à l'état fondamentale le fait passer à un état excité. Le retour à l'état fondamentale se manifeste par l'émission de radiation caractéristique dont la plus connue est généralement la plus intense porte le nom de raie de résonance. Donc le principe de la spectrométrie d'absorption atomique repose sur la possibilité d'éclaircir une vapeur atomique, contenant de nombreux atomes à l'état fondamentale, par une radiation de longueur d'onde connue. Ces atomes absorbent cette radiation [70].

#### Dosage de l'azote total

Le dosage de l'azote total a été effectué par la technique de KJEDAHN selon le protocole de MARTIN et al [72] et PINTA [73].

## Principe

En attaquant la matière végétale par l'acide sulfurique concentré à l'ébullition, en présence de catalyseur (composition est en appendice C), l'azote est transformé en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Nous distillons avec un excès de soude et nous titrons l'ammoniac entraîné par l'acide sulfurique de normalité N/14 [72], [73].

## Mode opératoire

- 200 mg de poudre des tubercules, bien sèche, mélangé avec 5 ml d'acide sulfurique concentré sont introduits dans un matras de 150 ml et laissés en contacte pendant une demie heure,
- nous ajoutons 200 mg de catalyseur (composition est en appendice C), nous chauffons quelques instants puis nous les portons à ébullition jusqu'à décoloration complète des échantillons,
- après refroidissement, nous ajoutons 30 ml d'eau distillée,
- au moment de la distillation, nous ajoutons 20 ml de soude et nous fixons les matras à l'appareil,
- le distillat est recueilli dans un bêcher de 250 ml qui contient préalablement 0,5 ml d'indicateur coloré (composition est en appendice C) et 10 ml d'acide borique 2%,
- nous titrons le distillat avec de l'acide sulfurique N/14.

Le pourcentage de l'azote (%N) dans la matière sèche est calculé selon MARTIN et al [72] et PINTA [73].

$N\% = n / 10 \times p$  où n : volume en ml de la solution de titrage.

P : pesée, en gramme, de la poudre végétale.

L'analyse des protéines brutes (%Pro) consiste à doser l'azote total (%N) selon KJEDAHN et multiplier la teneur en azote par le facteur conventionnel 6,25 [76].

$\%Pro = \%N \times 6,25$  [76].

### 2.3.2.2 Caractérisation de quelques métabolites secondaires de *Aristolochia longa* L.

Le but de cette étape est de révéler la présence de certains métabolites secondaires de *Aristolochia longa* L.. Nous avons procédé à une extraction suivie d'une révélation colorimétrique après séparation par chromatographie sur couche mince. Les saponines et les tanins ont été caractérisés par des réactions en tube.

#### Méthode

Le protocole expérimental est celui de FOUNGEB et al [77]. Il repose sur la technique d'extraction par solvants successifs. Ce protocole se fait en deux étapes :

#### Etape 1

La poudre végétale est dégraissée par un solvant apolaire. Les étapes sont :

- 10 g de poudre végétale sont extraits par 300 ml d'éther à l'aide du Soxhlet,
- après 10 siphonages, le solvant récupéré est filtré à chaud puis évaporé à sec par l'évaporateur rotatif pour obtenir la concrète apolaire,
- la poudre végétale dégraissée est séchée à l'air libre pendant 24 heures.

#### Etape 2

Cette étape consiste à extraire les métabolites secondaires. Le mode opératoire est le suivant :

- la poudre dégraissée est extraite une deuxième fois par 300 ml de méthanol à 70% à l'aide du Soxhlet,
- après 12 siphonages, nous filtrons à chaud et la solution méthanolique est évaporée à sec par l'évaporateur rotatif pour obtenir la concrète polaire.

## Principe du Soxhlet

L'extracteur de Soxhlet est un appareil spécifique conçu pour l'extraction continue solide-liquide. Le solvant (5 à 10 fois la quantité de l'échantillon solide à extraire) est porté à ébullition. Ensuite, il est condensé avec le condenseur à boules contenant le solide à extraire dans une cartouche de papier épais. Le contact entre le solvant et le produit à extraire dure pendant l'accumulation du solvant dans le réservoir, puis quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute. Ce cycle peut être répété plusieurs fois [78].

Les concrètes apolaires et polaires des tubercules et des feuilles vont être analysée par spectrophotométrie ultraviolet-visible. Pour cette analyse, nous avons préparé des solutions de 100 µg/ 1ml d'éther pour les concrètes apolaires. Des solutions de même concentration ont été préparées dans du méthanol pour les concrètes polaires. Le but de cette analyse est de déterminer, en plus de quelques groupements fonctionnels des concrètes, la partie de la plante (tubercules ou feuilles) qui contient de l'acide aristolochique.

## Principe de la spectrophotométrie ultraviolet-visible

En faisant traverser par un faisceau lumineux monochromatique (lumière à longueur d'onde fixe et définie) une cuve contenant une solution. Une partie de la lumière incidente va être absorbée par les molécules de la substance dissoute [61], [70].

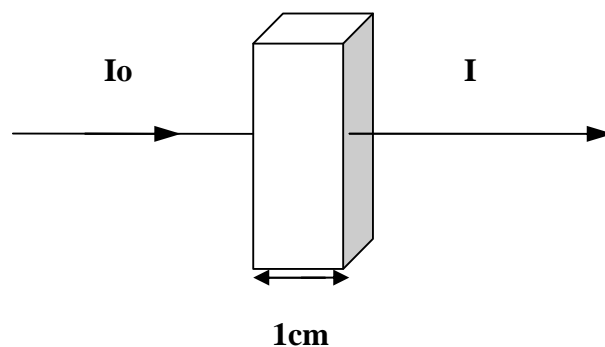


Figure 2.3 : Principe de la spectrométrie ultraviolet-visible [61].

Si l'énergie lumineuse de la lumière incidente est  $I_0$  et celle de la lumière transmise est  $I$ , la loi de Beer-Lambert (page 34) indique que:  $I = I_0 e^{-\epsilon \cdot c \cdot l}$  [70].

### Caractérisation des métabolites secondaires

Une fois extraits, les métabolites secondaires vont être caractérisés par des réactions colorimétriques. Ainsi ces métabolites seront séparés par chromatographie sur couche mince puis révélés.

### Principe de la chromatographie sur couche mince ascendante

La substance à séparer est déposée à la base de la plaque juste au dessus de la surface du liquide [61]. Lorsque la plaque, sur laquelle on a déposé l'échantillon, est placée dans la cuve, l'éluant monte par capillarité à travers la phase stationnaire [75]. Il va entraîner la substance avec lui, chaque substance à une vitesse différente [61]. Cette vitesse dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Les composés se déplacent donc alternativement de la phase stationnaire à la phase mobile. L'action de rétention de la phase stationnaire est principalement contrôlée par des phénomènes d'adsorption [75]. Quand la progression est terminée la plaque va pouvoir être traitée en globalité par des révélateurs spécifiques. Les molécules détectées vont apparaître sous forme de taches colorées (les spots) réparties entre le point de départ et le front de migration du solvant [61].

### Mode opératoire

- A partir de la concrète alcoolique, nous préparons une solution méthanolique de 1 mg/ ml [77],

- nous déposons 10  $\mu$ l de la solution méthanolique préparée à environ 2 cm de la base de la plaque de gel de silice,

- nous introduisons la plaque dans la cuve de CCM contenant la phase mobile : butanol- acide acétique- eau distillée 4-1-5 v/v [77],

- après migration, les plaques sont séchées à température ambiante du laboratoire (25-28°C) puis révélées par différents révélateurs (tableau 2.2).

La préparation de la solution du chlorure d'aluminium, du chlorure ferrique et de la potasse alcoolique est faite selon le protocole de FOUNGEB et al [77] (Appendice C). Le réactif de Dragendorff est préparé selon le protocole de MEUWLY [79] (Appendice B).

Tableau 2.2 : Les révélateurs et les métabolites recherchés dans la concrète alcoolique de *Aristolochia longa* L.

	Chlorure d'aluminium	Chlorure ferrique	Potasse alcoolique	Réactif de Dragendorff
Couleur des spots (résultat positif)	Tâche jaunes, jaunes vertes et ocres sous lumière ultraviolette	Tâches vert foncé et gris noirs.	Tâches jaunes vertes, jaune orangé ou rouges	Tâches rouges.
Le métabolite caractérisé	flavones	Flavonoïdes et acides phénols	quinones	alcaloïdes

- une fois révélées, nous entourons les spots par un crayon et nous calculons le *Rf* [77].

Calcul du *Rf*

$Rf = \text{distance parcourue par la substance} / \text{distance parcourue par le solvant}$  [61], [2]. La distance est mesurée en centimètre.

### Caractérisation des saponines

Pour caractériser les saponines et calculer l'indice de mousse nous avons suivi le protocole de PARIS et al [2],



- Dans une fiole conique de 500 ml, qui renferme 100 ml d'eau distillée bouillante, nous introduisons 1g de poudre grossière de feuilles ou de tubercules,
- nous maintenons une ébullition modérée pendant 30 min,
- nous filtrons et après refroidissement, nous ajustons le volume du filtrat à 100 ml avec de l'eau distillée,
- Dans une série de tubes à essai, nous mesurons successivement 1, 2 jusqu'à 10 ml de décocté, puis nous ajustons le volume de chaque tube à 10 ml avec de l'eau distillée,
- Nous agitons le tube pendant 15 secondes et nous le laissons reposer 15 minutes,
- Nous mesurons ensuite la hauteur de la mousse.

$$I_m = \frac{10 \cdot H}{0,01 \cdot x} \quad [2]$$

$I_m$  : Indice de mousse.

$H$  : hauteur de la mousse mesurée en cm

$X$  : le numéro du tube où la hauteur de la mousse est supérieure à 1 cm [2].

### Caractérisation des tanins

Nous introduisons dans un tube à essai environ 3 ml de la solution de la concrète polaire, puis nous ajoutons environ 2 ml de solution aqueuse de chlorure ferrique [2].

### 2.3.2.3 Teneur et types des acides aristolochiques

Nous avons suivi le protocole de CARRERAS [80] pour la purification de l'acide aristolochique. Ce protocole se base sur la séparation liquide-liquide.

## Mode opératoire

- 100 g de poudre des tubercules sont extraits par l'hexane, au moyen du Soxhlet,
- La poudre dégraissée est séchée à température ambiante du laboratoire (27-28 °C) avant de subir une autre extraction par l'alcool 96°,
- Nous déposons l'extrait alcoolique dans une ampoule à décanter et nous ajoutons l'éther, nous agitons et nous laissons la solution décanter,
- La phase éther est condensée par évaporateur rotatif, puis nous la lavons cinq fois par une solution basique de carbonate de sodium,
- La solution basique est titrée par l'acide chlorhydrique qui précipite l'acide aristolochique,
- nous séparons la poudre précipitée et nous la pesons puis nous l'analysons par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) pour identifier les différents types de l'acide aristolochique présents dans la plante.

L'extraction a été répétée trois fois. Nous avons utilisé 100 grammes de poudre des tubercules dans chaque extraction. Pour les feuilles nous avons suivi le même protocole. L'extraction a été faite trois fois, en utilisant 50 grammes de poudres de feuilles pour chaque purification.

## Principe de la chromatographie liquide à haute performance

La phase stationnaire, poreuse, est formée de petites billes contenues dans une colonne. Le liquide, ou phase mobile, entre par une extrémité et sort par l'autre. Le solvant est déplacé activement par une pompe. Les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne et prendre un certain retard dans la migration. Elles vont donc se présenter avec un certain retard en sortant de la colonne. Un détecteur placé à la sortie de la colonne va déceler le passage de chacune des substances. L'intensité de la réponse du détecteur va aussi permettre, après calibration, de donner la concentration de la molécule. Ainsi, cette dernière diluée dans le solvant pourra être récupérée en fractionnant le flux de sortie [70].

## Mode opératoire

- Préparation de la solution standard

La solution standard est préparée selon YUAN et al [23]. Le standard est un mélange de deux types d'acide aristolochique. Il contient 29% de l'acide aristolochique I et 69% de l'acide aristolochique II. Nous avons pesé 5 mg de ce standard et nous l'avons mis dans 5 ml de méthanol. Après dissolution de la poudre, nous avons dilué cette solution ainsi obtenue 10 fois dans du méthanol.

La concentration dans la solution standard en acide aristolochique I est de 29  $\mu\text{g/ml}$  et celle de l'acide aristolochique II est de 69  $\mu\text{g/ml}$ .

- Les solutions échantillons (feuilles et tubercules)

Les solutions échantillons sont composées de:

- ✓ Extrait alcoolique

- 300 mg de poudre végétale sont dilués dans 10 ml de méthanol 70%.
- cette solution subit une sonication pendant 15 min,
- centrifugation pendant 10 minutes à 3 100  $g$ ,
- ces étapes sont répétées trois fois. L'ensemble des surnageants sont récupérés et additionnés,
- nous condensons la solution méthanolique par évaporateur rotatif,
- nous diluons la poudre obtenue avec 50 ml de méthanol à 70% [23].

- ✓ Solution de l'acide aristolochique purifié

Comme pour le standard, nous avons préparé une solution de 100  $\mu\text{g/ml}$  dans du méthanol pour l'acide aristolochique purifié en période de floraison à partir des feuilles et des tubercules. La concentration de la solution de l'acide aristolochique purifié après maturité des graines est de 125  $\mu\text{g/ml}$ .

La séparation a été faite sur une colonne C18 (25 cm / 4,6 mm) avec un débit de 0,5 ml/min en période de floraison et 1ml/min après maturité des graines et la température est de 30°C.

Pour trouver la phase mobile adéquate, nous avons essayé trois phases:

- ↻ Phase 1: est un mélange de méthanol et d'acide acétique 2% [23].
- ↻ Phase 2: formée de méthanol et de l'eau distillée, dans un rapport de 60-40 v/v. Chaque solvant de la phase mobile contient 0,5% d'acide acétique [81].
- ↻ Phase 3: est composée d'acétonitrile (49%) et d'acide acétique 2% (51%) [30].

L'utilisation de chacune de ces trois phases n'a pas donnée des résultats reproductibles. En se basant sur les propriétés physicochimiques des acides aristolochiques ainsi que l'expérience de Mr BENAOUA, nous avons développé une phase simple reproductible composée de méthanol-eau 60-40 v/v. Cette phase ressemble beaucoup à celle de CHERIF et al [81].

### 2.3.3 Essai bactériologique

Le but de cette étape est d'étudier l'effet antibactérien de l'acide aristolochique purifié des tubercules (après maturité des graines) et de l'extrait alcoolique de *Aristolochia longa* L.

#### Méthode

La méthode utilisée dans l'étude du pouvoir antibactérien de nos extraits est celle utilisée dans le laboratoire de stérilité (SAIDAL). Nous imbibons les disques de papier, de 1 cm de diamètre, par une solution de l'extrait à tester. Lorsque cet extrait, à la concentration considérée, présente un effet sur une bactérie donnée, une zone d'inhibition apparaît autour du disque.

## Mode opératoire

- Nous avons préparé le milieu de soja-agra selon le laboratoire de stérilité (SAIDAL). Ensuite, nous stérilisons le milieu pendant 20 min à 120°C. Nous laissons le milieu 5 min à la température du laboratoire (25 - 27°C) avant de le couler dans des boîtes de Pétri sous une hotte à flux laminaire,
- Nous préparons des solutions de 1 mg/ml de l'acide aristolochique et de la concrète alcoolique dans de l'eau physiologique,
- Devant un bec-benzène, nous ensemençons les souches bactériennes, en suspension dans de l'eau physiologique, dans les boîtes de Pétri contenant le milieu préparé de soja-agra,
- nous imbibons les disques (de papier filtre de 1cm de diamètre) par nos solutions à tester, puis nous incubons les boîtes de Pétri dans une étuve portée à 37°C pendant 24 heures.
- Après 24 heures, nous mesurons la zone d'inhibition.

## CHAPITRE 3

### ANALYSE ET INTERPRETATION DES RESULTATS

#### 3.1 Résultats et interprétation

##### 3.1.1 Etude macroscopique et microscopique de *Aristolochia longa* L.

##### Examen macroscopique de la fleur

L'étude macroscopique de la fleur révèle que *Aristolochia longa* L. contient 12 étamines couvertes par six mamelons (Figure 3.1). Les étamines adhèrent au sommet de l'ovaire où elles sont réparties deux par deux (Figure 3.2). L'ovaire est infère. Il présente six carpelles soudés avec une placentation axiale (Figure 3.3).

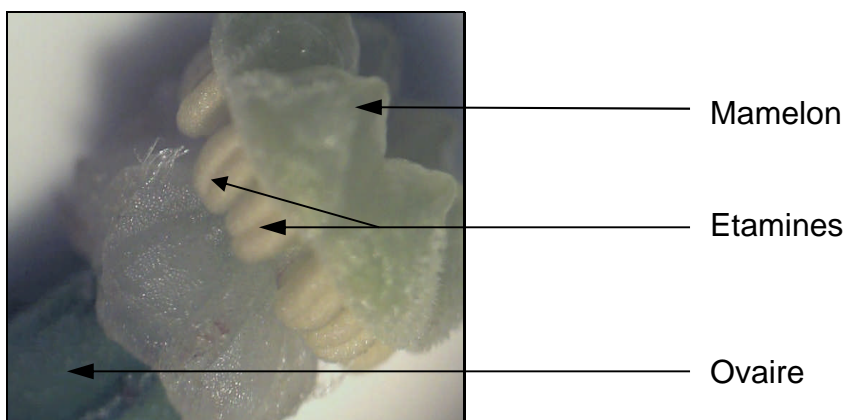


Figure 3.1 : Position des étamines par rapport à l'ovaire (loupe binoculaire G :20x).

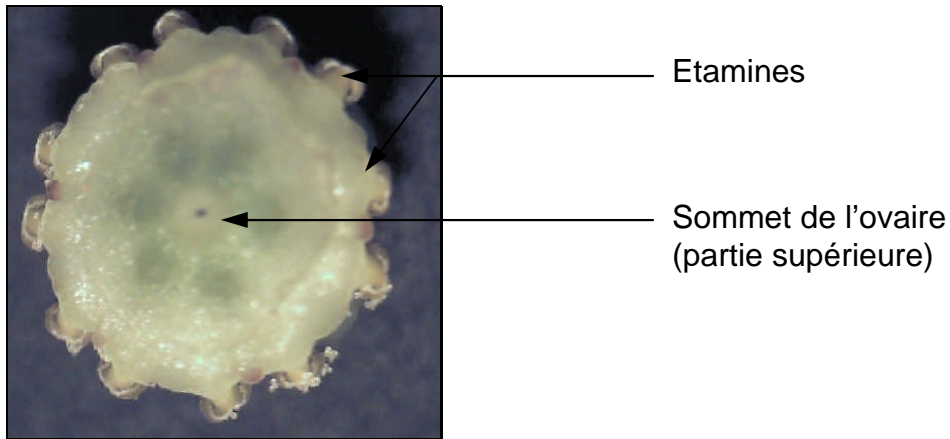


Figure 3.2 : Coupe transversale dans la partie supérieure de l'ovaire (Loupe binoculaire G :20x)

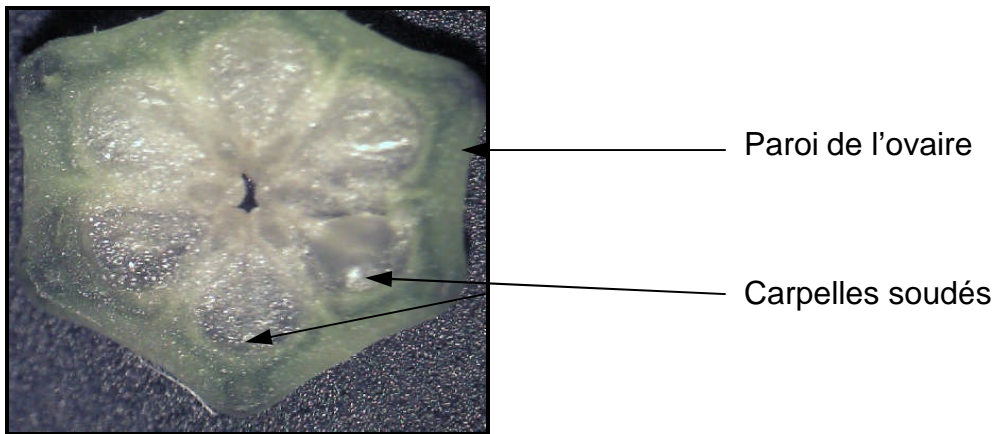
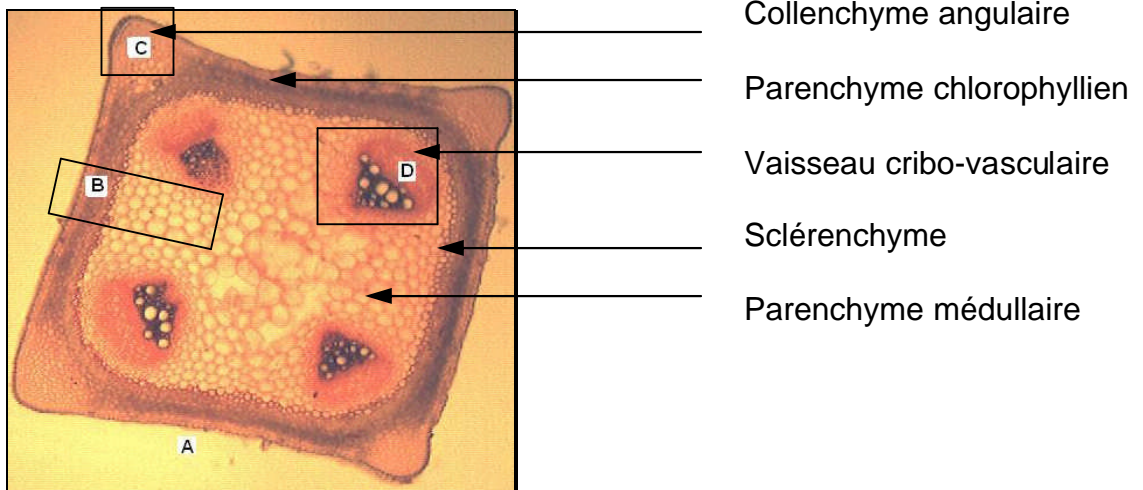


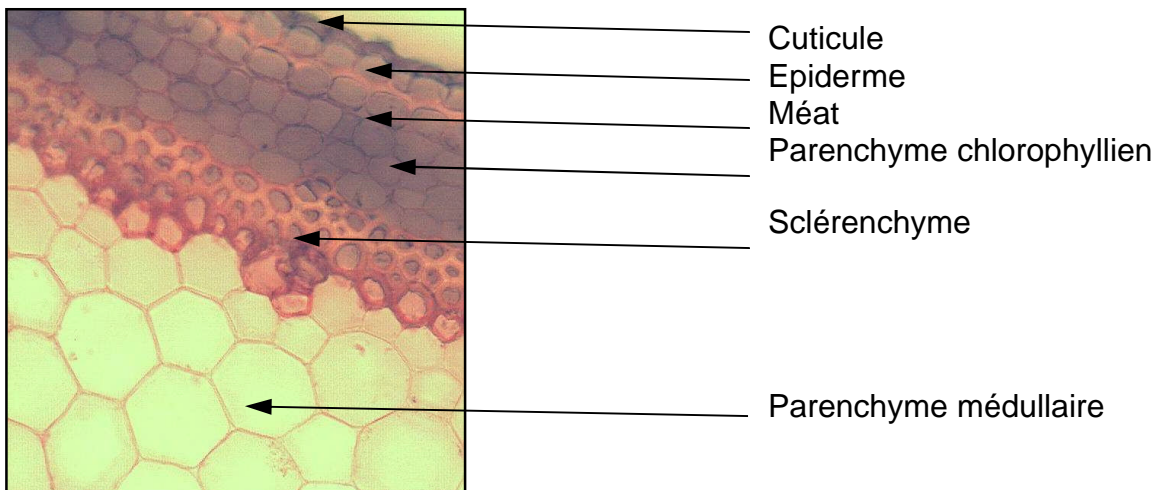
Figure 3.3 : Coupe transversale au niveau de l'ovaire (loupe binoculaire G :20x)

### Examen microscopique de la tige

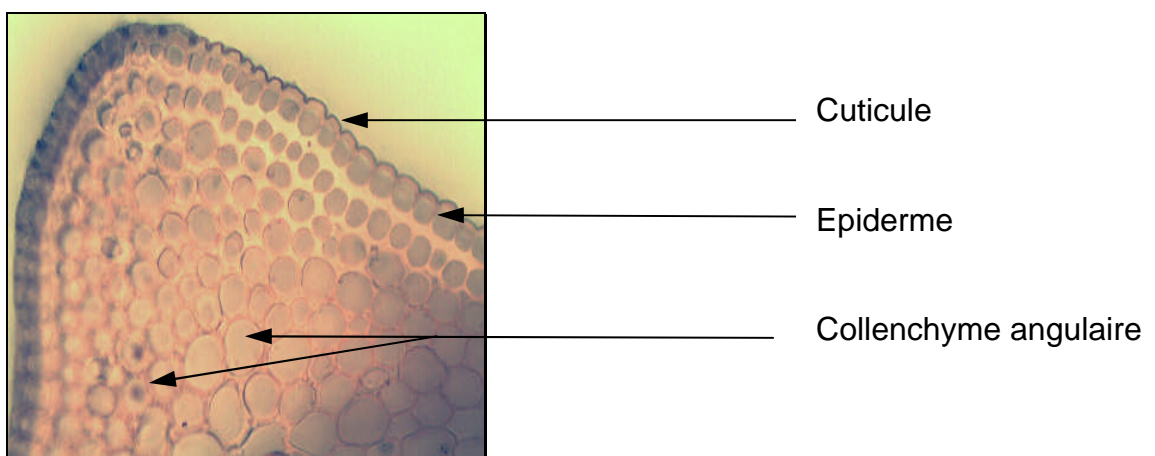
L'examen microscopique montre que la tige est quadrangulaire (Figure 3.4.A). L'épiderme est la couche la plus externe. Au niveau des angles de la tige nous observons un collenchyme angulaire (Figure 3.4.C). Le parenchyme chlorophyllien est formé de trois à quatre assises cellulaires (Figure 3.4.B), il est suivi d'un anneau continu de sclérenchyme. Au centre se trouve un parenchyme médullaire (Figure 3.4.B) dont les quatre angles sont occupés par quatre faisceaux cribro-vasculaires (Figure 3.4.A). Ces faisceaux ont une forme en V à différenciation centrifuge. Le protoxylème est dirigé vers le centre. Alors que le métaxylème est dirigé vers la périphérie et il est surmonté par le phloème (Figure 3.4.D).



A: organisation générale de la tige de *Aristolochia longa* L. (G:x10).

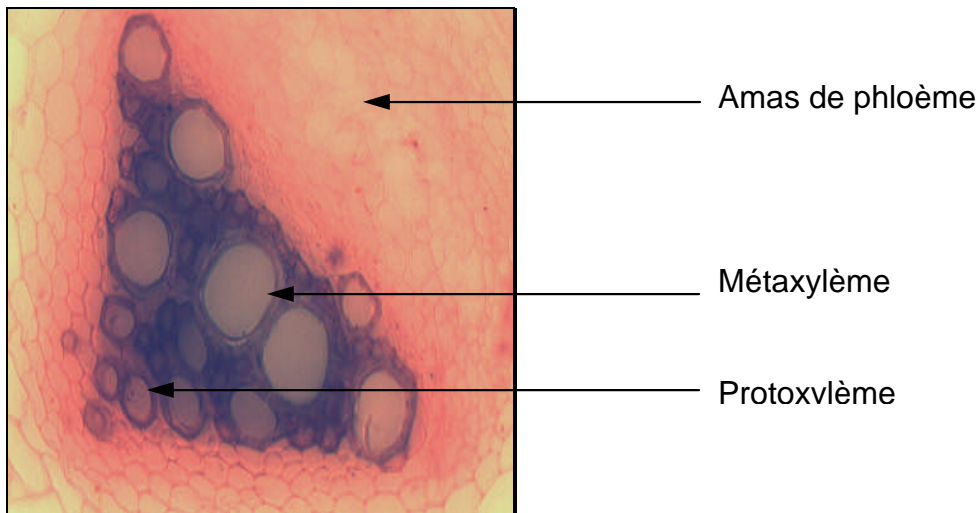


B : Les tissus qui composent la tige de *Aristolochia longa* L. (G : x 40).



C : Collenchyme angulaire des angles de la tige (G : x 40)





D: Organisation des éléments conducteurs de la tige (G :x 40).

Figure 3.4: Coupe transversale de la tige (A, B, C et D).

L'étude microscopique de la tige de *Aristolochia longa* L. montre que l'anatomie de *Aristolochia longa* L. est très différente de celle de *Aristolochia clematitis*, une *Aristolochiacée* très étudiée par les chercheurs.

D'après les coupes illustrées par CALZONI [82] (Appendice D) la section de la tige de *Aristolochia clematitis* est arrondie et sans collenchyme. Le nombre des faisceaux cribro-vasculaires est supérieur à quatre. Ils sont disposés en anneau au niveau du parenchyme médullaire ce qui diffère de *Aristolochia longa* L..

Le sclérenchyme est en anneau continu dans la coupe transversale de la tige de *Aristolochia longa* L.. Ce tissu forme un anneau discontinu au niveau de la tige de *Aristolochia clematitis*.

Nous remarquons que la tige de *Aristolochia longa* L. ressemble à celle de *Salvia officinalis* L. (Figure en Appendice D). Cette espèce, comme *Aristolochia longa* L., présente une tige de section quadrangulaire. Les angles sont occupés par un collenchyme sous épidermique comme dans la tige de *Aristolochia longa* L.. Dans le parenchyme médullaire, nous observons quatre faisceaux cribro-vasculaires occupant les angles de la tige comme chez *Aristolochia longa* L. Mais à la différence de cette

dernière la tige de *Salvia officinalis* L. contient quatre autres faisceaux cribro-vasculaires de petite taille en alternance avec les précédents.

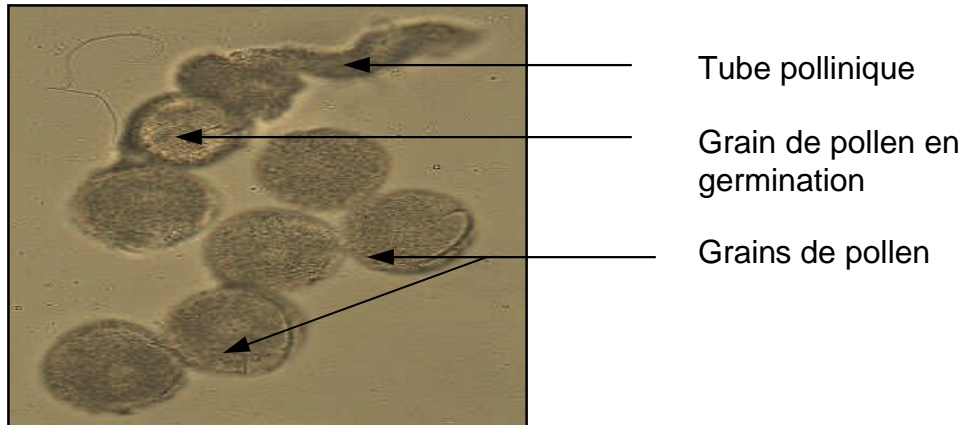


Figure 3.5 : Grains de pollen de *Aristolochia longa* L. (G : x 40)

Le grain de pollen de *Aristolochia longa* L. est arrondi et présente une surface lisse (Figure 3.5). Notre résultat est comparable à celui de MULDRE [9].

### 3.1.2 Essai physicochimique

#### 3.1.2.1 Détermination de la teneur en eau et en matière minérale

##### Teneur en eau

Le résultat de la teneur en eau des tubercules et des feuilles est regroupé dans le Tableau 3.1 (détail en Appendice D).

Tableau 3.1 : Résultats de la teneur en eau

	Feuilles	Tubercules
Poids frais (moyenne en g)	28,0800	71,0798
Poids sec (moyenne en g)	08,5235	20,9490
% en eau / poids frais	69,6457 ± 00,0007	70,5182 ± 00,2446

Les résultats du tableau 3.1 montrent que les tubercules de *Aristolochia longa* L. sont légèrement plus riches en eau en comparaison aux feuilles. Selon PARIS et al [2] l'eau représente 60 à 80% de la matière fraîche des feuilles et 40 à 50% dans les tissus lignifiés. Nous pouvons constaté donc que la teneur en eau des feuilles de *Aristolochia longa* L. est dans les normes, mais les tubercules lignifiés sont plus riches en eau que les tissus lignifiés.

### Etude des cendres

Tableau 3.2 : Teneur en cendres des tubercules

Pesée de la poudre (en g)	Pesée des cendres	pourcentage
01,0172 ± 00,0225	00,0217 ± 00,0005	02,1354 ± 00,0057

Les résultats du tableau 3.2 révèlent que les cendres représentent 2,1354% de la matière sèche des tubercules.

La matière minérale en solution a été analysée par chromatographie ionique. Les cations et les anions ont été analysés séparément. Les résultats de cette analyse sont regroupés dans les tableaux 3.3 et 3.4.

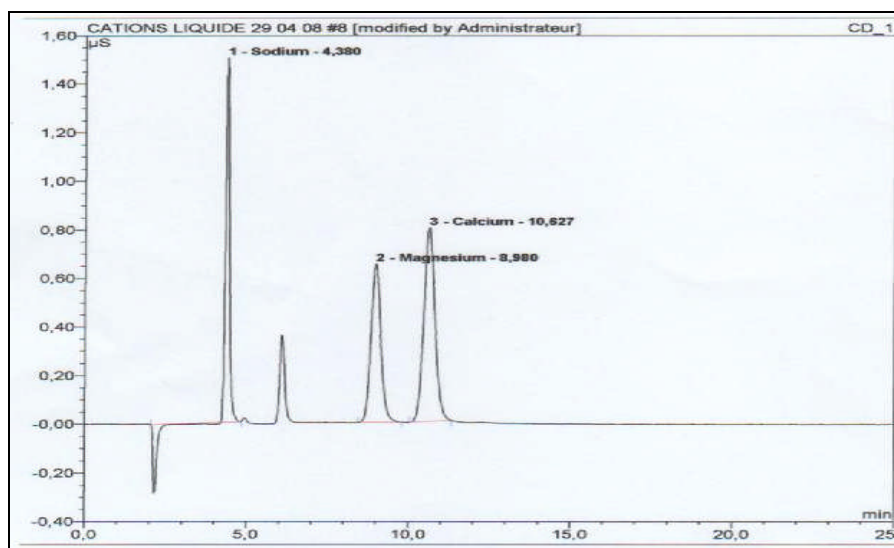


Figure 3.6: Chromatogramme des cations.

Tableau 3.3 : Cations détectés par chromatographie ionique

	Sodium	Magnésium	Calcium
Concentration (mg/ml)	541,330	348,210	408,898

L'analyse des alcalis par chromatographie ionique révèle trois minéraux : sodium, magnésium et calcium (Figure 3.6). Le calcium est le cation majoritaire (tableau 3.3).

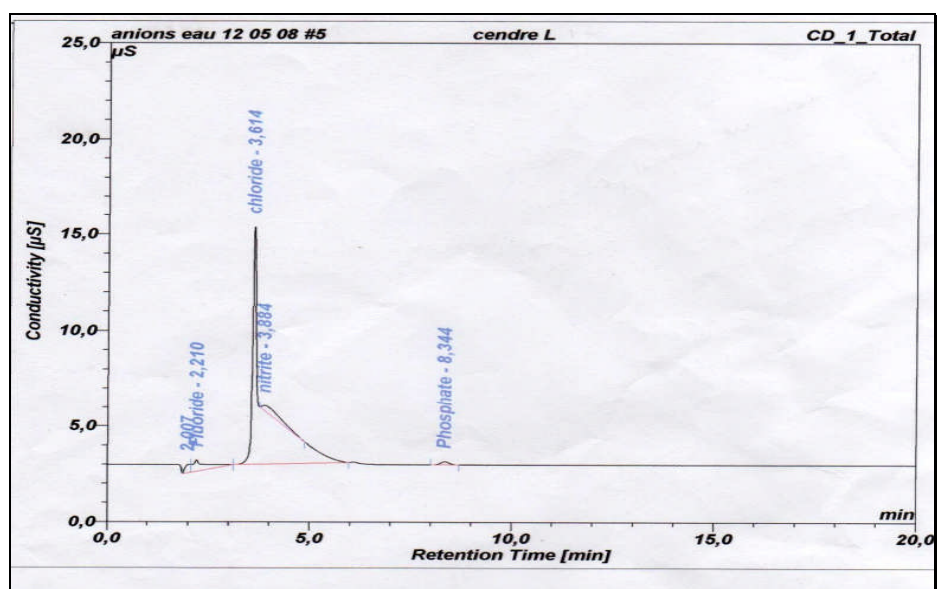


Figure 3.7: Chromatogramme des anions.

Tableau 3.4 : Anions détectés par chromatographie ionique

	Fluoride	Chloride	Nitrite	Phosphate
Concentration (mg/ml)	92,5259	33757,7271	1647,0835	833,7476

L'analyse de cette fraction minérale des cendres révèle la présence de phosphate, de chlorure, de fluorure et de nitrite (Figure 3.7). Ce dernier est l'anion majoritaire (Tableau 3.4). Nous ne pouvons pas estimer la fraction des chlorures dans la fraction minérale puisque nous avons réalisé une extraction chlorhydrique des minéraux.

Le dosage des autres alcalis par spectrométrie d'absorption atomique donne les résultats illustrés dans le tableau 3.5.

Tableau 3.5 : Résultats de la spectrométrie d'absorption atomique.

	Potassium	Plomb	Cuivre	Cadmium	Fer
Concentration (mg/ml)	22,2082	00.00	0.0122	00.00	19,4002

La fraction minérale de *Aristolochia longa* L. est riche. Nous observons, d'après les résultats du tableau 3.5, que le cuivre représente une concentration très faible. La matière minérale est riche aussi en potassium et en fer. Nous remarquons ainsi que le cadmium et le plomb sont absents dans la fraction minérale de *Aristolochia longa* L..

#### Dosage de l'azote total

Les résultats de la teneur en azote total et en protéines dans la matière sèche des tubercules apparaissent dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Teneur en azote total et en protéines dans les tubercules

Pesée de la poudre (en mg)	200,1333 ± 0,1247
Volume de titration (en ml)	10,9667 ± 0,0471
% de l'azote	5,2290 ± 0,1841
% des protéines	32,6815 ± 1,1506

Nous avons remarqué que la teneur en azote total chez *Aristolochia longa* L. (tableau 3.6) est plus élevée que chez l'arachide, l'hévéa, le riz et le maïs étudiés par PINTA [74].

### 3.1.2.2 Caractérisation de quelques métabolites secondaires

#### Dégraissage de la poudre végétale

L'extraction, à l'aide du Soxhlet, des composés apolaires des tubercules et des feuilles de *Aristolochia longa* L. a donné les résultats regroupés dans le tableau 3.7.

Tableau 3.7 : Teneur en composés apolaires des tubercules et des feuilles

	Tubercules	Feuilles
Pesée de la poudre (en g)	10,0034 ± 00,0034	10,0002 ± 00,0002
Pesée de la concrète (en g)	00,1212 ± 00,0004	00,1305 ± 00,0004
pourcentage	01,2116 ± 00,0031	01,3050 ± 00,0044

La concrète apolaire représente 1,2116 % et 1,3050 % de la matière sèche respectivement dans les tubercules et dans les feuilles. La concrète des tubercules a une couleur Jaune-marron et celle des feuilles est d'une couleur verte. La concrète apolaire des tubercules et des feuilles ayant l'odeur caractéristique de la plante (Figure en Appendice D).

Pour avoir une idée sur quelques constituants de la concrète, en particulier la présence de l'acide aristolochique, nous avons réalisé un balayage par spectrophotométrie ultraviolet- visible

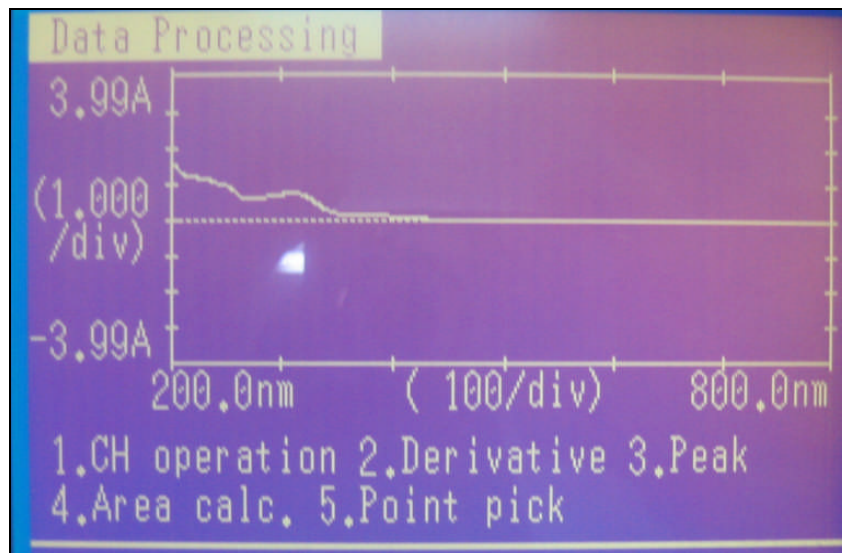


Figure 3.8 : Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des tubercules.

Tableau 3.8: Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des tubercules.

Longueur d'onde (nm)	269,0	322,0	227,0
Densité optique	0,006	0,485	2,382

Nous remarquons, d'après les résultats du tableau 3.9 et la figure 3.8, que la concrète des tubercules absorbe surtout dans les longueurs d'onde où absorbe l'acide aristolochique et ses dérivés (290 nm à 300 nm [23]). Donc l'acide aristolochique est le métabolite secondaire majoritaire dans les tubercules.

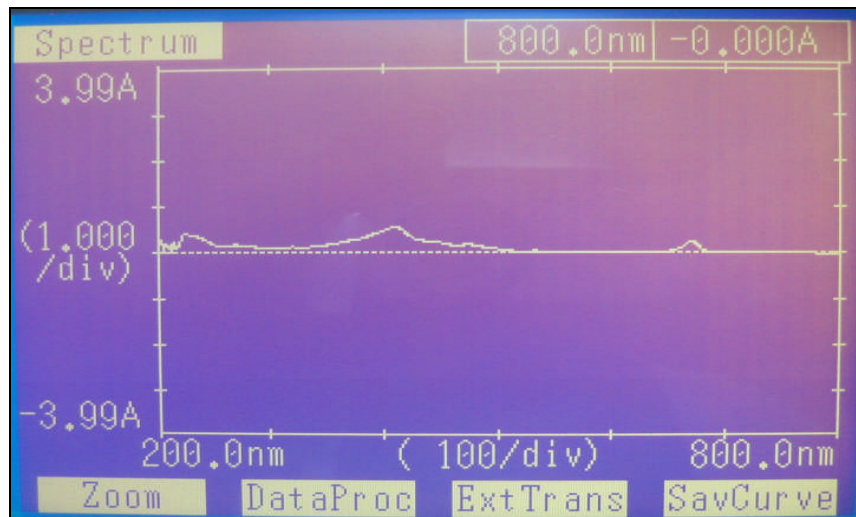


Figure 3.9 : Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des feuilles.

Tableau 3.9 : Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète apolaire des feuilles.

Longueur d'onde (nm)	669,0	610,0	560,0	533,0	475,0	411,0	321,0	270,0
Densité optique	0,248	0,034	0,017	0,047	0,185	0,579	0,139	0,182

Les résultats du tableau 3.9 montrent que la concrète apolaire des feuilles est riche en chlorophylle. Car l'absorbance à 669 nm est la plus élevée. Nous remarquons que cette concrète contient des caroténoïdes et dérivés (domaine 400 nm et 498 nm). Il y a



aussi une absorption dans le domaine de l'acide aristolochique et ses dérivés (entre 290 nm et 300 nm) (Figure 3.9).

### Extraction des métabolites secondaires

L'extraction des métabolites secondaires, représentés par la concrète polaire alcoolique, des feuilles et des tubercules donne les résultats regroupés dans le tableau 3.10.

Tableau 3.10 : Teneur en composés polaires des tubercules et des feuilles

	Tubercules	Feuilles
Pesée de la poudre (en g)	10,0034 ± 00,0034	10,0002 ± 00,0002
Pesée de la concrète (en g)	01,1775 ± 00,00006	00,8638 ± 00,0005
pourcentage	17,7443 ± 00,0005	08,6379 ± 00,0047

Les métabolites secondaires représentent 17,7443% et 08,6379% de la matière sèche respectivement dans les tubercules et dans les feuilles (Tableau 3.10). Nous remarquons, d'après ces résultats, que les tubercules sont plus riches en métabolites secondaires comparés aux feuilles.

Les tubercules donnent une concrète jaune- marron ayant l'odeur de la plante. Les feuilles donnent une concrète de couleur verte et l'odeur est celle qui caractérise *Aristolochia longa* L. (Figure en appendice D).

Comme pour les concrètes apolaires, nous avons réalisé une analyse par spectrophotométrie ultraviolet-visible pour détecter quelques groupements fonctionnels

dans ces concrètes. Nous avons cherché, en particulier, les longueurs d'onde de l'acide aristolochique et ses dérivés.

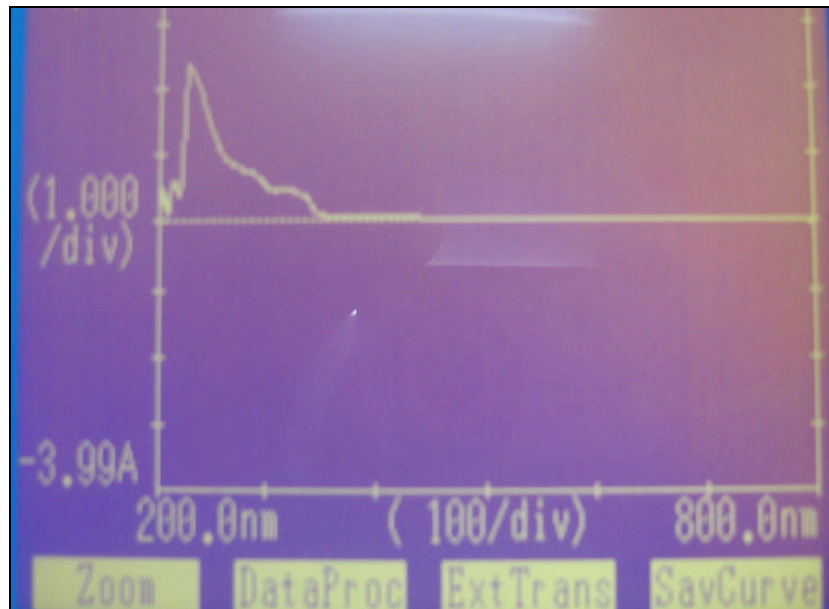


Figure 3.10 : Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des tubercules.

Tableau 3.11: Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des tubercules.

Longueur d'onde (nm)	Densité optique
386.0	0.125
312.0	0.751

Le tableau 3.11 montre que la concrète polaire des tubercules présente une absorbance uniquement dans le domaine de l'acide aristolochique et ses dérivés (Figure 3.10). Les autres composés qui absorbent dans d'autres longueurs d'ondes ont

éventuellement une concentration faible, ainsi, ils ne sont pas détectés par spectrophotométrie ultraviolet-visible.

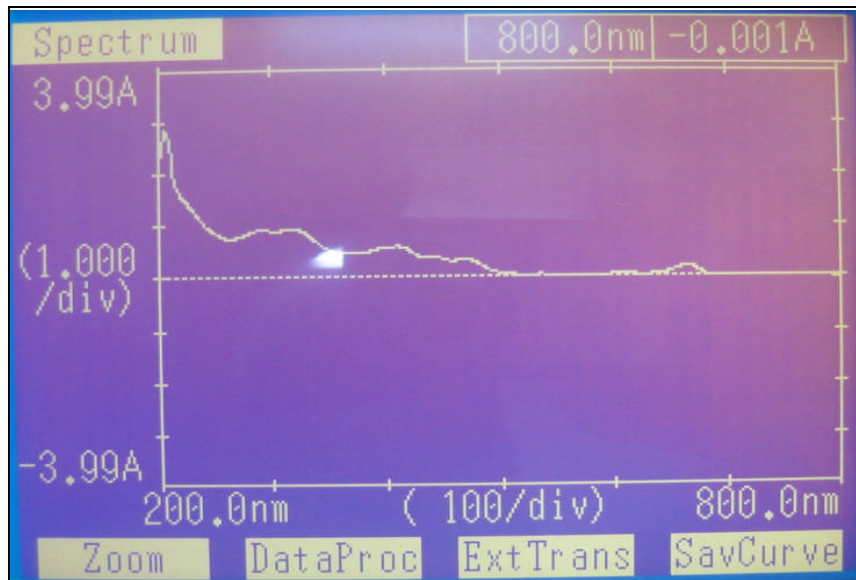


Figure 3.11 : Balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des feuilles.

Tableau 3.12 : Résultats du balayage par spectrophotométrie UV-visible de la concrète polaire des feuilles.

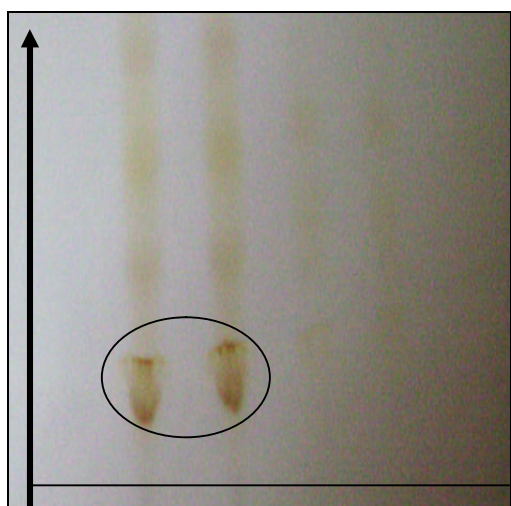
Longueur d'onde (nm)	664,0	608,0	536,0	469,0	411,0	318,0	291,0
Densité optique	0,212	0,056	0,047	0,339	0,592	0,943	0,929

Les résultats du tableau 3.12 et la figure 3.11 montrent que cette concrète présente trois domaines d'absorption :

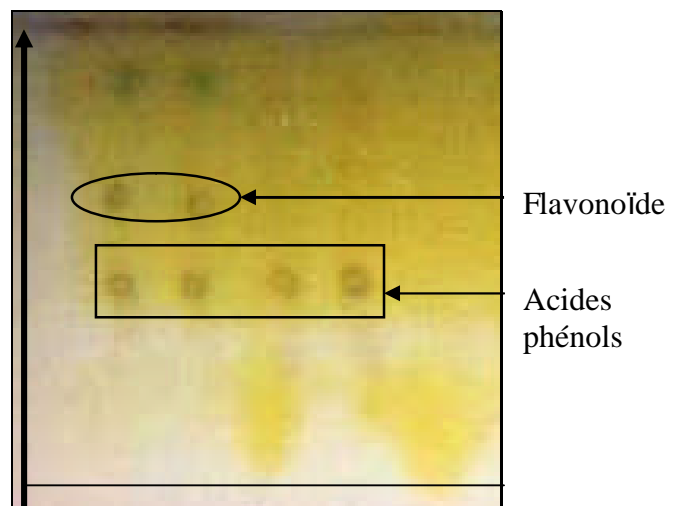
- Selon LAFONT [67] le domaine d'absorption qui se situe entre 600 nm et 664 nm correspond aux chlorophylles.
- Alors que le domaine de 400 nm à 498 nm est caractéristique des caroténoïdes et dérivés [67].
- Les longueurs d'ondes situés entre 228 nm et 376 nm sont propres à l'acide aristolochique et ses dérivés selon YUAN et al [23]. Le domaine de 291 nm à 300 nm est propre aux composés benzéniques [67].

L'analyse des concrètes, apolaire et polaire, des tubercules et des feuilles de *Aristolochia longa* L. révèle que les tubercules sont plus riches en acide aristolochique comparés aux feuilles. Les concrètes de ces dernières sont particulièrement riches en chlorophylle.

Révélation des métabolites secondaires après séparation par chromatographie sur couche mince

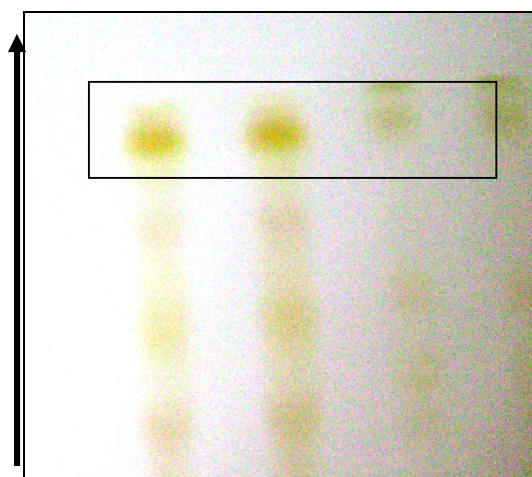


a/ révélation des alcaloïdes



b/ révélation des flavonoïdes et des acides

phénols



c/ révélation des quinones

Figure 3.12: Résultats de la chromatographie sur couche mince.

Les métabolites secondaires séparés par chromatographie sur couche mince ont été révélés (Figure 3.12) et les  $R_f$  ont été calculés pour chaque métabolite. Le résultat de la caractérisation de ces métabolites apparaît dans les tableaux 3.13.

Tableau 3.13 : Résultats de la caractérisation des métabolites secondaires

	Chlorure d'aluminium	Chlorure ferrique	Potasse alcoolique	Réactif de Dragendorff
Tubercules	-	+	+	+
Feuilles	+	++	+	-

Nous remarquons que la plante, *Aristolochia longa* L., contient des acides phénols (Figure 3.12 b) et des quinones (Figure 3.12 c) dans les feuilles et les tubercules (tableau 3.13). Les alcaloïdes ont été caractérisés au niveau des tubercules seulement (Figure 3.12 a et tableau 3.13), alors que les flavonoïdes et les flavones ne se trouvent

que dans les feuilles (Figure 3.12 b et tableau 3.13). Le tableau 3.14 regroupe les métabolites secondaires caractérisés et leur *Rf* correspondant.

Tableau 3.14 : Taux de migration (*Rf*) des métabolites secondaires caractérisés

	alcaloïdes	Acides phénol	Flavonoïdes	Quinones	Flavone
Feuilles	-	0,3074 cm	0,3815 cm	0,8295 cm	0,5852 cm
Tubercules	0,20 cm	0,3074 cm	-	0,8296 cm	-

#### Caractérisation des saponines

Nous avons trouvé que la hauteur de la mousse est inférieure à 1 cm dans tous les tubes. Ce résultat révèle que l'indice de mousse est inférieur à 100, donc les feuilles et les tubercules de *Aristolochia longa* L. contiennent peu de saponines.

#### Caractérisation des tanins

La réaction des tanins avec le chlorure ferrique a donné un précipité de couleur brun-vert. Nous concluons que les feuilles et les tubercules de *Aristolochia longa* L. contiennent des tanins catéchiques (Tableau 1.3 page 29).

Nous avons donc réalisé une étude complète de la composition des tubercules de *Aristolochia longa* L.. Nous pouvons calculer la teneur en fibres alimentaires, en glucides et autres composés tels les acides et les alcools selon l'équation:

Glucides+ fibres alimentaires et autres = total – (eau + protéines + matière minérale + matière apolaire + matière polaire) [76].

Les résultats trouvés dans les différentes étapes de l'étude de la composition biochimique des tubercules apparaissent dans la figure 3.13. Ces résultats donnent une idée globale sur la composition des tubercules de *Aristolochia longa* L.

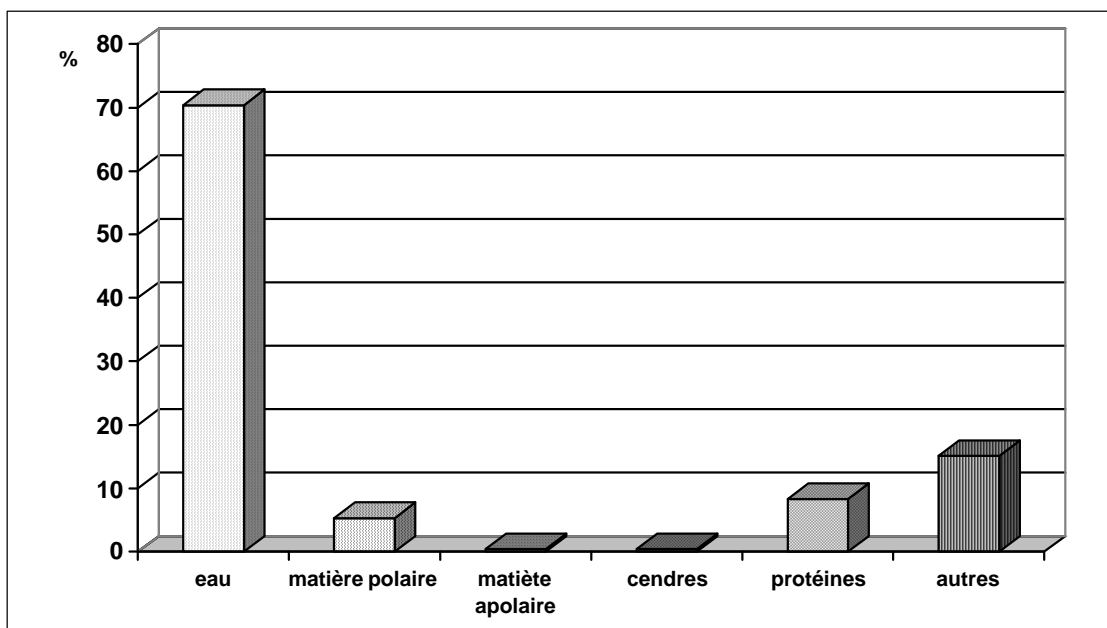


Figure 3.13 : Composition des tubercules.

### 3.1.2.2 Teneur et types des acides aristolochiques

L'extraction des acides aristolochiques s'est faite en deux périodes différentes :

- en période de floraison à partir des feuilles et des tubercules,
- après maturité des graines à partir des tubercules.

L'acide aristolochique purifié est une poudre jaune très fine et très légère (Figure en Appendice D).

Tableau 3.15 : Teneur en acide aristolochique dans les feuilles et les tubercules

	Tubercules		Feuilles
	En floraison	Maturité des graines	
Pesée de la poudre (en g)	100,0016 ± 00,0008	100,0013 ± 00,0003	50,0018 ± 00,0004
Pesée de l'Ac Ar purifié (en mg)	24,9667 ± 00,1700	69,7667 ± 00,0943	04,9333 ± 00,1247
% Ac Ar en poids sec	00,0250 ± 00,0002	00,0698 ± 00,0001	00,0099 ± 00,0002

L'acide aristolochique représente 0,0099% et 0,025% de la matière sèche respectivement dans les feuilles et dans les tubercules pendant la période de floraison (Tableau 3.15). Après maturité des graines, l'acide aristolochique représente 0,0698% de la matière sèche dans les tubercules (Tableau 3.15).

Nous remarquons que la teneur en acide aristolochique dans les feuilles est plus faible que celle des tubercules (Tableau 3.15). En effet, dans les tubercules, cette teneur est approximativement 2,5 fois plus élevée que celle observée dans les feuilles en période de floraison.

En outre, la teneur en acide aristolochique dans les tubercules après maturité des graines est approximativement trois fois plus élevée que celle observée en période de floraison (Tableau 3.15).

L'acide aristolochique purifiés et les extraits alcooliques à partir des tubercules et des feuilles ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance. Cette analyse permet d'identifier les acides aristolochiques présents dans la plante *Aristolochia longa* L.

### Résultats de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

#### Période de floraison

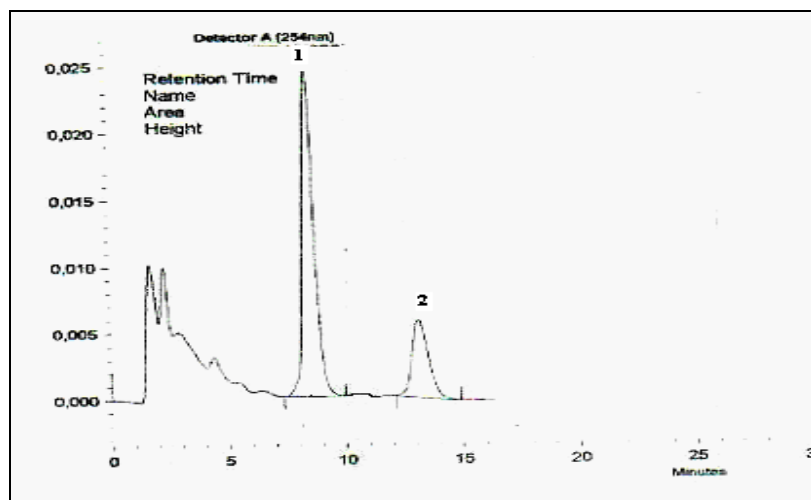


Figure 3.14 : Analyse du standard par HPLC



Tableau 3.16 : Résultats de l'analyse du standard

	Pic 1	Pic 2
Temps de rétention (en min)	7 à 8	12 à 13
%	75,85	24,15

Le standard est un mélange de l'acide aristolochique I (29%) et de l'acide aristolochique II (69%). Nous remarquons que l'aire du pic n°1 est plus importante que celle du pic n°2 (Tableau 3.16). Donc le pic n°1 correspond à l'acide aristolochique le plus concentré dans le standard à savoir l'acide aristolochique II. Le pic n°2 est celui de l'acide aristolochique I (Figure 3.14).

Selon les résultats de la figure 3.14, le temps de rétention de l'acide aristolochique I se situe entre 12 min et 13 min, alors que celui de l'acide aristolochique II se situe entre 7 min et 8 min.

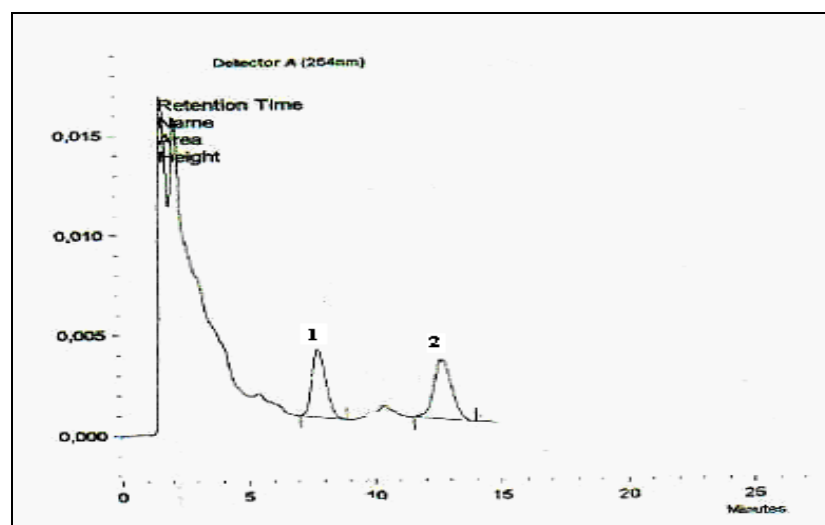


Figure 3.15 : Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC

Tableau 3.17 : Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des feuilles

	Pic n°1	Pic n°2
Temps de rétention (en min)	7,80	12,71
%	46,10	53,90

Le chromatogramme de la concrète alcoolique des feuilles montre deux pics (Figure 3.15). Le pic n°1 montre un temps de rétention de l'acide aristolochique II, alors que le pic n°2 montre un temps de rétention de l'acide aristolochique I (Tableau 3.17).

Les feuilles contiennent donc l'acide aristolochique I et l'acide aristolochique II. En cette période, nous remarquons que les acides aristolochiques I et II ont presque la même concentration dans les feuilles (Tableau 3.17). Cependant, la teneur en acide aristolochique I des feuilles est légèrement plus élevée que leur teneur en acide aristolochique II.

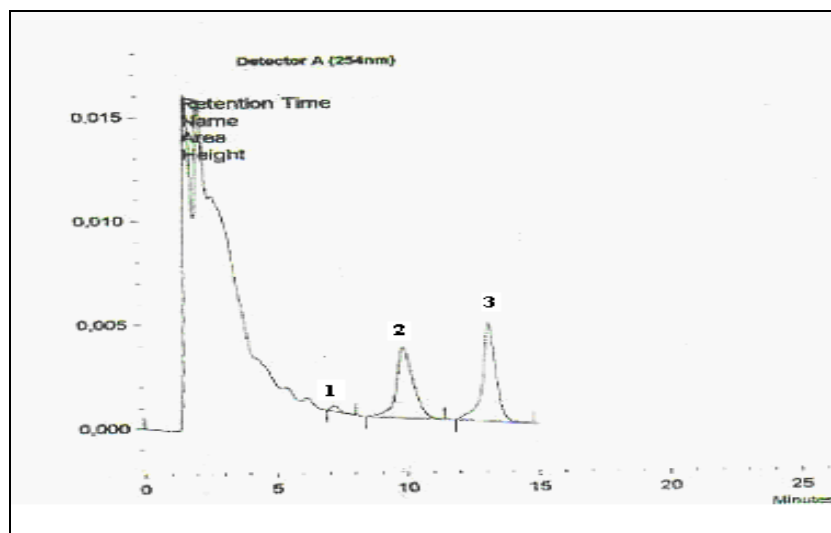


Figure 3.16: Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC.

Tableau 3.18 : Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des tubercules

	Pic n°1	Pic n°2	Pic n°3
Temps de rétention (en min)	7.23	9,91	13,20
%	1,85	46,61	51,54

Pendant la période de floraison, le chromatogramme des tubercules montre trois pics (Figure 3.16). La comparaison des temps de rétention des pics de ce chromatogramme avec ceux du chromatogramme du standard permet d'identifier les acides aristolochiques I et II dans l'extrait alcoolique des tubercules (Tableau 3.18). Nous remarquons ainsi que:

- Le pic n°1, présente un temps de rétention de 7,23 min qui correspond à celui de l'acide aristolochique II.
- Le pic n°2, présente un temps de rétention de 9,91 min. Nous n'avons pas pu identifier cette molécule. Ce pic correspondrait éventuellement à un autre type d'acide aristolochique.
- Le pic n°3, présente un temps de rétention de 13,20 min qui correspond à celui de l'acide aristolochique I.

Nos résultats montrent que les tubercules de *Aristolochia longa* L. contiennent les acides aristolochiques I et II. Un troisième type d'acide aristolochique peut éventuellement être présent dans les tubercules.

Nous remarquons que l'acide aristolochique I présente des teneurs appréciables aussi bien dans les tubercules que dans les feuilles. Dans les tubercules, il représente 51,54% des pics détectés. Néanmoins, la teneur en acide aristolochique II est plus faible dans les tubercules en comparaison avec celle contenue dans les feuilles. En effet, l'acide aristolochique II représente 1,85% des pics détectés dans l'extrait

alcoolique des tubercules alors que dans l'extrait alcoolique des feuilles il est de 46,10%.

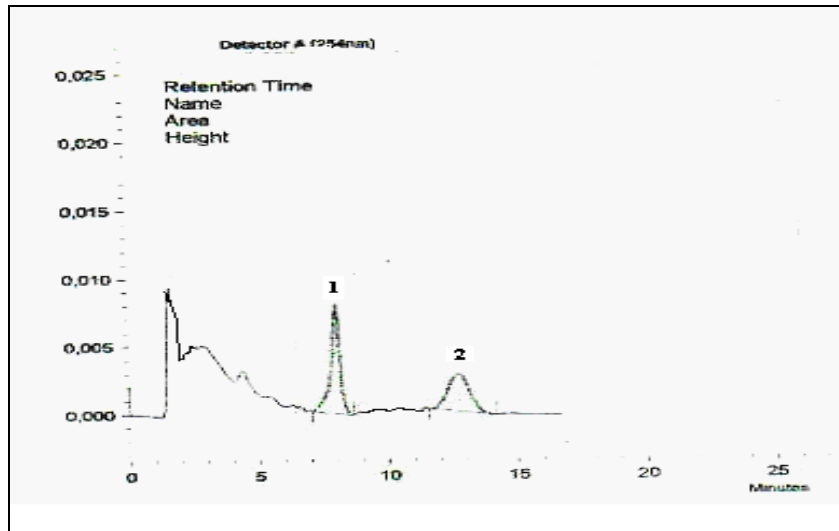


Figure 3.17: Analyse de l'acide aristolochique purifié des feuilles par HPLC.

Tableau 3.19 : Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des feuilles

	Pic1	Pic2
Temps de rétention (en min)	7,45	13,36
%	46,21	53,79

Les résultats du tableau 3.19 et de la figure 3.17 montrent que l'acide aristolochique purifié à partir des feuilles contient les acides aristolochiques I et II. Ce qui confirme que les feuilles de *Aristolochia longa* L., en période de floraison, contiennent deux types d'acide aristolochique, qui sont l'acide aristolochique I et l'acide aristolochique II.

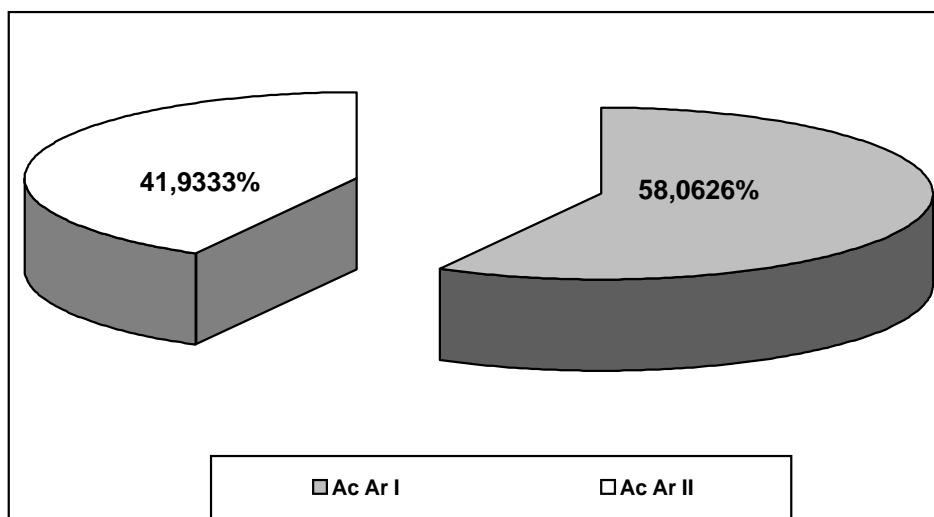


Figure 3.18 : Composition de l'acide aristolochique purifié des feuilles en période de floraison.

Les résultats de la figure 3. 18 révèlent que l'acide aristolochique I est le type d'acide aristolochique majoritaire dans les feuilles en période de floraison. Il représente 58,0626% de l'acide aristolochique purifié des feuilles (Figure 3.18).

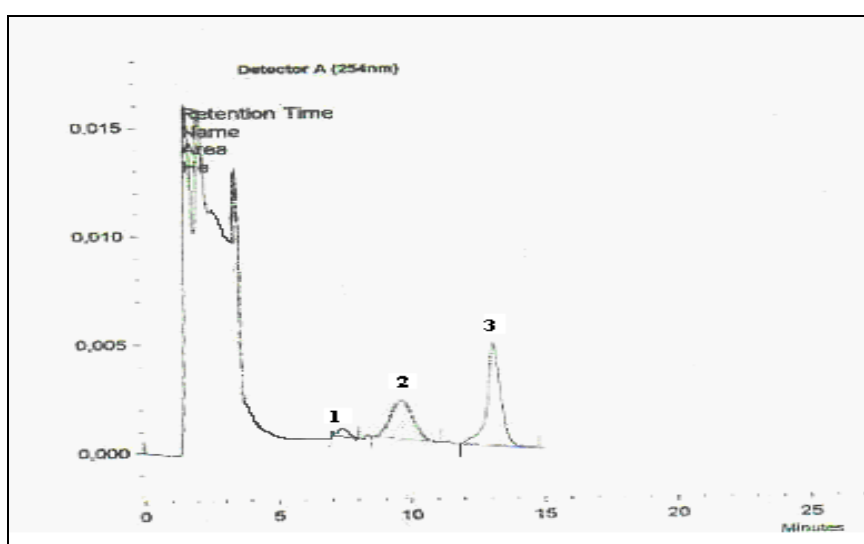


Figure 3.19 : Analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules par HPLC.

Tableau 3.20 : Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules

	Pic n°1	Pic n°2	Pic n°3
Temps de rétention (en min)	7,11	9,95	13,35
%	1,87	46,59	51,54

L'acide aristolochique purifié, à partir des tubercules en période de floraison, donne le même résultat que l'extrait alcoolique de ces organes. Le chromatogramme de l'acide aristolochique purifié des tubercules montre trois pics (Figure 3.19):

- Le pic n°1 présente un temps de rétention de 7,11 min (Tableau 3.20) qui correspond à celui de l'acide aristolochique II.
- Le pic n°2 présente un temps de rétention de 9,95 min (Tableau 3.20). Nous n'avons pas pu identifier cette molécule. Nous avons caractérisé ce pic dans l'extrait alcoolique des tubercules. Donc ce pic ne peut être qu'un autre type d'acide aristolochique. Il peut éventuellement correspondre soit à l'acide aristolochique III soit à l'acide aristolochique IV [28], [51].
- Le pic n°3 présente un temps de rétention de 13,35 min qui correspond à celui de l'acide aristolochique I (Tableau 3.20).

Selon DEPASCUAL et al [51] et KUMAR et al [28] *Aristolochia longa* L. contient l'acide aristolochique III et l'acide aristolochique IV dans les tubercules. Ces deux types d'acide aristolochique n'ont pu être observés dans les feuilles. Ainsi, nous supposons que ces deux acides ne sont pas présents dans les feuilles ou bien que leur concentration est très faible pendant la période de floraison.

Toutefois, nos résultats nous permettent d'énoncer que l'acide aristolochique III et l'acide aristolochique IV n'existent que dans les tubercules pendant la période de floraison.

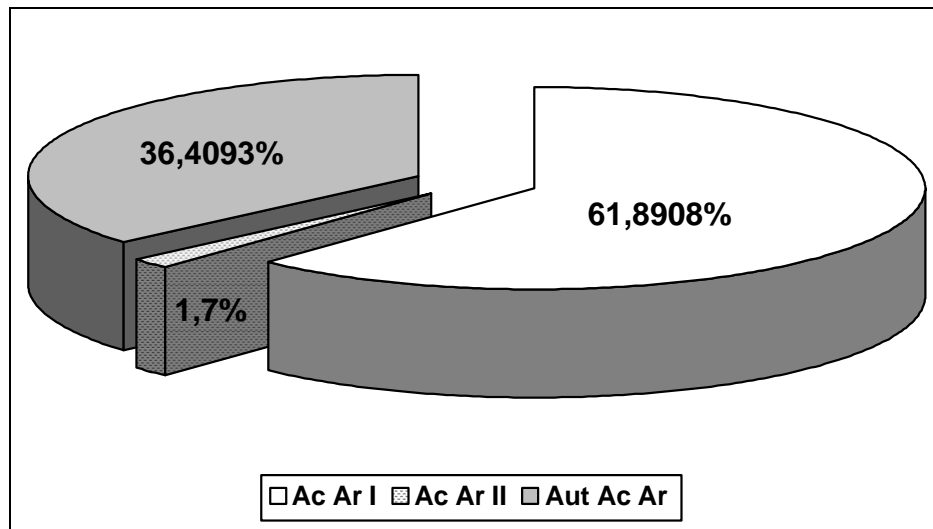


Figure 3.20: Composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules en période de floraison.

En comparant les résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des feuilles et des tubercules, nous remarquons que :

- aussi bien les feuilles que les tubercules contiennent les acides aristolochiques I et II.
- dans les tubercules (Figure 3.20) comme dans les feuilles, l'acide aristolochique I est le type d'acide aristolochique majoritaire.
- Les tubercules contiennent probablement un troisième type d'acide aristolochique qui peut correspondre éventuellement à l'acide aristolochique III ou IV pendant la période de floraison (Figure 3.20).

#### Après maturité des graines

Au cours de cette période, nous avons analysé les extraits alcooliques de feuilles et des tubercules. L'acide aristolochique a été extrait à partir des tubercules seulement.

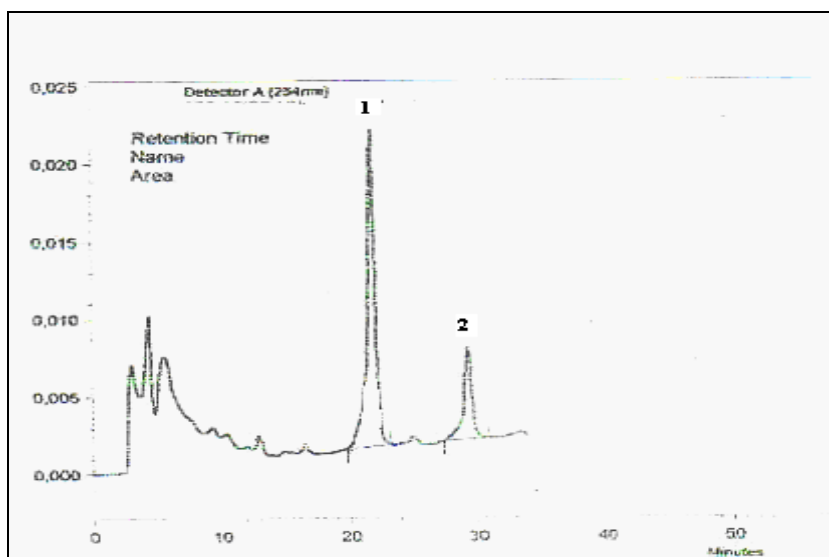


Figure 3.21: Analyse du standard par HPLC.

Tableau 3.21 : Résultats de l'analyse du standard

	Pic n°1	Pic n°2
Temps de rétention (en min)	21 à 22	29 à 30
%	75,85	24,15

Le standard montre deux pics (Figure 3.21) :

- le pic n°1 correspond à l'acide aristolochique II avec un temps de rétention se situant entre 21 min et 22 min.
- le pic n°2 correspond à l'acide aristolochique I avec un temps de rétention se situant entre 30 min et 31 min (Tableau 3.21).

Le pourcentage de l'acide aristolochique II est supérieur à celui de l'acide aristolochique I (Tableau 3. 21). Ce résultat est dû à la composition du standard qui contient 29 % d'acide aristolochique I et 69% d'acide aristolochique II.



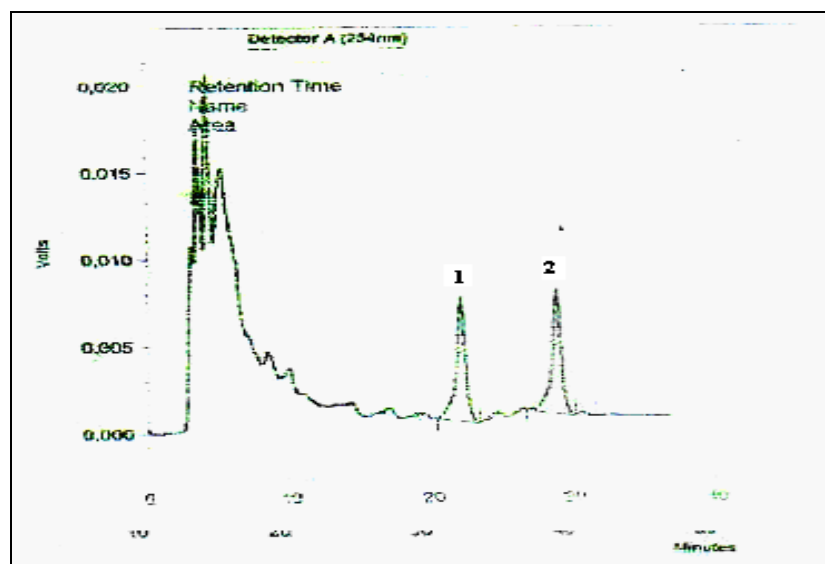


Figure 3.22: Analyse de l'extrait alcoolique des feuilles par HPLC.

Tableau 3.22 : Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des feuilles

	Pic n°1	Pic n°2
Temps de rétention (en min)	22.12	29,12
%	45,72	54,28

Le chromatogramme de l'extrait méthanolique des feuilles montre deux pics (Figure 3.22). La comparaison du temps de rétention de ces pics avec le temps de rétention des acides aristolochiques du standard permet d'identifier l'acide aristolochique I et l'acide aristolochique II. Le pic n°1 correspond à l'acide aristolochique II et le pic n°2 correspond à l'acide aristolochique I (Tableau 3.22).

Nous remarquons que, dans les feuilles, la teneur en acide aristolochique I est proche de celle de l'acide aristolochique II, avec une légère dominance de l'acide aristolochique I. Ce résultat est identique à celui observé dans les feuilles chez les plantes de *Aristolochia longa* L. en période de floraison.

Nous pouvons conclure alors que les feuilles de *Aristolochia longa* L. contiennent les acides aristolochiques I et II dans des proportions proches en période de floraison et après maturité des graines.

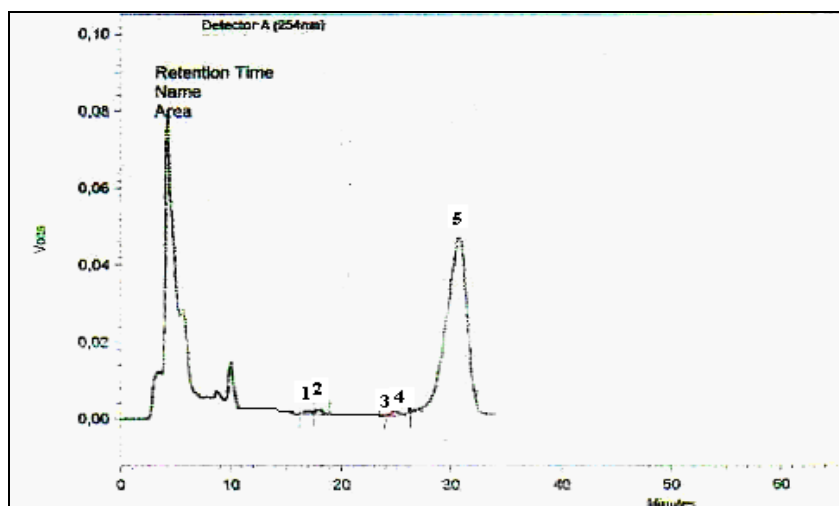


Figure 3.23: Analyse de l'extrait alcoolique des tubercules par HPLC.

Tableau 3.23 : Résultats de l'analyse de l'extrait alcoolique des tubercules

	Pic n°1	Pic n°2	Pic n°3	Pic n°4	Pic n°5
Temps de rétention (en min)	17,16	18,04	22,94	24,99	30,15
%	0,53	0,93	0,11	0,74	97,70

Le chromatogramme de l'extrait alcoolique des tubercules montre cinq pics (Figure 3.23). Après maturité des graines, nous avons identifié l'acide aristolochique I (pic n°5) et l'acide aristolochique II (pic n°3) par comparaison des temps de rétention (Tableau 3.23).

Nous remarquons que la teneur en acide aristolochique I des tubercules augmente. Il est majoritaire et représente 97,70 % des pics détectés. Au contraire L'aire du pic de l'acide aristolochique II diminue. Après maturité des graines, il ne représente que 0.11 % des pics caractérisés.

Les pics n°1, n°2 et n°4 peuvent correspondre éventuellement à d'autres types d'acide aristolochique ou à d'autres métabolites secondaires présents dans l'extrait alcoolique des tubercules. Ces pics représentent respectivement 0.53 %, 0,93 % et 0,74 % des pics détectés dans l'extrait alcoolique des tubercules après maturité des graines (Tableau 3.23).

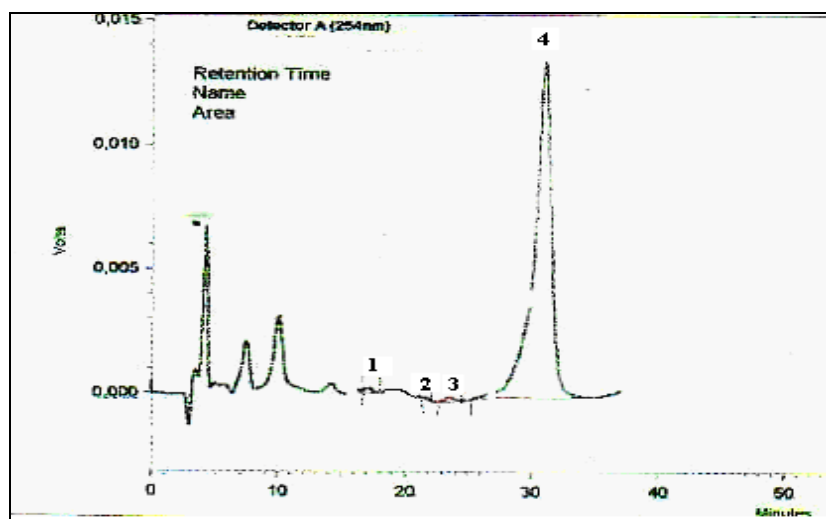


Figure 3.24 : Analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules par HPLC.

Tableau 3.24 : Résultats de l'analyse de l'acide aristolochique purifié des tubercules

	Pic n°1	Pic n°2	Pic n°3	Pic n°4
Temps de rétention (en min)	18,85	22,76	24,99	30,19
%	0,89	1,15	0,74	97,22

Le chromatogramme de l'acide aristolochique purifié, à partir des tubercules, montre quatre pics (Figure 3.24). La comparaison des temps de rétention des pics détectés dans l'acide aristolochique purifié des tubercules ( Tableau 3.24) avec ceux du standard permet d'identifier l'acide aristolochique I et l'acide aristolochique II . Ces acides aristolochiques sont représentés respectivement par le pic n°4 et le pic n°2 (Figure 3.24).

Le pic n°1 et le pic n°3 ont été détectés dans l'extrait alcoolique des tubercules pendant cette période. Ce résultat confirme que les molécules détectées par ces pics correspondent à des acides aristolochiques.

Un test de comparaison de la composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules en période de floraison avec celui purifié après maturité des graines a été effectué. Nous avons préparé un mélange de ces deux acides aristolochiques purifiés.

Nous avons mélangé 0,5 mg de l'acide aristolochique purifié des tubercules en période de floraison et 0,5 mg de l'acide aristolochique purifié de ces organes après maturité des graines dans 10 ml de méthanol. Après dissolution, nous diluons la solution 10 fois dans du méthanol.

Nous avons réalisé une analyse par HPLC dans les mêmes conditions que l'analyse des concrètes alcooliques, des feuilles et des tubercules, et l'acide aristolochique purifié des tubercules après maturité des graines. Le résultat de ce test apparaît dans la figure 3.25.

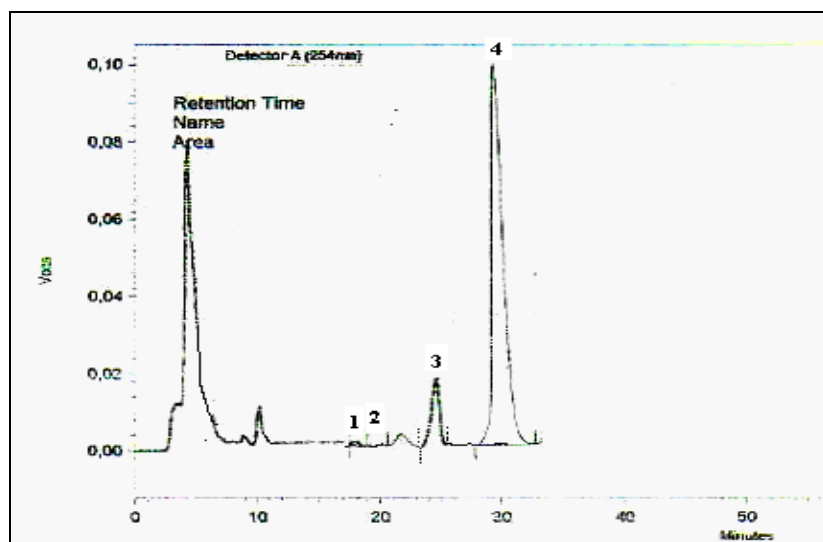


Figure 3.25 : Analyse du mélange des deux acides aristolochiques purifiés des tubercules.

Tableau 3.25 : Résultats du test de confirmation

	Pic1	Pic2	Pic3	Pic4
Temps de rétention (en min)	18,15	22,88	25,01	30,24
%	0,43	1,65	27,94	69,98

Les résultats du tableau 3.25 et de la figure 3.25 montrent que :

- Le pic n°2 présente le temps de rétention de l'acide aristolochique II. L'aire de ce pic augmente dans le mélange des deux acides aristolochiques purifiés des tubercules par rapport à l'acide aristolochique purifié des tubercule après maturité des graines. Ce qui confirme sa présence dans les deux acides aristolochiques purifiés des tubercules.

- Le pic n°3 présente une augmentation importante dans ce test. Cette augmentation est due à sa concentration qui est importante dans l'acide aristolochique purifié des tubercules en période de floraison.
- l'acide aristolochique I, représenté par le pic n°4, reste le type d'acide aristolochique majoritaire.
- Donc le pic n°1 correspond à l'acide aristolochique présent dans les tubercules après maturité des graines. Ce type d'acide aristolochique n'a pas été détecté dans l'acide aristolochique purifié des tubercules en période de floraison.

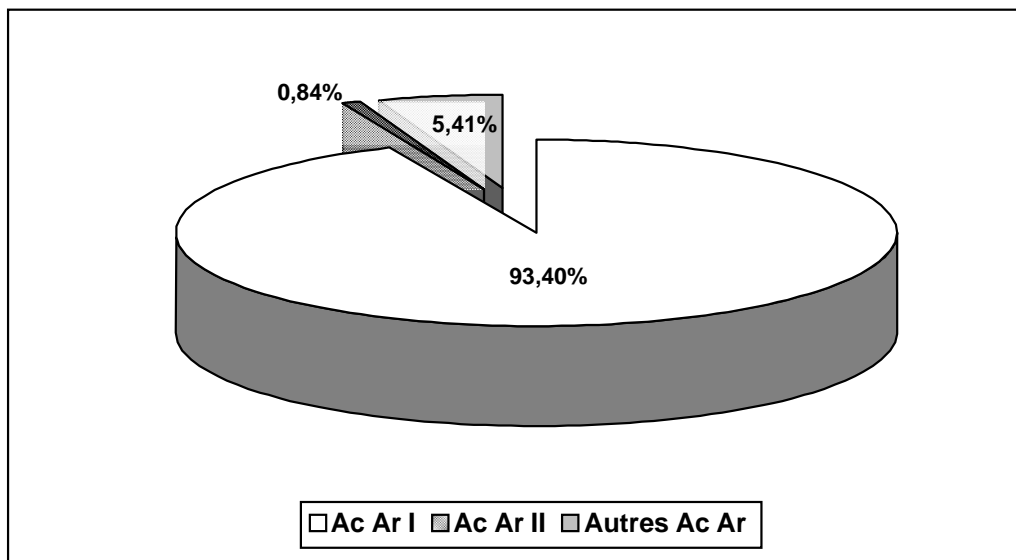


Figure 3.26 : Composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules après maturité des graines

Nous remarquons, d'après les résultats de la figure 3.26 (Tableau des calculs est en appendice D), que :

- la teneur des tubercules en acide aristolochique I augmente. Il représente environ 93,40% de l'acide aristolochique purifié.

- La teneur en acide aristolochique II augmente aussi. Ce dernier ne représente que 0,84% de l'acide aristolochique purifié en cette période.
- L'acide aristolochique purifié des tubercules présente quatre pics, révélant la présence d'un autre type d'acide aristolochique pendant cette période. Cet acide aristolochique n'a pas été caractérisé en période de floraison. Cette absence peut être due à sa faible concentration, ou à une absence totale au niveau des tubercules pendant la période de floraison.

La comparaison de la composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules, sur deux périodes, nous a permis de remarquer que :

- l'acide aristolochique I est le type d'acide aristolochique majoritaire pendant les deux périodes. Sa teneur augmente après maturité des graines.
- La teneur en acide aristolochique II est la plus faible. Elle augmente après maturité des graines.
- Les autres types d'acide aristolochique détectés ont une quantité plus importante en période de floraison qu'après maturité des graines.

L'utilisation de *Aristolochia longa* L. en médecine populaire diffère selon le besoin. Selon THEILENS [46], *Aristolochia longa* L. peut être utilisée sous forme :

- de décoction ou d'infusion (10 à 15 grammes par kilogramme d'eau),
- de poudre (4 à 5 grammes avec du miel),
- d'extrait alcoolique (2 à 4 grammes).

En se basant sur les résultats de la purification et de l'analyse de l'acide aristolochique purifié, nous avons calculé la teneur en acide aristolochique I et en acide aristolochique II dans un gramme de matière sèche et de concrète alcoolique.

Ces calculs ont été faits dans le but, d'une part, de déterminer la toxicité de la matière sèche et de l'extrait alcoolique et, d'autre part, de comparer la toxicité de la

matière sèche et de la concrète alcoolique de *Aristolochia longa* L. par rapport à d'autres espèces *Aristolochia* étudiées à travers le monde.

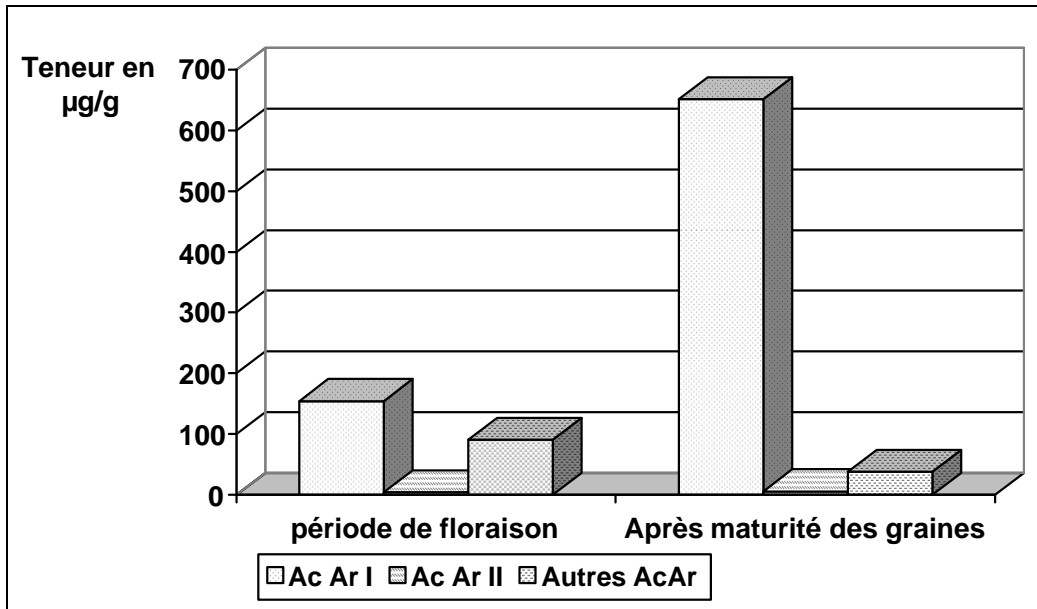


Figure 3.27 : Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche des tubercules.

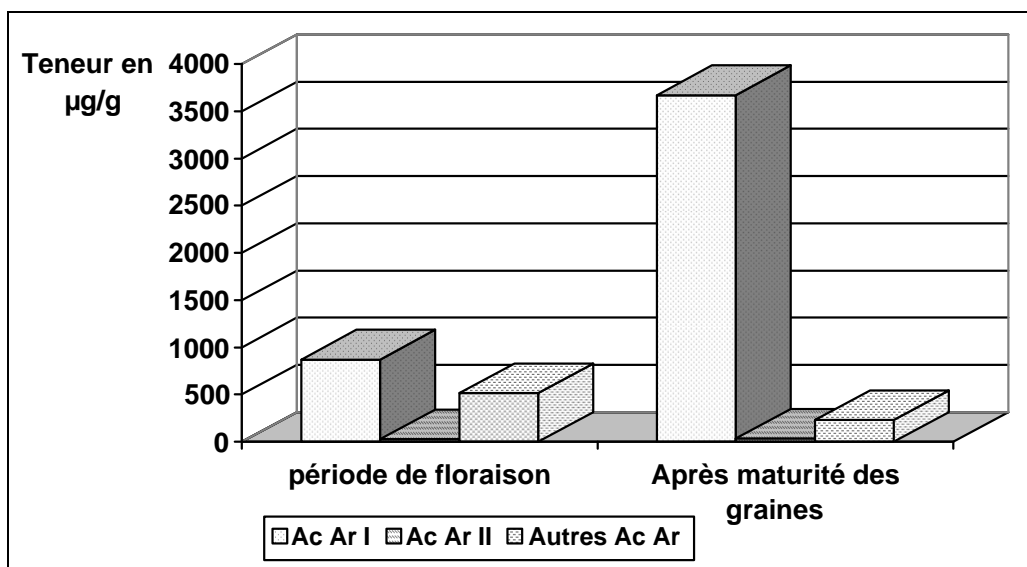


Figure 3.28 : Teneur en acide aristolochique dans la concrète alcoolique des tubercules.



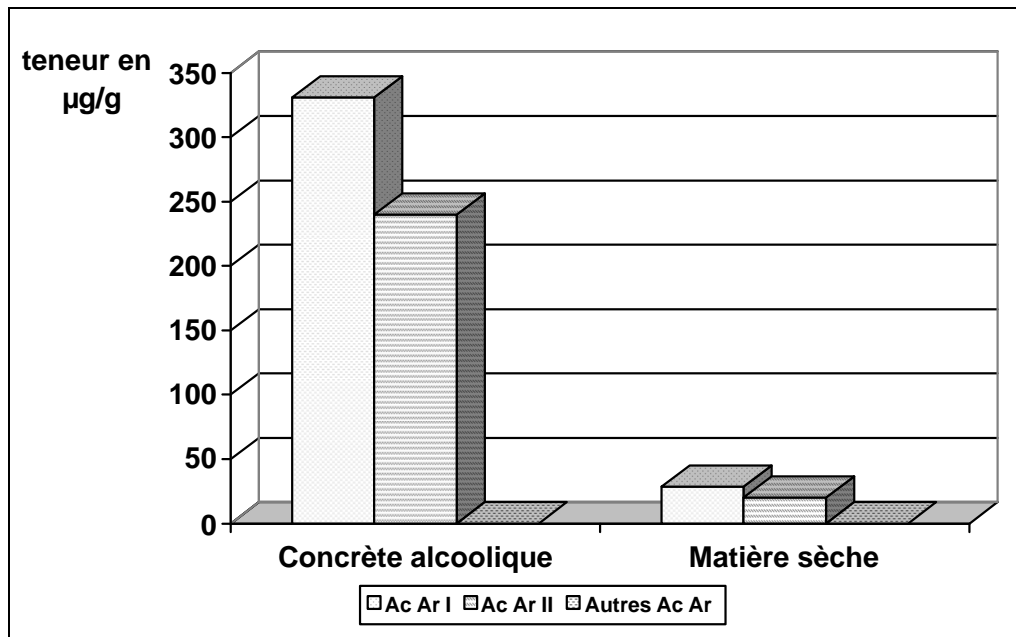


Figure 3.29 : Teneur en acide aristolochique dans la matière sèche et la concrète alcoolique des feuilles en période de floraison.

D'après les figures 3.27, 3. 28 et 3. 29, nous avons remarqués que :

- La teneur en acide aristolochique dans la matière sèche et la concrète alcoolique des tubercules est plus importante après maturité des graines en comparaison avec la période de floraison (Figure 3.27 et Figure 3.28).
- L'acide aristolochique I est le type d'acide aristolochique dominant dans les feuilles et dans les tubercules pendant les deux périodes (Figure 3.27, Figure 3.28 et Figure 3.29).
- La teneur des feuilles en acide aristolochique est plus faible que celle des tubercules (Figure 3.27, Figure 3.28 et Figure 3.29).

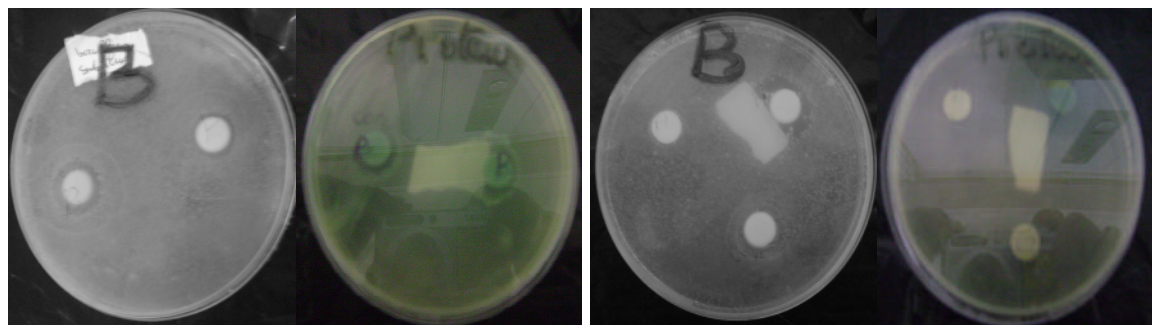
### 3.1.2.3 Essai antibactérien

Le pouvoir antibactérien de l'acide aristolochique purifié après maturité des graines a été testé. Un essai antibactérien a été réalisé aussi pour l'extrait alcoolique des

tubercules récoltés pendant cette période. Les résultats sont regroupés dans le tableau 3.26.

Tableau 3.26 : Résultats du test antibactérien

	Concrète	Ac Ar
<i>Bacillus subtilis</i> (B)	1,3 cm	-
<i>Proteus vulgaris</i>	1,5 cm	1,5 cm
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
<i>Pseudomonas sp</i>	-	-
<i>Serratia marcesens</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoneae</i>	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-



a/ Concrète alcoolique

b/ Acide aristolochique

Figure 3. 30 : Résultats du test antibactérien

La concrète alcoolique des tubercules de *Aristolochia longa* L. est active sur *Bacillus subtilis* et sur *Proteus vulgaris* (Figure 3.30 a). Elle n'a pas d'action sur les autres souches testées (Tableau 3.26).

L'acide aristolochique est aussi actif sur *Proteus vulgaris* (Figure 3.32 b). Il est inactif sur les autres souches testées (Tableau 3.26).

Détail de nos résultats est en Appendice C.

### 3.2 Discussion

L'étude de la matière minérale de *Aristolochia longa* L. révèle que les cendres représentent 02,1333% de la matière sèche des tubercules. Ce pourcentage montre que *Aristolochia longa* L. est riche en matière minérale par rapport au blé [76]. Dans ce dernier, la matière minérale représente 01.19%. Cette proportion paraît faible pour être responsable de la propriété diurétique de *Aristolochia longa* L..

L'analyse des minéraux qui compose cette fraction minérale a été réalisée par spectrométrie d'absorption atomique et par chromatographie ionique. Nous avons remarqué que parmi le sodium, le magnésium, le fer, le calcium, le cuivre et le potassium qui ont été détectés, le calcium est majoritaire.

D'après FLUK [5], les sels de calcium participent à l'élaboration du système osseux, à la régulation du système nerveux et à la résistance aux maladies infectieuses. Nous pouvons donc comprendre pourquoi cette espèce s'utilise, selon GADHI et al [54] et GADHI et al [55] contre les infections cutanées et les infections de la partie supérieure du tractus respiratoire.

Nous avons distingué dans les anions de la fraction minérale des fluorites, des phosphates et des nitrites. Nous avons constaté que les nitrites sont les anions majoritaires. La dominance de ces anions peut avoir une relation avec la toxicité connue de cette plante. En effet, les nitrites consommés par l'homme peuvent être transformés en nitrosamines dans l'estomac. Puisque celui-ci contient un pH acide. Cela permettrait la formation de l'acide nitreux ( $\text{NO}_2\text{H}$ ) [83]. Ce dernier agirait sur les amines secondaires et tertiaires pour former des nitrosamines cancérogènes [83], [84].

Par son pouvoir oxydant, le nitrite à fortes quantités devient toxique pour l'homme puisqu'il est apte à oxyder l'hémoglobine sanguine [83].

En effet, les ions nitrites réagissent avec l'hémoglobine et forment un complexe avec l'hème [85]. Ils provoquent l'oxydation du  $Fe^{++}$  en  $Fe^{+++}$ . La méthémoglobine ne peut pas fixer l'oxygène, d'où une réduction de la capacité sanguine à transporter l'oxygène [84].

Si le nitrite de *Aristolochia longa* L. ne se trouve pas à l'état libre mais complexé avec le sodium, le risque de toxicité peut être plus élevé. Car des études expérimentales montrent que le test de mutagenèse et cytogénétique du nitrite de sodium est positif avec des cellules de mammifères. Il est capable de provoquer des mutations au niveau de la moelle osseuse de souris, du rat et du lapin. Ainsi, le carcinome du pré-estomac provoqué par ce complexe a été signalé chez la souris [84].

La caractérisation de quelques métabolites secondaires dans la concrète alcoolique de *Aristolochia longa* L. révèle qu'elle est riche en ces substances. Nous avons pu, dans ce travail, révéler les acides phénols, les tanins catéchiques et les quinones aussi bien dans les feuilles que dans les tubercules. Les alcaloïdes ont été caractérisés au niveau des tubercules seulement, alors que les flavonoïdes et les flavones ne se présentent que dans les feuilles.

La présence des flavonoïdes dans les feuilles seulement est due à sa fonction de protection des organes végétaux contre les rayons ultraviolets [34].

La présence des alcaloïdes dans les tubercules révèle que ces organes sont toxiques. Nous avons trouvés que FOURNIER et al [86] ont classé les alcaloïdes parmi les poisons. Ces substances peuvent affecter de manière importante le fonctionnement du système nerveux et provoquer des problèmes de tremblement, de coordination, de battements cardiaques faibles, le coma et la mort par arrêt respiratoire [86].

La purification de l'acide aristolochique, à partir des feuilles et des tubercules, nous a permis de déterminer sa teneur dans cette espèce. Les calculs nous amènent à faire le pourcentage en matière sèche de ce principal principe actif dans les feuilles et

les tubercules pendant deux périodes différentes (en floraison et après maturité des graines).

Nous avons trouvé que la quantité de l'acide aristolochique est plus élevée dans les tubercules que dans les feuilles. Ce métabolite représente 0,0099% et 0,025% de la matière sèche respectivement des feuilles et des tubercules en période de floraison. La teneur des tubercules en acide aristolochique augmente après maturité des graines. En cette période ce métabolite représente 0,0698% de la matière sèche des tubercules.

L'étude de CARRERAS [80] sur la teneur en acide aristolochique de *Aristolochia baetica* révèle que ce métabolite représente 0,107% de la matière sèche des tubercules. Alors que, ce même métabolite représente 0,0009% de la matière sèche des feuilles de *Aristolochia acutifolia* selon le résultat PALMERIA JUNIOR et al [87].

Selon CARRERAS [80], PALMERIA JUNIOR et al [87] et en prenant en considération nos résultats, nous observons que la teneur des feuilles en acide aristolochique est plus élevée chez *Aristolochia longa* L. (0,0099%) par rapport à *Aristolochia acutifolia* (0,0009%). La teneur en acide aristolochique des feuilles de *Aristolochia longa* L. est environ 11 fois plus élevée que dans les feuilles de *Aristolochia acutifolia*. La teneur en acide aristolochique des tubercules de *Aristolochia longa* L. est respectivement 0,025% et 0,0968% en période de floraison et après maturité des graines. Cette teneur est plus faible que chez *Aristolochia baetica*.

Les résultats de la teneur en différents acides aristolochiques dans un gramme de matière sèche nous permettent de comparer la teneur de *Aristolochia longa* L. en ce principe actif avec d'autres espèces. Nous avons trouvé que :

- la teneur en acide aristolochique I chez *Aristolochia longa* L. est de 0,1545 mg/g dans les tubercules en période de floraison et de 0,6156 mg/g après maturité des graines. La comparaison de ces résultats avec les travaux de WEI et al [88], de ZHOU et al [32] et de LEE et al [89] nous permet de constater que la teneur en acide aristolochique I chez *Aristolochia longa* L., en période de floraison, est proche de celle de *Aristolochia menshuriensis* (0,14 mg/g selon les résultats de WEI et al [88]). Après maturation des

graines, la teneur en acide aristolochique I dans les tubercules chez *Aristolochia longa* L. est plus élevée que chez *Aristolochia menshuriensis* selon les résultats de WEI et al [88] (0,14 mg/g) et de ZHOU et al [32] (0,2 mg/g). Nous remarquons aussi que la teneur en acide aristolochique I chez *Aristolochia longa* L. est plus élevée que *Caulis clematidi armandii* et *Caulis akebiae* selon les résultats de ZHOU et al [32]. Ces deux espèces ne contiennent pas de l'acide aristolochique I. La teneur en acide aristolochique I de *Aristolochia fangchi* est plus faible que chez *Aristolochia longa* L.. Les résultats de WEI et al [88] montrent que *Aristolochia fangchi* ne contient pas de l'acide aristolochique I, mais les résultats de LEE et al [89] révèlent qu'elle en contient des traces. Les résultats de WEI et al [88] et de ZHOU et al [32] montrent que *Aristolochia debilis* est plus riche en acide aristolochique I que chez *Aristolochia longa* L. La teneur de *Aristolochia debilis* est de 0,93 mg/g selon ZHOU et al [32] ou 0,68 mg/g selon WEI et al [88]. Cette teneur est plus élevée que chez *Aristolochia longa* L. en période de floraison (0,1545 mg/g) et après maturité des graines (0,6156 mg/g).

- la teneur en acide aristolochique II chez *Aristolochia longa* L. est de 0,0042 mg/g et de 0,0084 mg/g respectivement en période de floraison et après maturité des graines. Nous remarquons que la teneur en acide aristolochique II chez *Aristolochia longa* L. est plus faible que chez *Aristolochia menshuriensis* selon les résultats de WEI et al [88] (0,053 mg/g) et ZHOU et al [32] (0,17 mg/g). Nous remarquons aussi que la teneur en acide aristolochique II chez *Aristolochia longa* L. est plus élevée que chez *Caulis clematidi armandii* et *Caulis akebiae* selon les résultats de ZHOU et al [32]. Ces deux espèces ne contiennent pas de l'acide aristolochique II. Elle est aussi plus élevée chez *Aristolochia longa* L. que chez *Aristolochia fangchi* selon le résultat de WEI et al [88] (n'a pas été détecté) et LEE et al [89] (des traces). La teneur en acide aristolochique II chez *Aristolochia debilis* est de 0,35 mg/g selon ZHOU et al [32] ou 0,23 mg/g selon WEI et al [88]. Cette teneur est plus élevée que chez *Aristolochia longa* L. en période de floraison (0,0042 mg/g) et après maturité des graines (0,0084 mg/g).

Nous pouvons donc conclure que *Aristolochia longa* L. est plus toxique que *Aristolochia fangchi*, *Caulis clematidi armandii*, *Caulis akebiae* et *Aristolochia menshuriensis*, mais elle est moins toxique que *Aristolochia debilis*.

La comparaison de nos résultats (0,0155% pour l'acide aristolochique I et 0,0004% pour l'acide aristolochique II en période de floraison, et 0,0652% pour l'acide aristolochique I et 0,0006% pour l'acide aristolochique II après maturité des graines) avec les travaux de HASHIMOTO et al [90] montre que la teneur en acide aristolochique chez *Aristolochia longa* L. est plus faible que chez *Aristolochia debilis*, *Aristolochia menshuriensis* et *Aristolochia fangchi*.

L'étude de quelques espèces du genre *Asarum* par HASHIMOTO et al [90] montre que *Asarum sieboldii*, *Asarum himalaicum*, et *Asarum forbessi* ne contiennent ni l'acide aristolochique I ni l'acide aristolochique II. Néanmoins, *Asarum splendens* et *Asarum himalaicum* contiennent des traces de l'acide aristolochique I. L'acide aristolochique II est absent chez ces espèces. Ce résultat montre que *Aristolochia longa* L. est plus toxique que ces espèces *Asarum*.

Nous comparons maintenant la teneur en acide aristolochique de la concrète alcoolique de *Aristolochia longa* L. avec d'autres espèces. Nous avons trouvé que la concrète alcoolique des tubercules de *Aristolochia longa* L. contient 870,8205 µg/g d'acide aristolochique I et 23,9175 µg/g d'acide aristolochique II pendant la période de floraison. Après maturité des graines, la teneur en acide aristolochique dans les tubercules augmente. En effet, l'acide aristolochique I représente 3 672,1088 µg/g et l'acide aristolochique II représente 32,0639 µg/g dans la concrète alcoolique.

L'étude de JONG et al [91] sur la teneur en acide aristolochique I et en acide aristolochique II de quelques espèces de *Asarum* révèle la présence de l'acide aristolochique I chez ces espèces. Néanmoins leurs travaux ont montré l'absence totale de l'acide aristolochique II chez les espèces de *Asarum* étudiées. Nos travaux montrent que *Aristolochia longa* L. contient les deux acides aristolochiques I et II.

La comparaison de la teneur en acide aristolochique I de la concrète alcoolique de ces espèces avec celle de *Aristolochia longa* L. montre que :

- pendant la période de floraison, la concrète alcoolique des feuilles (331,0411 µg/g) et des tubercules (870,8205 µg/g) est plus riche en acide aristolochique I que la concrète alcoolique de *Asarum heteropoides*, *Asarum forbesii*, *Asarum himalacium*, *Asarum seiboldii*, *Asarum debile*, *Asarum maximum*, *Asarum ichangense* et *Asarum fukense*.
- Après maturation des graines, la teneur en acide aristolochique I de la concrète alcoolique des tubercules de *Aristolochia longa* L. (3 672,1088 µg/g) est plus élevée que dans la concrète alcoolique de toutes les espèces de *Asarum* étudiées par JONG et al [89]. Cette teneur est particulièrement plus élevée que chez *Asarum crispulatum* (3 376,9 µg/g).

La comparaison de la teneur en acide aristolochique I et en acide aristolochique II de la concrète alcoolique des tubercules et des feuilles de *Aristolochia longa* L. avec les résultats de YUAN et al [23] et YUAN et al [24] montre que :

- Les tubercules de *Stephania tertanda* et *Soussurea lappa*, ainsi que les tiges de *Clematis armandii* ne contiennent ni l'acide aristolochique I ni l'acide aristolochique II [24]. En comparaison, *Aristolochia longa* L. contient ces deux acides aristolochiques aussi bien dans les feuilles que dans les tubercules.
- En période de floraison, la teneur en acide aristolochique I et en acide aristolochique II de la concrète alcoolique des tubercules est plus faible que celle de *Aristolochia menshuriensis*, *Aristolochia fangchi* et *Aristolochia debilis*. Pendant cette période la teneur en acide aristolochique I et en acide aristolochique II de la concrète alcoolique des feuilles de *Aristolochia longa* L. est plus élevée que dans la partie aérienne de *Aristolochia debilis*, *Aristolochia mollissima* et *Asarum heteropoides*. Donc les feuilles de *Aristolochia longa* L. sont plus riches en acide aristolochique en comparaison avec ces espèces.



- Après maturité des graines, nous remarquons que la teneur en acide aristolochique I de la concrète alcoolique des tubercules de *Aristolochia longa* L. est plus élevée que chez toutes les aristoloches étudiées par YUAN et al [23] et YUAN et al [24]. Nous remarquons aussi que la concrète des tubercules de *Aristolochia longa* L. est moins riche en acide aristolochique II que *Aristolochia menshuriensis*, *Aristolochia fangchi* et *Aristolochia debilis*.

L'acide aristolochique est présent dans environ 65 types de plantes dont la plupart d'entre elles sont utilisées comme plantes médicinales. L'acide aristolochique est parmi les cancérogènes potentiels, d'origine végétale, pour l'homme et les animaux [92]. Nous le trouvons particulièrement dans de nombreuses espèces du genre *Aristolochia* et *Asarum*. Ce métabolite est qualifié comme composé toxique [61]. L'acide aristolochique est cancérogène, néphrotoxique [23], [91], [96], [31], [92], [93], [94], [95], [96], [97], [98] pour l'homme [95], [99], [92] et les animaux [92], [89], [95]. Il est aussi génotoxique pour l'homme et les rongeurs [94], [100], [95] et mutagène *in vivo* [90], [100], [6], [97], [23], [93]. Cette propriété a été démontrée chez *Salmonella typhimurium* [101], [6] et par des cellules des mammifères [6], [93]. Le pouvoir mutagène, de plusieurs métabolites, de l'acide aristolochique, principalement les acides aristolochiques I et II, a été déterminé expérimentalement [19].

Si nous savons que les acides aristolochiques sont les principaux composés bioactifs des plantes *Aristolochia*, nous savons aussi, d'après la bibliographie, qu'ils sont classés parmi les 2% de composés cancérogènes puissants [30], [94] dans la banque du pouvoir cancérogène et génotoxique (cancerogenic potency and genotoxicity database) [30]. Par conséquent, l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a classé les plantes médicinales, contenant les espèces *Aristolochia*, comme cancérogènes pour l'homme [41], [98].

L'acide aristolochique est suspecté d'être responsable de plus de 200 cas de néphrotoxicité sévère ou CHN dans le monde [95]. L'acide aristolochique est associé au développement d'une insuffisance rénale sévère et du carcinome urothélial chez

l'homme [30], [19], [95] et la tumeur de rein et de prè-estomac chez le rat et la souris [30], [45]. Donc il est toxique et peut causer le cancer [96], [6].

En outre, l'acide aristolochique est un puissant néphrotoxique et cancérrogène avec une période de latence extrêmement courte non seulement pour les animaux mais aussi pour l'homme [95], [100]. Cette période est de 15 jours à deux mois [102].

Donc la présence de l'acide aristolochique est un autre risque de toxicité par *Aristolochia longa* L. qui s'ajoute au risque des ions nitrites.

Notre étude sur la teneur en acide aristolochique de *Aristolochia longa* L. révèle que cette espèce est riche en acide aristolochique dans les feuilles et les tubercules. Cette toxicité est due à la présence des substances phénantréniques nitrés néphrotoxiques (les acides aristolochiques). Nous avons pu révéler deux types d'acide aristolochique, l'acide aristolochique I et II, qui sont considérés comme des composés toxiques majeurs [88].

La toxicité de *Aristolochia longa* L. n'a pas de relation avec la dose ou la durée d'administration. Ainsi, malgré les quantités relativement faibles de l'acide aristolochique une toxicité cumulative pourrait apparaître après une utilisation prolongée ou intermittente de plantes médicinales contenant de l'acide aristolochique [94]. Dans ce contexte, VANHERWEGHEM [97] révèle que la dose cumulée était un facteur de risque significatif pour le développement d'un carcinome urothélial au niveau des voies urinaires chez l'homme.

Les adduits d'ADN formés par les acides aristolochiques I et II persistent longtemps dans les tissus cibles. Ils restent dans les tissus de plusieurs mois jusqu'à plusieurs années après arrêt d'ingestion de l'acide aristolochique [103]. Cela est confirmé par MEI et al [6], qui ont observé des adduits de l'acide aristolochique dans plusieurs organes des rats après une seule administration. Ainsi COSYNS et al [104] ont révélé la présence des adduits d'ADN dans les reins des patients CHN 9 à 44 mois après arrêt d'ingestion de l'acide aristolochique. Selon les résultats de VANHERWEGHEM [97] cette période peut aller jusqu'à six ans.

Parmi les acides aristolochiques identifiés dans la plante *Aristolochia longa* L., nous avons trouvé que l'acide aristolochique I est le type de l'acide aristolochique majoritaire dans les feuilles et dans les tubercules en période de floraison. Nous avons trouvé que la teneur en acide aristolochique I des tubercules augmente après maturité des graines. Pendant cette période, il représente 93,3956% de l'acide aristolochique purifié.

Il a été trouvé que l'acide aristolochique I est plus toxique que l'acide aristolochique II et d'autres analogues structuraux [6], [19]. Ces derniers peuvent être toxiques ou non [6], [19]. Les deux adduits d'acide aristolochique I, dA-AAI et dG-AAI, diminuent rapidement pendant les deux premières semaines après arrêt de contact avec l'acide aristolochique. Ensuite les dG-AAI continuent de disparaître alors que les dA-AAI restent pratiquement inchangés entre quatre à trente-six semaines [6]. Les adduits de l'acide aristolochique I persistants (dA-AAI) sont associés avec des mutations dans des gènes biologiquement importants. Ces derniers sont impliqués dans la cancérogenèse comme le proto-oncogène *H-ras* et le gène suppresseur de tumeur *p53* [105].

Les adduits d'ADN formés par les acides aristolochiques ont un effet pré-mutagénique. Dans les tumeurs induites expérimentalement chez le rat et chez la souris par les acides aristolochiques, une mutation du codon 61 du proto-oncogène *Ha-ras* a été démontrée [97].

Les mutations, dans le proto-oncogène, les gènes suppresseurs et les gènes dont la fonction est de maintenir la stabilité génomique, provoquées par l'acide aristolochique sont soupçonnées d'être impliquées dans la conversion des cellules somatiques normales en cellules cancéreuses [6].

Les études sur les activités biologiques des acides aristolochiques, aussi bien sur les animaux que sur des hommes souffrant d'intoxications par les acides aristolochiques, révèlent que ce sont des substances toxiques majeures. Les effets mutagènes, cancérogènes et génotoxiques ont été prouvés, alors qu'il y a des

différences dans la réponse à la toxicité envers l'acide aristolochique. Ces différentes réponses sont dues:

- aux différences individuelles dans les activités des enzymes catalysant la biotransformation de l'acide aristolochique [6],
- à quelques gènes d'enzymes du métabolisme de l'acide aristolochique, qui présentent des polymorphismes [6], [94],
- aux facteurs de l'environnement [6].

Ces variations apparaissent comme des déterminant important du risque de cancer [6].

La combinaison de la thérapie stéroïdienne peut conduire à des effets positifs pour éviter la néphrotoxicité de l'acide aristolochique [105]. Une étude expérimentale sur des rats révèle que le blocage du récepteur de l'angiotensine II présente un effet protecteur contre la fibrose interstitielle rénale provoquée par les plantes contenant de l'acide aristolochique [94].

L'identification de complications particulièrement graves (urémies terminales, cancers des voies urinaires) suite à des traitements par des plantes médicinales soulève de sérieux problèmes en terme de santé publique. Ils n'en reste pas moins que les autorités sanitaires devraient exiger que les remèdes dits «naturels » soient soumis aux mêmes contrôles de qualité, de toxicité et de conformité que les autres médicaments [97]. La composition exacte des plantes médicinales doit être donnée même pour les suppléments alimentaires pour protéger le consommateur et faciliter le traitement médical quand il est nécessaire [106].

Sur le plan de la physiologie et de la biologie, les acides aristolochiques ouvrent des voies nouvelles d'exploration expérimentale de la fibrogenèse et de la tumorigenèse dont l'intérêt pour la pathologie humaine est maintenant évident [97].

La recherche est toujours ouverte pour trouver des solutions aux problèmes posés par la consommation de l'acide aristolochique, en particulier des plantes qui en contiennent, pour bénéficier au mieux de son effet antimitotique.

Selon KUMAR et al [28], l'acide aristolochique I est actif sur *Ecoli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermides*. Nos résultats concernant le pouvoir antibactérien de cet acide ne confirment pas ceux de KUMAR et al [28]. Cela peut être dû à la dose, qu'il faut l'augmenter, ou bien à la sensibilité des bactéries testées. Nous avons utilisé des bactéries de références qui sont multirésistantes.

## CONCLUSION

Les métabolites actifs sont différents selon les espèces. Dans la même espèce, ces composés sont influencés par le sol, le climat et le stade de croissance de la plante. Les analyses quantitatives et qualitatives des constituants des plantes médicinales par des méthodes rapides et de grande efficacité sont encore l'objectif des recherches.

Les acides aristolochiques sont les principaux métabolites bioactifs des espèces du genre *Aristolochia*. La néphrotoxicité causée par les acides aristolochiques attire l'attention du monde entier.

*Aristolochia longa* L. est, une plante médicinale du genre *Aristolochia*, connue particulièrement par son effet anticancer. Cette propriété donne à cette espèce une utilisation vaste, par les cancéreux en particulier.

Dans le but d'estimer la toxicité de cette espèce, nous avons réalisée, en plus de l'essai botanique, un essai physicochimique. Cet essai vise principalement à déterminer la teneur en acide aristolochique chez *Aristolochia longa* L.. Nous avons cherché spécifiquement l'acide aristolochique I et l'acide aristolochique II, qui sont les plus toxiques des acides aristolochiques et dérivés. Tous nos résultats montrent que *Aristolochia longa* L. est une plante toxique. Cette toxicité est due :

- à la présence des ions nitrites dans la fraction minérale des tubercules. Nous avons trouvé que les cendres représentent 02,1333 %  $\pm$  00,0057 de la matière sèche des tubercules. L'analyse des minéraux des cendres, par chromatographie ionique et par spectrométrie d'absorption atomique, révèle la présence des ions sodium, magnésium, calcium, potassium, cuivre, fer,

phosphate, fluorure et nitrite. Le plomb et le cadmium sont absents dans la matière minérale de *Aristolochia longa* L.. La présence des ions nitrites est un facteur de risque de cancérogenèse. En présence de substances cancérogènes, tel les acides aristolochiques, les ions nitrites complexés au sodium, se comportent comme promoteur de cancérogenèse.

- à la présence de l'acide aristolochique. Nous avons trouvé que la teneur en acide aristolochique chez *Aristolochia longa* L. est importante. Ce métabolite représente 0.0099% de la matière sèche des feuilles en période de floraison. La teneur en acide aristolochique des tubercules est plus élevée que dans les feuilles. Dans les tubercules, l'acide aristolochique représente 0,025% et 0,0698% du poids sec respectivement en période de floraison et après maturité des graines. De ce résultat nous pouvons dire que *Aristolochia longa* L. est une espèce toxique.

L'analyse quantitative détermine les teneurs et permet de considérer la toxicité. Cette analyse est importante, non seulement pour prévenir de nouvelles intoxications, mais aussi pour chercher les substituants dans lesquels l'acide aristolochique existe à des niveaux très bas.

A cause de la grande toxicité de l'acide aristolochique, le développement d'une méthode sélective et sensible pour la détection de l'acide aristolochique I dans des mélanges complexes est plus important que sa quantification. La présence de l'acide aristolochique I et de ses dérivés est, en effet, inacceptable dans les préparations des plantes médicinales. La présence des traces de ces composés est un risque potentiel de santé publique.

Dans ce contexte, nous avons développé une méthode très simple pour la détection des traces de l'acide aristolochique I dans les préparations complexes de *Aristolochia longa* L. (extrait alcoolique). La composition simple de la phase mobile (méthanol – eau), la reproductibilité de la technique (HPLC) ainsi que sa sensibilité favorise son utilisation dans la recherche de l'acide aristolochique I dans les plantes susceptibles d'en contenir.

L'analyse par chromatographie liquide à haute performance des extraits alcooliques et des acides aristolochiques purifiés, des feuilles et des tubercules, nous a permis d'identifier les acides aristolochiques I et II. Nos résultats montrent que:

- Les feuilles ne contiennent que les acides aristolochiques I et II. La teneur en acide aristolochique I dans les feuilles est légèrement plus élevée que celle de l'acide aristolochique II.
- Les tubercules contiennent en plus des acides aristolochiques I et II deux autres types d'acide aristolochique. Nous avons trouvés que les tubercules contiennent trois types d'acide aristolochique en période de floraison. Après maturité des graines, ils en contiennent quatre types. Nos résultats montrent que l'acide aristolochique I est le type d'acide aristolochique majoritaire dans les tubercules pendant les deux périodes (en période de floraison et après maturation des graines).

Ainsi, en Algérie il faudrait informer les consommateurs, les cancéreux en particulier, pour arrêter immédiatement l'utilisation de *Aristolochia longa* L. jusqu'à ce que les recherches scientifiques trouvent un moyen pour éviter l'effet mutagène, cancérigène et génotoxique de l'acide aristolochique.



## REFERENCES

1. Meyer.S, Reeb. C, Bosdeveix. R, «Botanique: Biologie et physiologie végétale», Maloine, France, 2004, pp.14-15.
2. Paris. R et Moyses. H, «Matière médicale», deuxième tome, deuxième édition, Masson, France, 1976, p 420.
3. Oomah. B. D, «L'isolation, la caractérisation et l'évaluation des métabolites secondaires dérivés de plantes pour utilisation dans le domaine de la santé humaine», Bulletin n°1, Canada, 2003.
4. Doré. J. C, «Nouveaux antitumoraux de synthèse au départ de l'acide aristolochique. Mise en évidence d'un groupement actif dans leur molécule et proposition d'un mécanisme probable de leur mode d'action chimique au niveau cellulaire», Université de Paris, Paris, 1974, p 01.
5. Fluck. H, «Herbes médicinales», troisième édition, Delachaux et Niestlé, Paris, 1977, pp7-11.
6. Mei .N, Arlt. M. V, Phillips. D. H, Heflich.R. H, Chen. T, «DNA adduct formation and mutation induction by aristolochic acid in rat kidney and liver», Mutation Research, n° 602, USA, 2006, pp 83-91.
7. Cherif. H, Zahouine. R, Saidi.F, «Etude ethnobotanique d'une plante médicinale: *Aristolchia longa* L.», Laboratoire de Biologie Végétale, Département de Biologie, Université SAAD DAHLAB, Troisième journée scientifique nationale sur l'environnement et le développement durable, Université de Batna, juin 2007.

8. Bianchini .F et Corbetta. F, «Atlas des plantes médicinales», Fernand narthan, Paris, 1975, pp72, 196-197.
9. Mulder. C, «*Aristolochiaceae*», Review of Palaeobotany and Palynology, n°123, Netherlands, 2003, pp47-55.
10. Judd. G et Kellogg. S, «Botanique, anatomie, cycle évolutif systématique », première édition, De Boech, Paris, 2002, pp172-174.
11. Audouin. F, «Dictionnaire classique d'histoire naturelle», troisième tome, Boudouin, Paris, 1822, pp 568 - 569.
12. Jussieu, «Famille des *Aristolochiaceae*», <http://www.plantes-botanique.be/index.php?f=aristolochiaceae&pdf=1>
13. Bianchini. F, Carrara. A. P, «Le guide vert des fleurs», Solar, Paris, 1986, p 115.
14. Quezel. P, Santa.S, «Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales», premier tome, centre national de la recherche scientifique, Paris, 1962, p 283.
15. Maire. R, «Encyclopédie biologique : flore de l'Afrique du Nord», troisième volume, Lechevalier, Paris, 1962, pp 216 - 219.
16. Rulick. B, Wanke. S, Nuss. M, Neinhwis. C, «Pollination of *Aristolochia pallida* Willd (*Aristolochiaceae*) in the Mediterranean», Flora, n°203, Germany, 2007, pp175-184.
17. Trujillo. C.G, Sersic. A. N, «Floral biology of *Aristolochia argentina* (*Aristolochiaceae*) », Flora, n°201, Argentina, 2006, pp 374 - 382.
18. Wu. T. S, Damou.A. G, Su. S.R, Kuo. P.C, «Terpenoids of *Aristolochia* and their biological activities», Journal of the royal society of chemistry, Taiwan, 2004, pp 594 - 624.

19. Ioset. J. R, Raelison. G.E, Hostettmann. K, «Detection of Aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens», *Food and Chemical Toxicology*, n° 41, Switzerland, 2003, pp 29–36.

20. Shi. L.S, Kuo .P.C, Tsai .Y.L, Damu. A. G, Wu. T.S, « The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans*», *Bioorganic and Medicinal*, n°12, Taiwan, 2004, pp 439 - 449.

21. Paris .R .R, Moysse. H, «Matière médicale», deuxième tome, deuxième édition, Masson, Paris, 1981, p116.

22. Villars. D, «Catalogue méthodique des plantes», F. C. Levrault, Stasbourg, 1807, p 100.

23. Yuan.J, Liu. Q, Zhu. W, Ding .L, Tang . F, Yao .S, « Simultaneous analysis of six aristolochic acids and five aristolactams in herbal plants and their preparations by high-performance liquid chromatography-diode array detection-fluorescence detection», *Journal of Chromatography A*, China, 2007, pp 1 - 30.

24. Yuan. J, Nie.L , Zeng. D , Luo. X , Tang. F , Ding. L ,Liu. Qi , Guo. M , Yao. S, «Simultaneous determination of nine aristolochic acids analogues in medicinal plants and preparations by high-performance liquid chromatography», *Talanta*, n°73, China, 2007, pp 644 - 650.

25. Bezanger. L, Pinkars. M, Torek. M, Trotin. F, «Plantes médicinales des régions tempérées», Maloine .S.A, Paris, 1980, p 83.

26. Nations Unies, «Liste récapitulative des produits dont la consommation ou la vente ont été interdites ou rigoureusement réglementées, qui ont été retirés du marché ou n'ont pas été approuvés par les gouvernements», deuxième édition, 2006, p 04.

27. Nations Unies, «Liste récapitulative des produits dont la consommation ou la vente ont été interdites ou rigoureusement réglementées, qui ont été retirés du marché ou n'ont pas été approuvés par les gouvernements», huitième édition, 2006, p25.
28. Kumar V, Poonam, Ashok. K, Prasad, Virinder.S, Parmar, «Naturally occurring aristolactams, aristolochic acids and dioxoaporphines and their biological activities», Journal of Royal Society of Chemistry, n°20, India, 2003, pp 565 - 583.
29. Sarembaud. A, «Médicaments à usage homéopathique», Masson, Paris, 1999, p 25.
30. Chen. S. M, Fan. M. Y, Tseng. C. C, Ho. Y, Hsu. K. Y, «Pharmacokinetic and nephrotoxicity of aristolochic acid», Taxicon, n°50, Taiwan, 2007, pp180-188.
31. Zhang. H, Cifon. M A, Murli. H, Erexon. G .L, Mecchi. M.S, Lawlor. T .E, «Application of simplified *in vitro* screening tests to detect genotoxicity of aristolochic acid», Food and chemical Toxicology, n°42, Vienna, 2004, pp2021-2028.
32. Zhou. X, Zheng. C, Sun. J, You. T, «Analysis of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acids in *Aristolochia* plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection at a carbon fiber microdisk electrode», Journal of Chromatography A, n°1109, China, 2006, pp 152 -159.
33. Bruneton.J, «Plantes toxiques : végétaux dangereux pour l'homme et les animaux», deuxième édition, TEC et DOC, Paris, 2001, pp 23 - 24.
34. Guignard. J. L, «Biochimie végétale», deuxième édition, Duod, Paris, 2000.
35. Bruneton. J, «Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales», deuxième édition, TEC et DOC, Paris, 1993, p915.
36. Verdrager. J, «Ces médicaments qui nous viennent des plantes», Maloine, Paris, 1978.

37. Francisco. C. S, Messiano. G. B, Lopes. L. M. X, Tininis.A G, Oliveira.J .E, Capellari. L, «Classification of *Aristolochia* species based on CG-MS and chemometric analyses of essential oils», *Phytochemistry*, n°69, Brazil, 2008, pp 168-175.
38. Paris. M, Hurabille. M, «Agrégé de matière médicale: pharmacognosie», premier tome, Masson, Paris, 1980, p 339.
39. Grandclaudon. P, «Implication des anions dans la synthèse des aristolactames», Laboratoire de chimie organique et physique, France, 2002, pp 1-3.
40. Chaumeton. F .P, Turpin. P. J, «Flore médicale», premier tome, C.L.F. Panckoucke, Paris, 1814, pp 115 - 116.
41. Beniston. A, «Fleurs d'Algérie», NT. WS, Alger, 1984, p 183.
42. Archil. R, «Elément d'histoire naturelle médicale», Bechet, Paris, 1831, pp 63, 436 - 439.
43. [www.botanical.com/botanical/mgmh/b/birthw44-1.jpg](http://www.botanical.com/botanical/mgmh/b/birthw44-1.jpg)
44. Desfontaine.M, «Choix des plantes du corollaire des instituts», Levrault, Paris, 1808, pp14-15.
45. Buchoz. M .P.J, «Dictionnaire universel des plantes de la France», premier tome, Lacombe, Paris, 1770, p p89 - 90.
46. Teilens. A, «Flore médicale Belge», E. Jung-Trullel, Paris, 1862, p 12.
47. Spach.M.E, «Histoire naturelle des végétaux phanérogames», premier tome, Roret, Paris, 1841, p 263.
48. Bammi. J, Bouira.A, «Contribution à la connaissance de la flore vasculaire de la forêt de l'Achach, plateau central Maroc», *Acta Botanica Malacatana*, Malaga, 2004, p 29 - 41.

49. De Pascual T.T, Julio. G. U, Alvaro. F, Vaquero.M. D. A, «Lipid components of *Aristolochia longa*», *Phytochemistry*, Volume 23, n°2, Spain, 1983, pp 461 - 462.
50. De Pascual T.T, Julio. G. U, Alvaro. F, «Monoterpene derivatives from the essential oil of *Aristolochia longa*», *Phytochemistry*, Volume 22, n°12, Spain, 1983, pp 2753 - 2754.
51. De Pascual T.T, Julio. G. U, Alvaro. F, «An aristolochic acid derivative from *Aristolochia longa*», *Phytochemistry*, Volume 22, n°12, Spain, 1983, pp 2745 - 2747.
52. Corpet. E. F, «Poésie de princien», C. L. F. Panckoucke, Paris, 1845, p 203.
53. Cuvier.F, «Dictionnaire des sciences naturelles», troisième tome, F. G. Levrault, 1816, p113.
54. Gadhi. C. A, Weber. M, Mory. F, Benharref. C, Lion. C, Jana. M, Lozniewski. A, «Antibacterial activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel», *Journal of Ethnopharmacology*, n°67, Morocco, 1999, pp 87 - 92.
55. Gadhi. C. A, Hatier.R, Mory. F, Marchal. L, Weber. M, Benharref. C, Jana. M, Lozniewski. A, «Bacterial activity of the chloroform fraction from rhizomes of *Aristolochia paucinervis* Pomel», *Journal of Ethnopharmacology*, n°75, Morocco, 2001, pp 207 - 212.
56. Gadhi. C. A, Benharref. C, Jana. M, Lozniewski. A, «Anti-*helicobacter pylori* activity of *Aristolochia paucinervis* Pomel», *Journal of Ethnopharmacology*, n°75, Morocco, 2001, pp203-205.
57. Bulletin d'information de pharmacovigilance, volume 3, n°5, Société Marocaine de Pharmacovigilance, 2006.
58. Boullard. B, «Plantes médicinales du monde», Estem, Paris, 2001, p 55.
59. «Démarche d'évaluation de la sécurité, de l'intérêt et de l'allégation des denrées alimentaires contenant des plantes destinées à la consommation humaine», Agence Française de sécurité sanitaire des aliments, février 2007.

60. Delepine . L, 2001, <http://webiologie.free.fr/index.html>
61. Kamoun. P, «Appareil et méthode en biochimie et biologie moléculaire», Flammarion, Paris, 1997.
62. Soussain. R, «Analyse physico-chimique des plantes médicinales : recherche des acides aristolochiques, substances toxiques», deuxième journée de l'afssaps, Direction des laboratoires et des contrôles.
63. Caude. M, Jardy. A, «Chromatographie en phase liquide», in, technique d'ingénieur, 2007, PE 1455, pp1-47.
64. «Méthodes instrumentales d'analyse et de caractérisation: chromatographie ionique», école des mines de Saint-Étienne, [www.emse.fr/spin/formation/ressources/sam96/fichierspdf/chromion.pdf](http://www.emse.fr/spin/formation/ressources/sam96/fichierspdf/chromion.pdf).
65. [www.unige.ch/cabe/wojciechowski/TP\\_CI\\_06\\_07.PDF](http://www.unige.ch/cabe/wojciechowski/TP_CI_06_07.PDF), p1
66. Di denedetto. D, Breuil. P, «Spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible», in, technique d'ingénieur, 2007, P 2795 v2, pp1-20.
67. Lafont .R, «Méthodes physiques de séparation et d'analyse et méthodes de dosage des biomolécules», 2005, <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/index.html>
68. Browning. R.D, «Méthodes spectroscopiques», Masson et Cie, Paris, 1974, p191.
69. Vandegans. J, De Kersabien . A. M, Hoening. M, «Spectrométrie d'absorption atomique», in, technique d'ingénieur, 2007, PE 2 825, pp1-29.
70. Kamoun. P, «Appareil et méthode en biochimie», deuxième édition, Flammarion, Paris, 1977, pp85-182.
71. Zerrad. W, Hillali. S, Mataoui, El antris. B. S, Et hmeyen. A, «Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux

variétés de blé dur», Laboratoire de Biochimie, d'environnement et d'Agroalimentaire, Maroc, 2006, p 1.

72. Martin. P. P, Gagnard. J, Gautier. P, Drouineau. G, «L'analyse végétale de l'alimentation des plantes tempérées et tropicales », Lavoisier, Paris, 1984.

73. Pinta. M, «Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux », Oléagineux, n°2, France 1973, p1.

74. Pinta. M, «Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux », Comité inter- instituts d'étude et techniques analytiques du diagnostic foliaire, Sevilla, 1968, pp 12 - 13.

75. Marchal. R, Umber. J, «Chromatographie», [www. Ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Chromato01/chromato1.htm](http://www.Ac-nancy-metz.fr/enseign/physique/CHIM/Chromato01/chromato1.htm)

76. «Teneur des nutriments et valeur énergétique des denrées», 1999, <http://www.epsic.ch/Branches/Chimie/denrees/27valnu.pdf>

77. Foungeb. S, Tillequin. F, Paris. M, Jacquemin. H, Paris. R. R, «Sur une Hypericaceae de Madagascar l'*Elialea articulata* Cambess», Plantes médicinales et Phytothérapie, troisième tome, n°3, Paris, 1969, pp 197 - 198.

78. William. B. J, «The original of the soxhlet extractor », Journal of Chemical Education, Volume 84, n°12, Canada, 2007, pp1913.

79. Meuwly. D, «Séparation des alcaloïdes de l'opium par chromatographie sur couche mince», Collection Woodner, New York, 1992, p 18.

80. Carreras. L. M, «Bases cuaternarias y nitrofenantrenos en *Aristolochia baetica* L.», Anales del instituto botanico, n°30, Cavanilles, 1973, pp 253 – 265.

81. Cherif. H. S, Saidi. F, Zahouine. A, Rouibi. A, «Identification et quantification du principe actif d'une plante médicinale: *Aristolochia longa* L. et perspective de valorisation», Laboratoire de Biologie Végétale, premier séminaire international sur les biotechnologie animales et végétales, université de Blida -Algérie, novembre 2007.



82. Calzoni. G. L, «Atlas de la structure des plantes: Guide de l'anatomie microscopique des plantes vasculaires en 285 photos», AnnasPeranza, Paris, 2006, pp 157.

83. Jonatham. H. V, «Est-il pertinent d'ajouter des nitrites dans les aliments», Institut de Technologie Agroalimentaire, Campus de St- Hyacithe, 2007, p 127.

84. Bernard. N, Brondeau. M. T, Jargot. D, Lafon. D, Miraval. S, Portois. J. C, Schneider. O, «Nitrite de Sodium», Services Techniques et Médicaux de l'INRS, Fiche technique n°169, 2001, pp 109 - 112.

85. Kupferschmids. H, «Nitrite (Nitrite d'amyle, nitrite de sodium)», Centre suisse d'information Toxicologique, 2006, p 04.

86. Fournier A, Ruel. D, «Les plantes toxiques, un danger potentiel pour votre bétail», Direction régional du Centre du Québec, 2002, p 04.

87. Palmeria Junior. S. F, Conserva. L. M, Corrêa. M. S. S, Guilhon. G. M. S. P, «Constituents of *Aristolochia* species (*Aristolochiaceae*)», Biochemical Systematic and Ecology, n°30, Brazil, 2002, pp 701 - 703.

88. Wei. F, Feng. Y. Q, «Rapid determination of aristolochic acid I and II in medicinal plants with high sensitivity by cucurbit [7] uril modifier capillary zone electrophoresis», Talanta, n°74, China, 2008, pp 619 - 624.

89. Lee. T. Y, Wu. M. L, Deng. J F, Huang. D. F, «High-performance liquid chromatography determination for aristolochic acid in medicinal plants and slimming products», Journal of Chromatography B, n°766, Taiwan, 2001, pp169-174.

90. Hashimoto. K, Higuchi. M, Makino. B, Sakakibara. I, Kubo. M, Komatsu. Y, Maruno. M, Okada. M, «Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds contained in some medicinal plants», Journal of Ethnopharmacology, n°64, Japan, 1999, pp 185 - 189.

91. Jong. T. T, Lee. M. R, Hsiao.S. S, Hsai. J. L, Wu. T.H, Chiang. S. T, Cai.S .Q, «Analysis of aristolochic acid in nine sources of Xinin, a traditional Chinese medicine, by liquid chromatography/ atmospheric pressure chemical ionization/ tandem mass spectrometry», Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis, n°33, Taiwan, 2003, pp 831 - 837.
92. Chen. L , Mei . N , Yao. L , Chen. T, «Mutations induced by carcinogenic doses of aristolochic acid in kidney of Big Blue transgenic rats», Toxicology Letters, n°165, USA, 2006, pp 250 - 256.
93. Nortier. J.L, Wanherweghem. J. L, «Renal interstitial and urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*), Toxicology, n°181, Belgium, 2002, pp 577 - 580.
- 94.Poon. W. T, Lai. C. K, Chan. A.Y.W, «Aristolochic Acid Nephropathy: The Hong Kong Perspective», Hong Kong Nephrol, Volume 9, n°1, China, 2007, pp714.
- 95.Cheng. C. L, Chen. K. J, Schi. P. H, Lu. L. Y, Hung. C. F, Lin. W. C, Gu. J. Y, «Chronic renal failure rats are highly sensitive to aristolochic acids, which are nephrotoxic and carcinogenic agents», Cancer letters, n° 232, Taiwan, 2006, pp 236 – 242.
96. Yeh. Y. H, Lee. Y. T, Hseih. H. S, Hwang. D. F, «Short-term toxicity of aristolochic acid, aristolochic acid I and aristolochic acid II in rats», Food and Chemical Toxicology, n°46, Taiwan, 2008, pp 1157 - 1163.
- 97.Vanherweghem. J. L, «Urémie chronique et cancer des voies urinaires secondaires à la prise d'extraits végétaux utilisés en phytothérapie Chinoise», Médecine/Sciences, n°11, Volume 18, Bruxelles (Belgique), 2002, pp 1095 - 1101.
- 98.Arlt. V M, Pofohl-Lezkowicz A, Cosyns. J. P, Schmeiser. H. H, «Analysis of DNA adducts formed by ochratoxin and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy», Mutation Research, n°494, Germany, 2001, pp 143 - 150.

99. Lord. G. M, Cook. T, Arlt. V. M, Schmeizer. H. H, Williams. G, Pusey. C. D, «Urothelial malignant disease and Chinese herbal nephropathy», The Lancet, volume 358, London, 2001, pp 1515 - 1516.
100. Schmeizer. H. H, «Chemical and molecular basis of toxicity of *Aristolochia* and plants containing pyrrolizidine alkaloids», Toxicology, n°240, Germany, 2007, p 147.
101. Nesslany. F, Znouchz. N, Meintières. S, Tlahari.I, Nkili-Mboui. E. N, Maizin. D, «*In vivo* comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenic carcinogens or cytotoxic compounds», Mutation Research, n°630, France, 2007, pp 28 - 41.
102. Karie. S, Launey-Vacher. V, Izzedine. H, Deray. G, «Drug induced nephrotoxicity», Néphrologie et thérapeutique, n°2, France, 2006, pp 370.
103. Chang. H. R, Lian J. D, Lo. C. W, Huang. H. P, Wang. C. J, «Aristolochic acid induced cell cycle G1 arrest in human urothelium SV-HUC-1 cells», Food and Chemical Toxicology, n°45, Taiwan, 2007, pp396-402.
104. Cosyns.J. P, Jadoul. M, Squifflet. J. P, Wese. F. X, De Strihou. C. Y, «Urothelial lesions in Chinese-Herbal Nephropathy», American journal of kidney disease, volume 33, n°6, pp 1011 - 1017.
105. Lo. S. H, Wong. K. S, Arlt. V. M, Philips. D. H, Lai. C. K, Poon, W.T, Chan. C. K, Mo. K. L, Chan. K. W, Chan. A, «Detection of herbal *Aristolochia mollissemiae* in a patient with unexplained nephropathy», American journal of kidney disease, volume 45, n°2, 2005, pp 407 - 410.
106. Gillerot. G, Jadoul. M, Arlt. V. M, De-Strihou. C. Y, Schmeizer. H. H, But. P. P. H, Nieler. C. A, Cosyns. J. P, «Aristolochic acid nephropathy in a Chinese patient: Time to abandon the term "Chinese Herbal Nephropathy"», American journal of kidney disease, volume 38, n°5, 2001, pp 1 - 5.

**APPENDICE A**  
**LISTE DES SYNONYMES ET DES ABREVIATIONS**

CCM: Chromatographie sur couche mince

HPLC: Chromatographie liquide à haute performance

HPLC-MS: Chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse

CL-MS-RMN: Chromatographie liquide couple à la spectrométrie de masse et la spectrométrie de résonance magnétique

M: Mètre

Cm: Centimètre

Rf: facteur de rétention

UV: Ultraviolet

SAA: spectrométrie d'absorption atomique

Å: Angstrom

°C: Degré Celsius

Min: Minute

G: gramme

ml: Millilitre

mM: milli-mole

mg: Milligramme

μl: Microlitre

g: pesanteur

μg: Microgramme

Ac Ar : Acide aristolochique

Ac Ar I : Acide aristolochique I

Ac Ar II : Acide aristolochique II

CHN: Néphrotoxicité chronique provoquée par les plantes

ADN : acide désoxy-ribo-nucléique

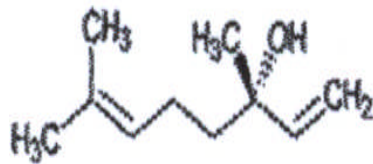
dA-AAI : acide aristolochique I complexé avec le désoxy-adénosine

dA-AAII : acide aristolochique II complexé avec le désoxy-adénosine

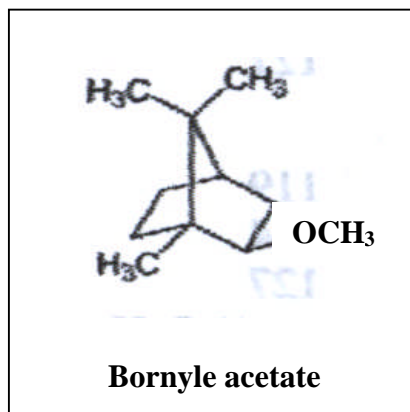
dG-AAI : acide aristolochique I complexé avec le désoxy-guanosine

dG-AAII : acide aristolochique II complexé avec le désoxy-guanosine

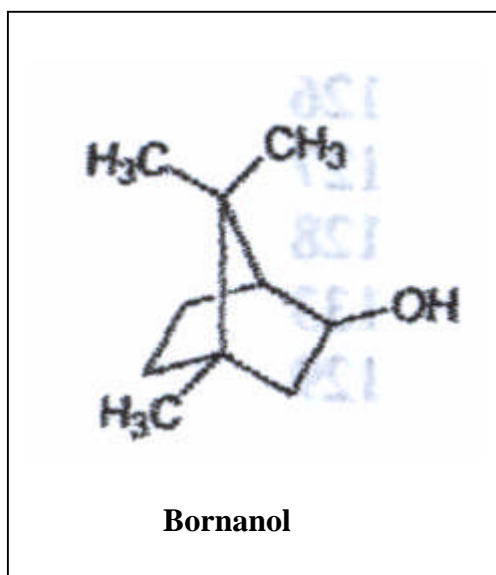
## Appendice B



**linalol**

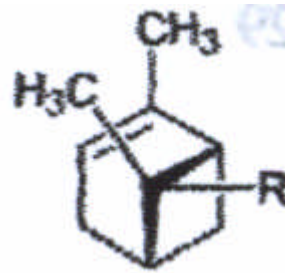


**Bornyle acetate**

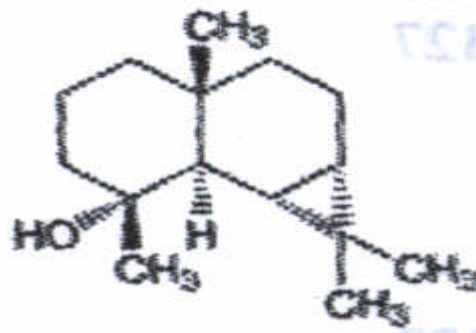


**Bornanol**

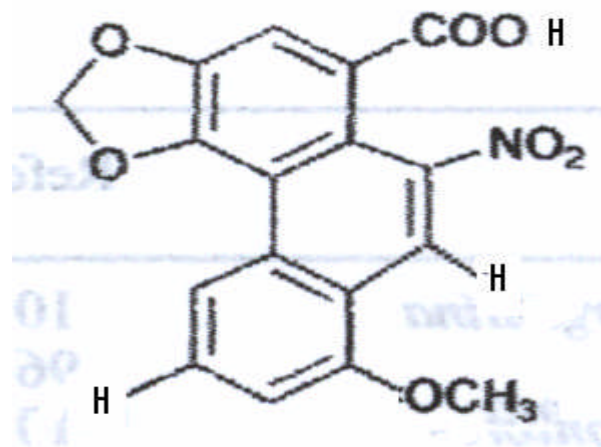
- 36** R= CH<sub>2</sub>OH  
**37** R= CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>



**Pin-2-en-8-ol 36**  
**8-Acetoxy-pin-2-ene 37**



**Madolin F**



**Acide aristolochique I**

## APPENDICE C

Les matériaux utilisés :

- Loupe binoculaire de type Motic ST-30
- Microscope photonique de type Motic BA200
- Capsule en platine
- Four à moufle de marque Muve MF120
- Plaque chauffante
- Dispositif de Kjeldahl
- Soxhlet
- Evaporateur rotatif de marque Quickfit RE100/R
- Spectrophotomètre UV-visible
- Appareil de la chromatographie ionique ICS3000
- Spectrophotomètre d'absorption atomique
- Appareil de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) de type SHIMATZU
- Hotte à flux laminaire
- Etuve

Les réactifs nécessaires sont :

- Eau de Javel à 12°
- Acide acétique
- Vert de méthyle
- Rouge Congo
- Acide chlorhydrique
- Eau déminéralisée
- Acide sulfurique



- Catalyseur du dosage de l'azote total utilisé est composé de : 80gramme d'acétate de potassium, 20gramme d'acétate de cuivre et de 2 gramme de sélénium pur.
- Eau distillée
- Indicateur coloré pour le dosage de l'azote total est formé de : mélange en volume égaux de rouge de méthyle (0,66‰) et de vert de bromocrésol (0,33‰) dans de l'alcool éthylique.
- Ether
- Méthanol
- Butanol
- Une solution de chlorure d'aluminium à 2% dans l'alcool à 95°.
- Une solution aqueuse de chlorure ferrique aqueux à 1%.
- Une solution de potasse alcoolique à 5%.
- Réactif de Dragendorff : ce réactif est composé de deux solutions :
  - Solution A : 2 g de subnitrate de bismuth, 25 ml d'acide acétique glacial et 100ml d'eau distillée.
  - Solution B : 40 g de iodure de potassium et 100ml d'eau.

Le réactif est préparé en mélangeant 10 ml des solutions A et B à 20ml d'acide acétique glacial et 100ml d'eau distillée.

- Standard de l'acide aristolochique : ampoule SIGMA A-5512 lot 035k0868, contenant 25mg de poudre jaune de l'acide aristolochique. Il est formé de mélange de l'acide aristolochique I 29% et de l'acide aristolochique II 69%.

Nous avons utilisés aussi la petite verrerie ordinaire du laboratoire tel :

- ampoules à décanter
- béchers de 100ml et 500ml
- pipettes graduées de 5ml et 10ml
- papier filtre
- entonnoirs en verre
- fioles (100ml et 500ml), fiole conique de 500ml et des erlenmyers (50ml, 100ml et 300ml)
- tubes à essai
- ballon
- boîte de Pétri
- disque en papier filtre

## APPENDICE D

Teneur en eau des tubercules et des feuilles de *Aristolochia longa* L.

	Tubercules			Feuilles		
	PI	PS	%	PI	PS	%
1 <sup>er</sup> essai	150,2421	44,4825	70,3928	20,3641	06,1815	69,6451
2 <sup>ème</sup> essai	69,2126	20,4981	70,3839	35,1261	10,6625	69,6451
3 <sup>ème</sup> essai	26,0652	07,7184	70,3881	37,3403	11,3345	69,6454
4 <sup>ème</sup> essai	29,6633	08,7835	70,3893	15,3095	04,6469	69,6469
5 <sup>ème</sup> essai	80,2160	23,2626	71,0000	32,2603	09,7923	69,6460
Moyenne	71,0798	20,9490	70,5182	28,0800	08,5235	69,6457
Ecart-type	44,9339	13,2848	0,2446	08,6660	02,6306	00,0007

**PI:** Poids initial; **PS:** Poids sec.

### Teneur en cendres des tubercules

	PI	PC	%
1 <sup>er</sup> essai	01,0489	00,0224	02,1356
2 <sup>ème</sup> essai	01,0004	00,0214	02,1391
3 <sup>ème</sup> essai	01,0022	00,0214	02,1353
Moyenne	01,0172	00,0217	02,1333
Ecart-type	00,0225	00,0005	00,0057

**PI:** Poids initial; **PC:** Poids des cendres.

### Teneur en azote total et en protéines dans les tubercules

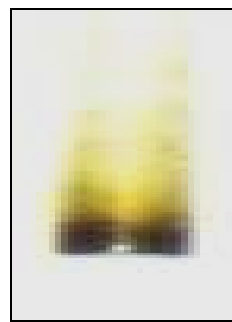
	PP (en mg)	Volume de titration (en ml)	% de l'azote total	% de protéines
1 <sup>er</sup> essai	200,1	11,00	05,2378	32,7363
2 <sup>ème</sup> essai	200,0	10,90	05,450	34,0625
3 <sup>ème</sup> essai	200,3	11,00	04,9993	31,2456
Moyenne	200,1333	10,9667	05,2290	32,6815
Ecat-type	00,1104	00,0471	00,1841	01,1506

**PP :** Pesée (en milligramme) de la poudre des tubercules.

### Teneur en matière apolaire des tubercules et des feuilles

	Tubercules			Feuilles		
	PP (en g)	PMAP (en g)	%	PP (en g)	PMAP (en g)	%
	10,0083	00,1217	01,2160	10,0001	00,1307	01,1070
	10,0008	00,1209	01,2089	10,0000	00,1309	01,3090
	10,0012	00,1210	01,2098	10,0004	00,1299	01,2989
Moyenne	10,0034	00,1212	01,2116	10,0002	00,1305	01,3050
Ecart-type	00,0034	00,0004	00,0031	00,0002	00,0004	00,0044

**PP** : Pesée de la poudre en gramme, **PMAP** : Pesée de la matière apolaire en gramme.



Concrète des tubercules

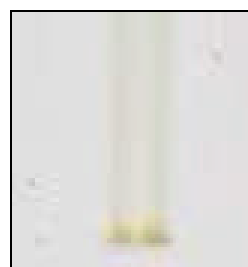
Concrète des feuilles

Concrète apolaire des tubercules et des feuilles

## Teneur en matière polaire des tubercules et des feuilles

	Tubercules			Feuilles		
	PP (en g)	PMP (en g)	%	PP (en g)	PMP (en g)	%
1 <sup>er</sup> essai	10,0083	01,7759	17,7443	10,0001	00,8635	08,6349
2 <sup>ème</sup> essai	10,0008	01,7745	17,7436	10,0000	00,8634	08,6340
3 <sup>ème</sup> essai	10,0012	01,7747	17,7449	10,0004	00,8645	08,6447
Moyenne	10,0034	01,7750	17,7443	10,0002	00,8638	08,6379
Ecart-type	00,0034	00,0006	00,0005	00,0002	00,0005	00,0048

**PP** : Pesée (en gramme) de la poudre, **PMP** : Pesée (en gramme) de la matière polaire.



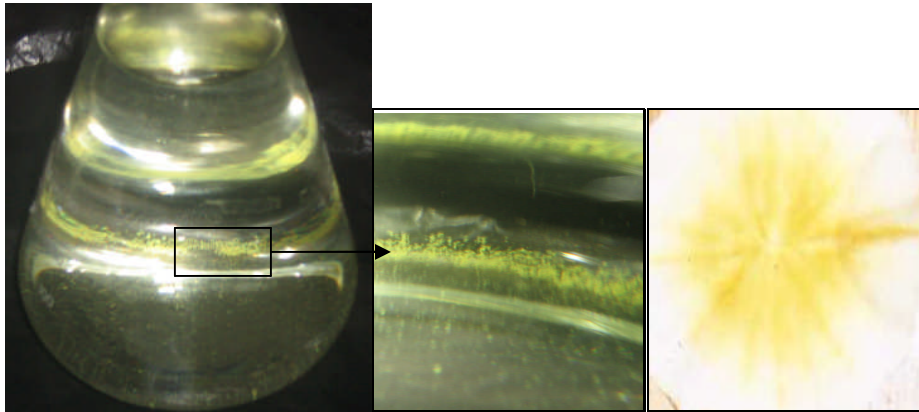
Concrète des tubercules

Concrète des feuilles

Concrète polaire des tubercules et des feuilles

## Composition des tubercules

	eau	Matière sèche				
		Matière polaire	Matière apolaire	cendres	protéines	autres
%	70,5182	5,2544	2,5578	0,6313	8,5936	12,5743



Précipitation de l'acide aristolochique purifié

Teneur en acide aristolochique purifié des tubercules et des feuilles en période de floraison

	Tubercules			Feuilles		
	PP (en g)	PAc Ar P (en mg)	%	PP (en g)	PAc Ar P (en mg)	%
1 <sup>er</sup> essai	100,0025	24,9	00,0249	50,0014	05,1	00,0102
2 <sup>ème</sup> essai	100,0006	25,2	00,0252	50,0024	04,8	00,0096
2 <sup>ème</sup> essai	100,0016	24,8	00,0248	50,0016	04,9	00,0098
Moyenne	100,0016	24,9667	00,0250	50,0018	04,9333	00,0099
Ecart-type	00,0008	00,1700	00,0002	00,0004	00,1247	00,0002

**PP** : Pesée (en gramme) de la poudre d'extraction, **PAc Ar P** : Pesée (en milligramme) de l'acide aristolochique purifié.

Teneur en acide aristolochique purifié des tubercules après maturité des graines

	PP (en g)	PAC Ar P (en mg)	%
1 <sup>er</sup> essai	100,0017	69,9	00,0699
2 <sup>ème</sup> essai	100,0010	69,7	00,0697
3 <sup>ème</sup> essai	100,0013	69,7	00,0697
Moyenne	100,0013	69,7667	00,0698
Ecart-type	00,0000	00,0943	00,0001

**PP** : Pesée (en gramme) de la poudre d'extraction, **PAC Ar P** : Pesée (en milligramme) de l'acide aristolochique purifié.

Composition de l'acide aristolochique purifié des feuilles en période de floraison

	Teneur	%
Ac Ar I (en mg)	02,8595	57,9632
Ac Ar II (en mg)	02,0738	42,0368
Autres Ac Ar (en mg)	00,00	00,00

**Ac Ar**: Acide Aristolochique, **Ac Ar I** : Acide aristolochique I, **Ac Ar II** : Acide aristolochique II, **Autres** : autres types de l'acide aristolochique.

Composition de l'acide aristolochique purifié des tubercules en période de floraison et après maturité des graines.

	Période de floraison		Après maturité des graines	
	P Ac Ar P	%	P Ac Ar P	%
Ac Ar I (en µg)	15,4521	61,8907	65,1590	93,3956
Ac Ar II (en µg)	00,4247	01,711	00,5839	00,8369
Autres Ac Ar(en µg)	09,0899	36,4083	04,0238	05,4069

**Ac Ar:** Acide Aristolochique, **Ac Ar I:** Acide aristolochique I, **Ac Ar II:** Acide aristolochique II, **P Ac Ar P :** Pesée (en microgramme) de l'acide aristolochique purifié,

Teneur en acides aristolochiques dans un gramme de matière sèche

	Période de floraison		Après maturité des graines
	Tubercules	Feuilles	Tubercules
Ac Ar I (en µg)	154,5210	28,6440	651,5900
Ac Ar II (en µg)	04,2470	20,7380	05,8390
Autres Ac Ar (en µg)	90,8990	00,00	40,2380

**Ac Ar:** Acide Aristolochique, **Ac Ar I:** Acide aristolochique I, **Ac Ar II :** Acide aristolochique II.



Teneur en acide aristolochique dans un gramme de concrète alcoolique

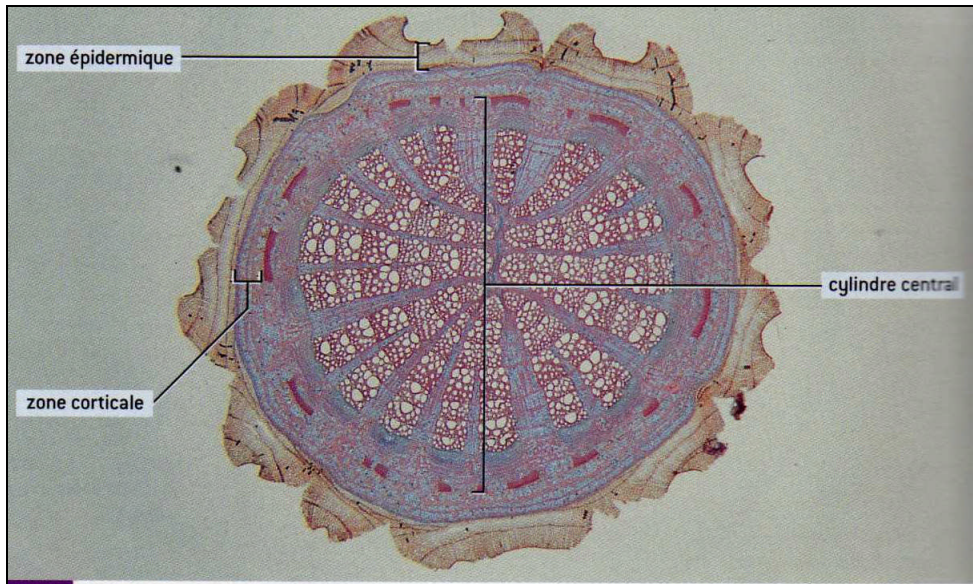
	Période de floraison		Après maturité des graines
	Tubercules	Feuilles	Tubercules
Ac Ar I	870,8205	331,0411	3 672,1088
Ac Ar II	23,9175	240,0815	32,9063
Autres Ac Ar	512,2885	00,00	226,7658

**Ac Ar:** Acide Aristolochique, **Ac Ar I:** Acide aristolochique I, **Ac Ar II:** Acide aristolochique II

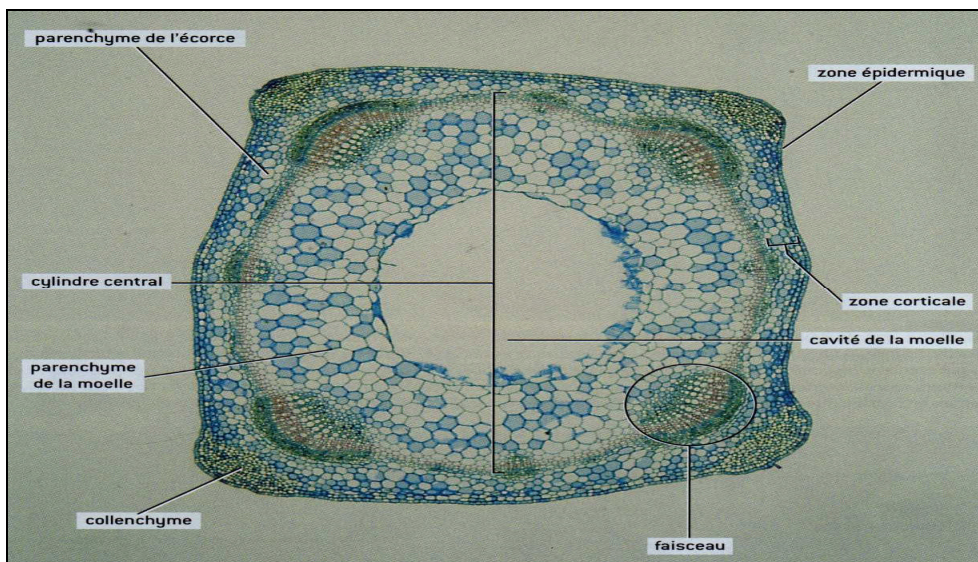
Pourcentage de l'acide aristolochique dans la poudre végétale

	Feuilles	Tubercules	
		Période de floraison	Après maturité des graines
Ac Ar I	0,0029	0,0155	0,0652
Ac Ar II	0,0021	0,0004	0,0006
Autres Ac Ar	00	0,0091	0,0040

**Ac Ar:** Acide Aristolochique **Ac Ar I:** Acide aristolochique I, **Ac Ar II:** Acide aristolochique II



Coupe transversale da la tige de *Aristolochia clematitis* L.



Coupe transversale de la tige de *Salvia officinalis* L.

## GLOSSAIRE

- Âcre : qui irrite les organes de goût ou de l'odeur.
- Adduit d'ADN : complexes formés après fixation de l'acide aristolochique sur les bases puriques (Adénine et Guanine) de l'ADN.
- Albumen : tissu riche en réserves nutritives, qui avoisine la plantule dans certaines graines.
- Alexipharmaque : remède que l'on croyait propre à expulser du corps les principes morbifiques, ou à prévenir l'effet des poisons à l'intérieur.
- Alexitère : remède employé pour prévenir les effets d'un venin ou d'un poison.
- Aloès : plante grasse exotique, de forme acaule ou arborescent à feuilles charnues et serrées en bouquet, appartenant à la famille des *Liliacées*.
- Anorexie : perte de l'appétit organique ou fonctionnelle.
- Antitussive: contre la toux.
- Anthère : partie supérieure de l'étamine des plantes à fleurs, dans laquelle se forment des grains de pollen. Elle s'ouvre à maturité pour laisser échapper ceux-ci.
- Arille : tégument charnu entraînant la graine de certaines plantes avec laquelle il constitue un faux fruit.
- Asthme : maladie de cause souvent allergique, caractérisée par des accès de gêne respiratoire dus à un spasme bronchique.
- Aorte : artère qui naît à la base du ventricule gauche du cœur, et qui est le tronc commun des artères qui portent le sang chargé d'oxygène dans toutes les parties du corps.
- Baie : fruit charnu à graines ou à pépins, sans noyau.
- Buisson : touffe d'arbrisseaux sauvage et rameaux.
- Caduc : qui tombe chaque année.
- Calice : ensemble des sépales d'une fleur.
- Capsule : fruit sec qui s'ouvre par des fentes ou des pores.

- Carpelle : pièce florale portant les ovules et formant, seule ou soudée à autres, le pistil des fleurs.
- Cartilage: tissu élastique moins rigide.
- Chlorose : anémie par carence de fer.
- Coriace : dont on peut difficilement vaincre la résistance.
- Corolle : ensemble des pétales d'une fleur.
- Cartilagineux : de la nature du cartilage.
- Cyme : inflorescence formée d'un axe principal, terminé par la fleur la plus ancienne et portant latéralement un ou plusieurs axes secondaires fleuris, ramifiés ou non.
- Déhiscent : qui s'ouvre par déhiscence (ouverture naturelle à maturité d'un organe clos).
- Diurétique : favorise la production des urines soit par action sur les cellules rénales elles-mêmes, soit par action sur la circulation sanguine générale, soit en agissant sur le centre nerveux régulant la diurèse.
- Eméto-cathartique : capable de déclencher le vomissement (purgatif et vomitif à la fois)
- Emménagogue : qui provoque ou régularise les règles.
- Endosperme : tissu qui assure la nutrition de l'embryon.
- Etamine : organe male des plantes à fleurs. Il est formé d'une partie mince, le filet, et d'une partie renflée, qui renferme le pollen.
- Expectorant : propre à faciliter l'expulsion des mucosités qui obstruent les vois respiratoires.
- Fomentation : application locale et externe d'une médication chaude à des fins thérapeutiques.
- Follicule : fruit sec déhiscent, s'ouvrant par une seule fente correspondant à un des carpelles.
- Fustile : canal étroit d'origine congénitale ou accidentelle donnant passage de façon continue à un produit physiologique (urine, matière fécale,...) ou purulent qui l'écoule à la surface du corps (fustile interne) ou dans les cavités internes (fustile interne).
- Glabre : dépourvue de poils ou de duvets.
- Goutte : affection diathésique caractérisée par des troubles viscéraux et articulaires, avec dépôt d'urates.

- Grappe : assemblage étagé et conique de fleurs, de fruit, autour d'une tige commune.
- Gynécée : c'est le pistil.
- Hermaphrodite : qui est à la fois mâle et femelle.
- Hoquet : contraction spasmodique du diaphragme entraînant une secousse brusque du thorax et de l'abdomen, accompagnée d'un bruit caractéristique causé par le resserrement subit de la glotte et la vibration des cordes vocales.
- Humeur : substance liquide sécrétée par un organisme vivant.
- Hydrochore: plante dont le pollen est véhiculé par l'eau.
- Inflorescence : groupe de fleurs distribuées, selon des règles déterminées, le long d'un axe simple ou ramifié.
- Leucophlegmatie : inflammation générale du tissu cellulaire. C'est une espèce d'œdème, d'une bouffissure ou hydropisie universelle, dans laquelle la sérosité est épanchée sous la peau, dans le tissu cellulaire de tout le corps.
- Lochies : écoulement par le vagin, contenant notamment du sang, qui dure quelques semaines après l'accouchement.
- Matrice : organe de l'appareil générateur de la femme et des mammifères femelles, situé dans la cavité pelvienne destiné à contenir l'embryon et le fœtus jusqu'à son complet développement.
- Napiforme: ayant la forme d'un navet.
- Nauséux (euse) : qui donne l'envie de vomir.
- Nectaire : organe végétal sécrétant le nectar.
- Oblong : qui est d'une forme mince et allongée.
- Obtus : qui manque de finesse.
- Ocytocique: stimule la contraction utérine lors de l'accouchement.
- Oléagineux : de la nature de l'huile.
- Pédicelle : petit pédoncule.
- Périanthe : ensemble des enveloppes florales (calice et corolle) qui entourent les étamines et le pistil.
- Pistil : appareil reproducteur femelle de la fleur.
- Placenta : région de l'axe ou de la paroi de l'ovaire où sont fixés les ovules.
- Placentation : disposition des ovules dans l'ovaire des plantes à fleurs.
- Pubescent : couvert de poils ou de duvet.
- Roussâtre : qui tire sur le roux.

- Spasme : contraction involontaire et pathologique affectant certains muscles.
- Stomachique : propre à établir le fonctionnement de l'estomac.
- Sordide : d'une saleté repoussante.
- Tonique : qui correspond à une contraction musculaire anormalement longue et prononcée
- Translucide : surface plus ou moins transparente laissant passer les rayonnements.
- Ulcère : perte de substance au niveau d'une muqueuse, dont la tendance à la cicatrisation est généralement faible et à évolution chronique.
- Ventru : de forme bombée.